

POLIMORFISMOS DE LOS GENES MODULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE COMO PREDICTORES DE RECAIDA EN LOS PACIENTES CON MIELOMA MULTIPLE

Yolanda González Montes

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS DE LOS GENES
MODULADORES DE LA RESPUESTA
INMUNE COMO PREDICTORES DE
RECAIDA EN LOS PACIENTES CON
MIELOMA MULTIPLE**

Yolanda González Montes

2023



TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS DE LOS GENES
MODULADORES DE LA RESPUESTA
INMUNE COMO PREDICTORES DE
RECAIDA EN LOS PACIENTES CON
MIELOMA MULTIPLE**

**Yolanda González Montes
2023**

Programa de doctorado en Biología Molecular, Biomedicina y Salud

Dirigida por: Dr David Gallardo Giralt

Tutora: Anna Massaguer Vall-llovera

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universidad de Girona



Dr David Gallardo Giralt

Cap del Servei d'Hematologia de l'Institut Català d'Oncologia de Girona, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona.

Professor agregat vinculat al Departament de Ciències Mèdiques de la Universitat de Girona.

Certifico:

Que Yolanda González Montes ha dut a terme sota la meva direcció el treball titulat: **Polimorfismos de los genes moduladores de la respuesta inmune como predictores de recaída en los pacientes con mieloma múltiple** que es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctora per la Universitat de Girona (UdG).

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signo aquest document.

Dr David Gallardo Giralt

A Girona, 22 desembre de 2023

A mis padres,
Gracias por vuestro amor sin límites.
Ejemplos de vida.

A mi pareja,
Fuente de inspiración y apoyo incondicional.
Inseparable compañero de viaje.

"The best way to predict the future is to create it"
Abraham Lincoln

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han contribuido directa o indirectamente a esta tesis. En particular, me gustaría dar las gracias a:

David Gallardo, expresarle públicamente mi gratitud y reconocimiento. Ha sido un estímulo fundamental para este trabajo. Gracias por la confianza depositada en mí, por compartir tus conocimientos y estimular mi faceta investigadora. En especial por tu visión crítica, tus aportaciones científicas inestimables y la dedicación a este proyecto.

Alicia Villavicencio y Gemma Osca, por vuestra ayuda incondicional desde el inicio de este proceso. Por compartir conmigo vuestros conocimientos de bioestadística, por vuestra paciencia y por los grandes consejos que me han facilitado el camino.

Rocío Rodríguez y Marta González, grandes compañeras e incansables trabajadoras. Gracias por enseñarme todo lo relacionado con el laboratorio, sin vosotras este proyecto no habría estado posible.

Cesca Llopis, tu amabilidad y tu fuerte apoyo permanecerán en mi mente para siempre.

A todos los compañeras y compañeros del Servicio de Hematología y del laboratorio de Hematología Especial, porque han estado imprescindibles en este largo camino. Compaginar la actividad asistencial con la tesis doctoral ha estado un reto muy duro, gracias por vuestros valiosos consejos y apoyo emocional.

A todos los pacientes y sus familiares, que con su desinteresada colaboración han permitido que este proyecto fuera posible.

A la fundación Roses contra el Cáncer y a la asociación Amics d'en Pitu, por su admirable dedicación a los pacientes oncohematológicos y por su colaboración en la lucha contra el cáncer apoyando la investigación clínica.

Gracias infinitas a todos.

FINANCIACIÓN

FINANCIACIÓN

El trabajo de investigación presentado en esta tesis se ha llevado a cabo gracias a las siguientes ayudas:

- Beca Roses contra el Càncer
- Donación de la Asociación Amics d'en Pitu

LISTADO DE PUBLICACIONES

LISTADO DE PUBLICACIONES

Publicaciones y presentaciones derivadas de la tesis:

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Título: Genetic variants of CTLA4 are associated with clinical outcome of patients with multiple myeloma.

Autores: Gonzalez-Montes Y, Rodriguez-Romanos R, Villavicencio A, Osca-Gelis G, González-Bártulos M, Llopis F, Clapes V, Oriol A, Sureda A, Escoda L, Sarrà J, Garzó A, Lloveras N, Díez I, Granada I, Gallardo D.

Revista: Frontiers in Immunology 2023 Apr 12;14:1158105.

Impact Factor (2023): 8.786 (Q1).

DOI: doi: 10.3389/fimmu.2023.1158105

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

Y. González, G. Osca, R. Romanos et al. Influencia de los polimorfismos genéticos de las moléculas moduladoras de la respuesta inmune en la supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple (MM). LXI Congreso Nacional de la SEHH y XXXV Congreso Nacional de la SETH. Valencia, España. Octubre 2019. Presentación oral.

ARTÍCULO PENDIENTE DE REVISIÓN:

Título: CD200 genotype is associated with clinical outcome of patients with multiple myeloma

Autores: González-Montes Y, Osca-Gelis G, Rodriguez-Romanos R, Villavicencio A, González-Bártulos M, Llopis F, Clapes V, Oriol A, Sureda A, Escoda L, Sarrà J, Garzó A, Lloveras N, Gómez B, Granada I, Gallardo D.

Revista: Frontiers in Immunology 2023

Impact factor (2023): 8.786 (Q1).

DOI:

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

BTLA: del inglés “B and T lymphocyte attenuator”

CD: célula dendrítica

CLL: cadenas ligeras libres

CP: célula plasmática

CPA: célula presentadora de antígeno

CTLA-4: del inglés “Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4”

EMR: enfermedad mínima residual

GMs: gammapatías monoclonales

GMSIs: gammapatías monoclonales de significado incierto

ICIs: inhibidores de los puntos de control inmunitario

Igs; inmunoglobulinas

IGH: cadena pesada de las inmunoglobulinas

IL-6: interleucina 6

IMWG: del inglés “International Myeloma Working Group”

IR: insuficiencia renal

LAG-3: del inglés “Lymphocyte-activation Gen 3”

LB: linfocito T

LT: linfocito B

MM: mieloma múltiple

MQ: mieloma quiescente

MDSC: del inglés “myeloid-derived suppressor cells”

MO: médula ósea

OS: del inglés “Overall survival”

OPG: osteoprotegerina

PCR: del inglés “Polimerasa chain reaction”

PD-1: del inglés “Programmed cell-death protein-1”

PD-L1: del inglés “Programmed cell-death protein-1 ligand”

PFS: del inglés “Progression-free survival”

RANKL: ligando del receptor activador de NFκB

SI: sistema inmunitario

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SNP: del inglés “Single nucleotide polymorphism”

SNPs: del inglés “Single nucleotide polymorphisms”

Treg: Linfocitos T reguladores

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de tablas

Tabla 1. Clasificación de las gammapatías monoclonales.....	42
Tabla 2. Criterios diagnósticos de GMSI, MQ y MM (IMWG 2014)	43
Tabla 3. Estadios de Durie y Salmon	52
Tabla 4. Estadios del International Staging System (ISS)	52
Tabla 5. Estadios del International Staging System revidado (R-ISS)	53
Tabla 6. Principales alteraciones citogenéticas y su impacto pronóstico.....	54
Tabla 7. Características clínicas de la cohorte analizada.....	88
Tabla 8. Distribución de los polimorfismos en los pacientes analizados.....	89
Tabla 9. Características de los pacientes según genotipos BTLA rs9288953, CD28 rs3116496, PDCD1 rs36084323, PDCD1 rs11568821 y LAG3.....	91
Tabla 10. Características de los pacientes según genotipos CTLA4 rs2311775 y CTLA4 rs733618.....	92
Tabla 11. Supervivencia global y supervivencia libre de progresión según polimorfismos genéticos.....	95
Tabla 12. Análisis univariante y multivariante de la SG y SLP de los pacientes con MM.....	98
Tabla 13. Características clínicas de la cohorte analizada.....	101
Tabla 14. Distribución de los polimorfismos en los pacientes analizados.....	102
Tabla 15. Características clínicas de los pacientes según genotipos CD200 rs1131199 y CD200 rs2272022.....	104
Tabla 16. Análisis univariante y multivariante de los pacientes con diagnóstico de MM.....	109

Listado de figuras

Figura 1. Progresión de GMSI, MQ a MM.....	46
Figura 2. Sistema inmunitario innato y adaptativo.....	56
Figure 3A. Activación del linfocito T.....	59
Figura 3B. Señal coinhibidora del linfocito T.....	59
Figura 4. Vías de coestimulación y de inhibición del linfocito T.....	59
Figura 5. Proceso de inmunoección del cáncer.....	60
Figura 6. Ciclo inmune contra el cáncer	61
Figura 7. Moléculas reguladoras de los puntos de control inmunológico y sus ligandos.....	62
Figura 8. CTLA-4 y PD-1 inhibidores de la respuesta inmune antitumor.....	65

Figura 9A. Supervivencia libre de progresión según genotipos agrupados CTLA4 rs231775.....	96
Figura 9B. Supervivencia libre de progresión según genotipos independientes CTLA4 rs231775.....	97
Figura 10. Supervivencia libre de progresión en pacientes ISS 1+ ISS 2 según genotipos CTLA4 rs231775.....	99
Figura 11. Supervivencia libre de progresión para pacientes que han recibido auto-TPH según el genotipo. CTLA4 rs231775.....	100
Figura 12A. Supervivencia global según genotipos agrupados CD200 rs1131199.....	107
Figura 12B. Supervivencia global según genotipos independientes CD200 rs1131199.....	107
Figura 13A. Supervivencia global según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes que han recibido una auto-TPH.....	110
Figura 13B. Supervivencia global según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes que no han recibido una auto-TPH.....	111
Figura 14. Incidencia acumulada de progresión según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes con diagnóstico de MM.....	112
Figura 15A. Incidencia acumulada de mortalidad en pacientes que no habían recibido un auto-TPH según genotipo CD200 rs1131199; para aquellos que murieron después de documentar la progresión del MM.....	113
Figura 15B. Incidencia acumulada de mortalidad en pacientes que no habían recibido un auto-TPH según genotipo CD200 rs1131199; para aquellos que murieron sin progresión del MM antes de la muerte.....	113

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	V
FINANCIACIÓN	IX
LISTADO DE PUBLICACIONES.....	XIII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XVII
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	XXI
ÍNDICE	XXVI
RESUMEN.....	31
1. INTRODUCCIÓN	39
1.1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.....	41
1.1.1. Concepto.....	41
1.1.2. Clasificación	41
1.2. MIELOMA MÚLTIPLE.....	44
1.2.1. Epidemiología	44
1.2.2. Etiopatogenia.....	44
1.2.2.1. Origen	44
1.2.2.2. Eventos oncogénicos	45
1.2.2.3. Microambiente medula ósea	47
1.2.3. Manifestaciones clínicas.....	48
1.2.4. Criterios diagnósticos	49
1.2.5. Escalas de estadificación	51
1.2.6. Factores pronósticos	53
1.3. EL SISTEMA INMUNE EN EL MIELOMA MÚLTIPLE.....	55
1.3.1. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa.....	55
1.3.2. Inmunidad innata.....	56
1.3.3. Inmunidad adaptativa	57
1.3.4. Inmunovigilancia y inmunotolerancia frente a los tumores	60
1.3.5. Inmunidad antitumoral en el mieloma múltiple	63
1.3.6. Moléculas inhibidoras de los puntos de control inmunitario en el mieloma múltiple.....	64

1.3.7. Polimorfismos de genes reguladores de los puntos de control inmunitario en el mieloma múltiple.....	67
2. HIPÓTESIS	70
3. OBJETIVOS	74
4. METODOLOGÍA.....	78
4.1. Diseño del estudio y pacientes.....	80
4.2. Detección de polimorfismos en CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1 y LAG-3.....	81
4.3. Detección de polimorfismos en CD200.....	82
4.4. Expresión de CD200 en la célula plasmática.....	82
4.5. Análisis estadístico.....	82
5. RESULTADOS.....	85
5.1. Polimorfismos genéticos en CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1 y LAG-3.....	87
5.1.1. Características de la cohorte analizada.....	87
5.1.2. Distribución de genotipos en la cohorte analizada.....	89
5.1.3. Homeogeneidad entre los grupos para los genotipos BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PDCD1 (rs36084323, rs11568821), LAG3 (rs870849), CTLA4 (rs231775,rs733618).....	89
5.1.4. Impacto clínico de las variantes genéticas de CTLA-4.....	94
5.2. Polimorfismos genéticos en CD200.....	100
5.2.1. Características de la cohorte analizada.....	100
5.2.2. Distribución de genotipos en la cohorte analizada.....	102
5.2.3. Homeogeneidad entre los grupos para los genotipos CD200.....	103
5.2.4. Impacto clínico de las variantes genéticas de CD200.....	106
6. DISCUSIÓN.....	115
6.1. Impacto pronóstico del polimorfismo CTLA4 rs231775.....	117
6.2. Impacto pronóstico del polimorfismo CD200 rs1131199.....	119
6.3. Resultados de los ensayos clínicos con fármacos inhibidores de los puntos de control inmunitario.....	122
7. CONCLUSIONES.....	126
8. ANEXO.....	130
9. BIBLIOGRAFÍA.....	135

RESUMEN

RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) continúa siendo una enfermedad incurable a pesar de la incorporación de nuevas terapias. La historia natural del MM es la recaída después de los sucesivos tratamientos debido a la reaparición del tumor a partir de la enfermedad residual que no ha podido ser erradicada viendo reducida su esperanza de vida de forma significativa. Durante la progresión del MM, se producen defectos de la inmunidad celular y humoral que contribuyen al escape de la célula tumoral del control inmune natural.

El sistema inmune es un potente mecanismo de defensa contra el cáncer, es capaz de reconocer y destruir las células premalignas antes de que los tumores se formen (la vigilancia inmune). La respuesta inmune adaptativa está estrechamente regulada por múltiples vías coestimuladoras e inhibitorias. El equilibrio entre señales de coestimulación y de inhibición, puntos de control inmunológico, determina la funcionalidad de las células T durante la inmunidad y la tolerancia.

Hasta la fecha se dispone de muy pocos datos sobre el papel del sistema inmune para la prevención o el control de la recidiva tumoral en los pacientes con MM. En este contexto, en esta tesis exploramos los polimorfismos (SNPs) de genes que codifican moléculas de coestimulación/inhibición de la respuesta inmune y evaluamos su impacto en la supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP).

En el primer trabajo que compone la tesis, se han analizado retrospectivamente polimorfismos genéticos de CTLA4 (rs231775 y rs733618), BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821) y LAG-3 (rs870849) en 239 pacientes con MM de nuevo diagnóstico. Los pacientes con genotipo CTLA4 rs231775 AA/AG mostraron una media de SLP significativamente menor que los pacientes portadores del genotipo GG, siendo más evidente este efecto negativo en los pacientes que han recibido un trasplante autólogo (auto-TPH). Nuestros resultados sugieren que la presencia de genotipos específicos en el gen de CTLA4 puede identificar pacientes con alto riesgo de progresión precoz. Este polimorfismo podría ser potencialmente usado como un biomarcador pronóstico.

El segundo trabajo se ha centrado en el análisis de las variantes genéticas del gen de CD200. Varios estudios han demostrado que la sobre-expresión de CD200 en la célula plasmática tumoral se asocia a una peor supervivencia, sin embargo, no hay estudios que correlacionen variantes genéticas del gen de CD200 con supervivencia en pacientes con MM. Se han analizado retrospectivamente polimorfismos genéticos de CD200 (rs1131199 y rs2272022) en 291 pacientes con MM de nuevo diagnóstico. No se observaron diferencias de expresión de CD200 en las células plasmáticas entre los diferentes genotipos para cada uno de los polimorfismos estudiados. Los pacientes con genotipo CD200 rs1131199 GG mostraron una media de SG

significativamente menor que los pacientes portadores del genotipo CC+CG. Este efecto es especialmente detectado en los pacientes que no recibieron un auto-TPH. En estos pacientes, el genotipo CD200 rs1131199 GG influye negativamente en la mortalidad no relacionada con la progresión principalmente la debida a las infecciones. Este polimorfismo potencialmente identificaría pacientes de alto riesgo de mortalidad asociada a las infecciones.

SUMMARY

Multiple myeloma (MM) remains an incurable disease despite the incorporation of new therapies. The natural history of disease is of the relapse following treatments due to the re-emergence of the tumour from residual disease that cannot be eradicated, significantly reducing the life expectancy of these patients. Cellular and humoral immune impairment is a feature of MM evolution, allowing neoplastic plasma cells to escape from natural immune surveillance.

The immune system is a powerful defense mechanism against cancer; it can recognize and attack premalignant cells before tumours develop (immune surveillance). The adaptive immune response is regulated by multiple co-stimulatory and co-inhibitory signaling pathways. The balance between co-stimulatory and co-inhibitory signals, immune checkpoints, determines the functionality of T cells during immunity and tolerance.

However, few data are available concerning the role of immune surveillance in preventing or controlling myeloma relapse in patients with MM. In this direction, we explored the polymorphisms (SNPs) of genes that encode co-stimulatory/inhibitory molecules of the immune response and evaluated their impact on overall survival (OS) and progression free survival (PFS).

In the first study, we retrospectively analysed polymorphisms of CTLA4 (rs231775 and rs733618), BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 and rs11568821) y LAG-3 (rs870849) genes in 239 patients with newly diagnosed MM. Patients with a CTLA4 rs231775 AA/AG genotype showed a median PFS significantly lower than those with GG genotype, this negative effect was especially evident in patients who have received an autologous transplant. Our results suggest that the CTLA4 genotype may identify patients with earlier progression of MM. This polymorphism could potentially be used as a prognostic biomarker.

In the second study, we focused on the analysis of genetic variants of CD200. Several studies have shown that overexpression of CD200 in MM cells is associated with worse survival, however there are not data concerning the correlation between genetic variants of CD200 and survival in patients with MM. We retrospectively analysed the clinical impact of the of CD200 genotype (rs1131199 and rs2272022) in 291 patients with newly diagnosed MM. We did not find any significant difference of expression of CD200 in the MM cells between the different genotypes for each polymorphism studied. Patients with a CD200 rs1131199 GG genotype showed a median OS significantly lower than those with CC+CG genotype. This effect was specially detected in patients not receiving an auto-TPH. In these patients, the rs1131199 GG genotype negatively influenced in the mortality not related with the

progression of MM mainly due to infections events. This polymorphism could potentially identify patients at high risk of mortality associated with infections.

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

1.1.1. Concepto

Las gammapatías monoclonales (GMs) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal de células plasmáticas (CP) que producen una proteína homogénea de carácter monoclonal denominada componente M o paraproteína detectable en el suero y/o en la orina. La expresión de un solo tipo de cadena ligera kappa o lambda (restricción de cadena ligera) o una sola inmunoglobulina determina el carácter monoclonal de la proliferación.

El espectro de estas enfermedades es amplio y abarca desde trastornos de curso muy indolente que no requieren tratamiento, como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) considerada como un estadio premaligno, al mieloma múltiple (MM) que tiene mayor masa tumoral y una evolución más agresiva que habitualmente precisa tratamiento. Aunque el MM constituye el prototipo de las gammapatías monoclonales en la práctica clínica, es la GMSI la entidad más frecuente. El estudio de las GMSI ha permitido demostrar que la gran mayoría de los pacientes que desarrollan un MM evolucionaron a partir de esta entidad (1,2).

1.1.2 Clasificación

Las GMs pueden ser clasificadas en dos grandes grupos (benignas y malignas) tal como se detalla en la **tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de las gammopatías monoclonales

Gammopatías monoclonales benignas
Gammopatía monoclonal de significado incierto (idiopática)
Gammopatías monoclonales secundarias ¹
Gammopatías monoclonales malignas
Mieloma múltiple sintomático
Mieloma múltiple quiescente o asintomático
Leucemia de células plasmáticas
Síndrome POEMS (mieloma osteoesclerótico)
Plasmocitoma localizado (óseo o extramedular)
Macroglobulinemia de Waldenström
Enfermedades de cadenas pesada
Amiloidosis primaria

(1) GMSI reactivas a enfermedades autoinmunes (procesos reumatológicos, aglutininas frías, crioglobulinemia, sd Sjögren), cirrosis, sarcoidosis, trasplante de órganos y tratamiento inmunosupresor, infecciones o neoplasias malignas (tumores sólidos o síndromes linfoproliferativos).

La GMSI es una entidad muy frecuente con una prevalencia del 3-4% en las personas mayores de 50 años y que va incrementándose con la edad (3,4). La tasa de progresión de GMSI a MM es del 0.5-1% anual, y se señalan como factores predictivos de progresión el tipo y nivel de proteína monoclonal, la ratio de cadenas ligeras libres en suero, el porcentaje de CP en la médula ósea (MO), la proporción de células plasmáticas con inmunofenotipo aberrante y la presencia de inmunoparesia (5-11)

El Grupo Internacional de Mieloma (*IMWG, International Myeloma Working Group*) publicó en el año 2014 un documento de consenso donde se revisaron los criterios diagnósticos de las diferentes gammopatías monoclonales (12). De acuerdo con estos criterios, la GMSI se define por la presencia de un componente M sérico < 30 g/L y una infiltración medular por CP < 10%, en ausencia de sintomatología atribuible a la gammopatía monoclonal. Por el contrario, los pacientes con diagnóstico de MM presentan una plasmocitosis clonal en médula ósea \geq 10% o plasmocitoma demostrado por biopsia tisular.

En el caso de MM quiescente (MQ) el CM en suero es $>30\text{g/L}$ y/o CM en orina $>0,5\text{g}/24\text{h}$ (orina) en ausencia de afectación orgánica (acrónimo CRAB) o eventos definitorios de MM (biomarcadores) y en el caso de MM los valores umbral de componente M y del grado de infiltración medular son arbitrarios siempre que exista afectación orgánica (acrónimo CRAB) o eventos definitorios de MM (biomarcadores) (tabla 2).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de GMSI y MM (IMWG 2014)

	GMSI	MM quiescente	MM
Componente Monoclonal	$<30\text{g/L}$ en suero y $<500\text{mg}$ en orina 24h	$>30\text{g/L}$ en suero y/o $>500\text{mg}$ en orina 24h	CM en suero y/o orina 24h
CP en Medula ósea	$< 10\%$	$>10\%$ $<60\%$	10%
Síntomas CRAB	NO	NO	SI o
Biomarcadores	NO	NO	SI

CRAB

- Calcio sérico corregido $>11\text{mg/dL}$
- Insuf. Renal: Cr $>2\text{ mg/dL}$
- Anemia: Hb $<10\text{g/dL}$
- Lesiones óseas líticas

BIOMARCADORES

- $>60\%$ cel. Plasmáticas en M.O
- Ratio de cadenas ligeras libres en suero (afecta/no afecta) ≥ 100
- Presencia de > 1 lesión focal en RMN ($\geq 0,5\text{ cm}$)

1.2. MIELOMA MÚLTIPLE

1.2.1 Epidemiología

EL MM es una proliferación neoplásica de células plasmáticas caracterizada por la infiltración clonal de células plasmáticas en la médula ósea y/o en tejido linfoide u otros tejidos blandos. Las células tumorales secretan inmunoglobulinas completas o cadenas ligeras de carácter monoclonal que pueden ser detectadas en suero y/o en orina por electroforesis, inmunofijación o cuantificación de las cadenas libres séricas. Las principales manifestaciones derivan de la afectación del microambiente medular (destrucción ósea y supresión de la hemopoyesis) o de alteraciones debidas a la proteína monoclonal.

Es la segunda neoplasia hematológica más frecuente (10-20% de todas las neoplasias hematológicas) tras el linfoma y corresponde al 1% de todas las neoplasias malignas. Su incidencia se estima en torno a 5-8 casos por cada 100.000 habitantes/año (13,14). Presenta una mayor incidencia en la población de edad avanzada con una mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico de aproximadamente 66-70 años, un 37% de los pacientes son menores de 65 años (15,16). Es un poco más frecuente en hombres (17) y por grupos étnicos la prevalencia en individuos afroamericanos es el doble que la observada a los de raza blanca; en cambio las personas de origen asiático tienen una menor incidencia (18,19).

A pesar de mejorar significativamente la supervivencia de los pacientes en los últimos 20 años, la enfermedad continua siendo incurable debido a las continuas recaídas a lo largo de su evolución clínica hasta llegar a una fase final de la enfermedad de resistencia a los tratamientos (20); sólo el 10%-15% de los pacientes logran o superan la supervivencia esperada en comparación con la población general.

1.2.2. Etiopatogenia

1.2.2.1. Origen

Las células tumorales del MM se originan a partir de células B clonales post-germinales que migran a la médula ósea donde se diferencian a CP de larga vida (21). La ascendencia postgerminal se apoya principalmente en que la mayoría de las translocaciones cromosómicas recurrentes que involucran al gen de la cadena pesada de la Ig (IGH) tienen lugar durante el proceso de cambio de clase y en menor medida durante el de mutación somática. Sin embargo, en el caso del MM IgM parece surgir de una célula plasmática del centro pregerminal con translocaciones caracterizadas por puntos de ruptura inducidos por la recombinación VDJ (22).

Aunque la etiología no es bien conocida se han identificado diversos factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. Estudios epidemiológicos sugieren una predisposición genética al detectarse mayor incidencia en los individuos de raza negra y por algunos casos de agregación familiar. Mediante técnicas de asociación del genoma completo en grupos familiares se ha observado evidencia directa de la predisposición genética a desarrollar MM identificándose alelos de alto riesgo (23,24). La estimación es de 3 casos familiares por cada 1.000 pacientes con MM. Otros factores de riesgo son los ambientales por exposición a radiaciones ionizantes o sustancias químicas (benceno o pesticidas) (25,26) y recientemente se ha incluido como factor de riesgo la obesidad al observarse correlación entre la cantidad de grasa corporal y un aumento del riesgo de MM (27,28).

El inicio del mieloma estaría mediado por la interacción de factores ambientales y variantes genéticas heredadas que cuando se combinan con los procesos fisiológicos normales que son necesarios para generar diversidad de anticuerpos, darían como resultado alteraciones genéticas que facilitan la supervivencia de las CP. En la médula ósea la CP se establecen como células inmortalizadas donde encontrarán su nicho perfecto para la transformación y la progresión de la enfermedad. Aunque no hay un evento concreto determinadas alteraciones cromosómicas facilitan la transición de GMSI o MQ a MM. Estas anomalías se conocen como eventos citogenéticos primarios y ocurren en fases tempranas de la enfermedad (29).

1.2.2.2. Eventos oncogénicos

El MM es una neoplasia genéticamente compleja y heterogénea. Es compleja porque su desarrollo y progresión son inducidos por múltiples eventos oncogénicos y porque los diferentes subclones presentes durante la progresión de la enfermedad evolucionan de manera diferente dentro del mismo individuo (figura 1). Esta heterogeneidad clonal comporta que cada uno de los clones puede responder de forma distinta al tratamiento e interaccionar de forma diferente con el microambiente medular favoreciendo en muchas ocasiones las recidivas de la enfermedad y la aparición progresiva de resistencias al tratamiento (30).

El panorama genético complejo del MM ya está presente en fases tempranas de la enfermedad, en la GMSI y en el MQ. En líneas generales tanto la GMSI como el MQ reproducen el espectro de las alteraciones citogenéticas y mutaciones presentes en el MM. Inicialmente tienen lugar eventos oncogénicos primarios que determinarán un estado de inestabilidad genética. Los eventos primarios más frecuentes son categorizados en dos subtipos (31-33):

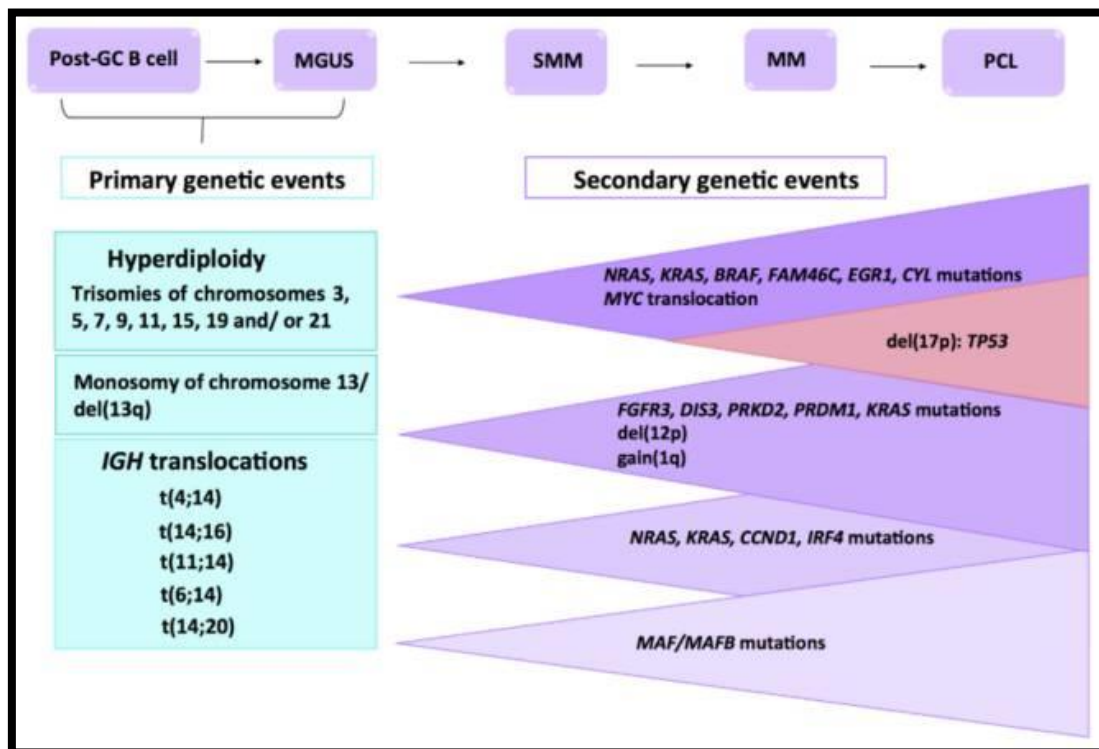
-Los no-hiperdiploide (35-40%): constituyen un grupo heterogéneo, con numerosos subtipos moleculares asociados a translocaciones recurrentes que involucran al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*), ubicado en 14q32, y diferentes oncogenes: *FGFR3-MMSET* (4p16), *CCND3* (6p21), *CCND1* (11q13), *MAF* (16q23) y

MAFB (20q12). En menor frecuencia se observan otras translocaciones del cromosoma 14, entre ellas la t(6;14) (p25;q32) que involucra al gen *IRF4*. Todas ellas determinan la desregulación de *ciclinas D*, que lleva a la activación del ciclo celular y aporta ventajas selectivas a los subclones que las presentan.

-Los hiperdiploides (42-45% de los casos): se caracterizan por mostrar múltiples trisomías, preferencialmente de los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 y producen habitualmente desregulación del oncogén MYC

A medida que avanza la enfermedad las CP sufren una serie de eventos citogenéticos secundarios que serán los que permitirán la progresión de la enfermedad. Entre ellos los más frecuentes son las mutaciones adquiridas en determinados oncogenes de la ruta MAPK/ERK, como KRAS, NRAS, BRAF, EGR1 y FGFR3 y de genes implicados en la reparación del DNA como TP53, ATR, ATM y ZFH4. La activación de ruta de NF-kB también está afectada por mutaciones en múltiples genes como TRAF3, CYLD, NIK incrementándose la expresión de proteínas antiapoptóticas y la desregulación del gen MYC. También se han observado mutaciones de la vía PI3K y otras implicadas en el ciclo celular. Además de las mutaciones adquiridas también aparecen translocaciones secundarias, variaciones en el número de copias y pérdidas de heterocigotidad. Entre ellas destacar la delección del brazo corto del cromosoma 17 que implicaría la eliminación del gen supresor de tumores TP53; la translocación de MYC y APOBEC (34–37).

Figura 1. Progresión de GMSI, MQ a MM



Cardona-Benavides IJ et al. *Cells* 2021 Feb 5;10(2):336 (37)

Las alteraciones epigenéticas también forma parte del mecanismo de progresión del MM. Las alteraciones epigenéticas son alteraciones covalentes del DNA o de las histonas que no afectan a la secuencia de nucleótidos del DNA pero que inciden en el silenciamiento o expresión de genes. El MM tiene un patrón reconocido de hipometilación global del ADN, por otro lado, también se ha observado hipermetilación de regiones promotoras y regiones ricas en islas CpG que inactiva genes que afectan la adhesión celular, la proliferación, la relación estroma-clon y la transcripción. Este hecho es predominante en los pacientes con la t(4;14), lo que da lugar a la sobreexpresión del gen MMSET (multiple mieloma SET domain) cuyos transcritos interactúan con metilasas de histonas produciéndose sobreexpresión de algunos oncogenes. Éste es uno de los mecanismos por los cuales se activa con frecuencia la vía de NF-kB en el MM (38,39). También ha cobrado interés los RNA no codificantes como los microRNA (miR), son pequeñas moléculas de ARN que pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores tumorales dependiendo del RNAm complementario que interfieran. Estudios de expresión de microRNAs han puesto de manifiesto como la desregulación de los microRNAs contribuye al comportamiento biológico de la enfermedad y hacen referencia a su potencial como dianas terapéuticas (40,41).

La patogenia de la enfermedad ósea es consecuencia del desequilibrio entre la formación y la reabsorción ósea debido a que se produce una mayor actividad osteoclástica así como una marcada supresión de la actividad osteoblástica. La interacción de la CP con el estroma favorece la producción de factores de activación osteoclástica al producirse un incremento de los niveles plasmáticos de IL-6 y RANKL (ligando del receptor activador de NFkB) acompañado por una reducción de los niveles de OPG (osteoprotegerina) que actúa como inhibidor de RANKL. También se inhibe la vía de osteoblastogénesis por la producción de la citoquina DKK-1 (factor Dickkopf-1) y de esclerostin. Este proceso da lugar a las lesiones osteolíticas tan característica de los pacientes con MM e impulsa aún más la proliferación de CP y la supresión inmunitaria, como resultado de la liberación de IGF1 y TGF- β durante la resorción ósea (42).

1.2.2.3. Microambiente medula ósea

El microambiente de la médula ósea está constituido por la matriz celular, las células hematopoyéticas y las células no hematopoyéticas; además de componentes no celulares como son las proteínas de la matriz extracelular y factores solubles. El compartimiento de células no hematopoyéticas incluye células estromales, células vasculares endoteliales, fibroblastos, adipocitos, osteoblastos y osteoclastos entre otros. La interacción entre la CP y el microambiente de la médula ósea es fundamental para supervivencia de la CP y la progresión de GMSI/MQ a MM.

La adhesión de las CP a las células estromales y a las proteínas de la matriz extracelular dan lugar a numerosos cambios siendo los más destacados la inducción de angiogénesis, desregulación inmune y secreción de factores paracrinos y autocrinos (citoquinas y factores de crecimiento).

La adhesión de las células de mieloma al estroma de la MO, está mediada por la unión de varios tipos de receptores de membrana; los más relevantes son CD44, VLA-4, VLA-5, LFA-1, CD, syndecan-1 y MPC-1 que median la migración de las CP transformadas a la médula ósea y sus uniones con células del estroma y con la matriz extracelular. En general, estas uniones también estimulan la secreción de citoquinas como IL-6, VEGF, IL-1b, IL-10, TNF- α , TGF- β , MMP-1 y MIP-1 α que aumentan el crecimiento tumoral, la supervivencia y la resistencia a drogas a través de vías metabólicas como MAPK, PI3-K/Akt, Jak/STAT y NF- κ B (43).

Es una compleja regulación autocrina, paracrina y de adhesión intercelular que activa mecanismos de proliferación celular, inhibición de la apoptosis y angiogénesis favoreciendo su crecimiento, supervivencia, migración y resistencia a fármacos (44,45).

1.2.3. Manifestaciones clínicas

La presentación clínica es muy variable, aproximadamente un 20% de los pacientes al diagnóstico están asintomáticos presentando únicamente una paraproteína monoclonal detectada en una analítica de rutina. En el resto de los pacientes, el 80% de los casos, los síntomas derivan de la afectación orgánica. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las siguientes (15,46):

- El dolor óseo está presente en el 75% de los pacientes, constituyendo el síntoma más frecuente al diagnóstico. Típicamente el dolor se desencadena con el movimiento y los huesos que suelen afectarse son el cráneo, las vértebras, las costillas, la pelvis y la región proximal de huesos largos. También son frecuentes la osteoporosis generalizada y las fracturas patológicas.
- La anemia es otro hallazgo frecuente (65% de los pacientes) por lo que habitualmente el paciente refiere astenia y debilidad.
- Un 25-30% presentaran insuficiencia renal (IR) que puede acompañarse de sed, poliuria, edemas y la mayoría muestran proteinuria de cadenas ligeras (Bence-Jones) y/o hipercalcemia.
- La hipercalcemia está presente en el 25% y se manifiesta con síntomas como poliuria, polidipsia, náuseas, vómitos, astenia, estreñimiento o alteración del nivel de consciencia.
- Las infecciones bacterianas recurrentes como consecuencia del descenso en la síntesis de inmunoglobulinas, aumento del catabolismo de las Igs normales y

supresión de la linfopoyesis. Un 75% de los pacientes en algún momento de la enfermedad presentará un episodio infeccioso sobretodo pulmonar o urinario.

Otros síntomas menos frecuentes a la presentación son la hiperviscosidad sintomática (bradipsiquia, cefalea, vértigo, pérdida visual, insuficiencia cardíaca, púrpura, hemorragia), las alteraciones neurológicas por compresión canal medular o raíces nerviosas y un síndrome general de pérdida de peso, fiebre o anorexia. Alrededor del 10% de pacientes presentan plasmocitomas extramedulares en el momento del diagnóstico. La hepatomegalia puede estar presente en el 15% de los casos y la esplenomegalia en el 5%. Alrededor del 5% tiene amiloidosis asociada, que puede manifestarse como síndrome nefrótico, insuficiencia cardiaca congestiva, síndrome del túnel carpiano, polineuropatías e hipotensión ortostática.

1.2.4 Criterios diagnósticos

El componente monoclonal característico del MM es IgG, IgA o cadenas ligeras aisladas (MM Bence Jones) en el 52%, 21% y 16% de los casos, respectivamente. Los MM IgD son infrecuentes y los IgE e IgM, excepcionales (<1%). En el 93% de pacientes, el CM se puede detectar en suero por electroforesis o inmunofijación, y en el 70% en orina. Dos terceras partes del 3% de pacientes aparentemente no secretores de CM son, en realidad, oligosecretores y se pueden identificar y seguir evolutivamente mediante la prueba de las cadenas ligeras libres (CLL) en suero.

El estudio inicial de la enfermedad y su diagnóstico diferencial se basa en la presencia de células plasmáticas clonales en la médula ósea, la cuantificación y tipificación del componente monoclonal en sangre y orina de 24h; y el estudio de las lesiones en los órganos dianas (anemia, insuficiencia renal, lesiones óseas e hipercalcemia) (12,47).

Las pruebas diagnósticas recomendadas incluyen las siguientes:

- Estudio del componente monoclonal: Cuantificación de las Igs (IgA, IgG, IgM, IgD) en suero mediante nefelometría. Detección y cuantificación del componente monoclonal mediante electroforesis de proteínas en suero y en orina de 24 horas. Tipificación de la Ig y cadena ligera implicada mediante inmunofijación en suero y en orina de 24 horas. Medición de las cadenas ligeras libres y su cociente en suero (CLL-Kappa, CLL-Lambda y ratio CLL-K/CLL-L).

- Estudio de la médula ósea en biopsia o aspirado: cuantificar el porcentaje de CP y las características morfológicas. Inmunofenotipo de la CP determinado por citometría de flujo multiparamétrica para demostrar la clonalidad de las CP presentes en la médula ósea. Las CP en el MM y en otras gammapatías monoclonales expresan un fenotipo característico que facilita establecer el diagnóstico diferencial

con otras entidades. El estudio citogenético/ FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) es fundamental para la estratificación pronóstica del MM. Se requiere la purificación de las CP y debe incluir las alteraciones t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), del(1p) y ganancia 1q. Los paneles de expresión genética o paneles mutacionales pueden proporcionar información pronóstica, pero no están disponibles como técnicas de rutina en la gran mayoría de centros.

- Estudio de la enfermedad ósea: las técnicas de imagen de elección son la tomografía computarizada (TC) de cuerpo entero a bajas dosis o la resonancia magnética (RMN) de cuerpo entero o la tomografía por emisión de positrones combinada con la TC (PET-TC). En 2019 el IWMG publicó un documento de consenso en relación a las técnicas de imagen recomendadas en la diferentes gammapatías (48) La RMN de cuerpo entero está indicada en el diagnóstico de plasmocitomas paravertebrales o enfermedad oculta, en particular en pacientes con plasmocitoma solitario. También permite evaluar el tipo de infiltración de médula ósea (difuso, abigarrado o con lesiones focales) y la presencia de lesiones focales, que es relevante en el mieloma quiescente. El PET-TC es la técnica de elección para evidenciar la enfermedad extramedular oculta o identificar lesiones líticas difíciles de evaluar o no visibles por radiología convencional permitiendo además valorar la respuesta tras el tratamiento. En caso de sospecha de compresión medular la RMN de columna vertebral es la técnica de elección.

- Hemograma y frotis de sangre periférica, determinación de la creatinina en suero y su aclaramiento y los niveles de calcio; como marcadores de lesión orgánica (criterios CRAB). El estadiaje de la enfermedad requiere la cuantificación de la albúmina, la β_2 microglobulina y la LDH. La β_2 microglobulina es el marcador más fiable de cuantificación indirecta de masa tumoral y la LDH se asocia a enfermedad agresiva.

Antes del 2014 los criterios diagnósticos definitivos de MM se basaban exclusivamente en la cantidad de CP clonales en la médula ósea, cantidad de componente monoclonal y la presencia de daño orgánico o CRAB. En el 2014 el IMWG actualizó los criterios diagnósticos de MM incorporando 3 biomarcadores de malignidad: CP clonales a la médula ósea $\geq 60\%$, ratio de cadenas ligeras libres en suero (afecta/no afecta) ≥ 100 y la detección de >1 lesión focal (tamaño > 5 mm) por RMN. Cada uno de estos biomarcadores se asocia con un riesgo de progresión a MM a los 2 años superior al 80%; por lo que se están identificando MQs de alto riesgo inminente de desarrollar MM y por ello su presencia determina iniciar tratamiento aún en ausencia de daño orgánico. Así se estableció el concepto evento definitorio de MM que incluye tanto a la presencia de algún criterio CRAB como a uno de estos nuevos biomarcadores (12).

- Criterios diagnósticos de MM (IMWG 2014):

1. Plasmocitosis clonal en médula ósea $\geq 10\%$ o plasmocitoma demostrado por biopsia tisular junto con:

2. Evento definitorio de mieloma:

2.1. Daño orgánico (CRAB):

- Hipercalcemia $> 2,75$ mmol/l (> 11 mg/dl)
- IR: CrCl < 40 ml/min o creatinina sérica > 2 mg/dl (> 177 μ mol/l)
- Anemia: Hb < 10 g/dl o > 2 g/dl por debajo del límite inferior de la normalidad
- Lesiones óseas: 1 o más lesiones osteolíticas en RC, RM, TC o PET-TC

2.2. Biomarcador de malignidad:

- Plasmocitosis clonal medular $\geq 60\%$
- Ratio CLLs (i/ni) ≥ 100
- > 1 lesión focal (≥ 5 mm) en RMN

1.2.5 Escalas de estadificación

El estadiaje nos permite una valoración categórica de la masa tumoral y tiene interés pronóstico. En 1975 se introdujo el primer sistema de estratificación de la enfermedad con la escala de estadiaje de Durie y Salmon (49) (tabla 3), pero a causa de sus limitaciones, especialmente por la subjetividad a la hora de categorizar las lesiones óseas, en el 2005 el IMWG propuso una nueva clasificación basada en los niveles de β 2microglobulina y albúmina con valor pronóstico independiente llamada ISS (*International Staging System*) (50) (tabla 4). Este índice se generalizó por su simplicidad y fácil aplicación permitiendo mejorar la estimación de la supervivencia de los pacientes en el momento del diagnóstico.

Tabla 3. Estadios de Durie y Salmon

I	Todos los siguientes:	- Hemoglobina > 100 g/l - Calcio sérico corregido < 12 mg/dl - RX seriada ósea normal o detección de plasmocitoma solitario - Componente M: IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l, BJ < 4 g/24 h.
II	Sin criterios I ni II	
III	Cualquiera de los siguientes:	- Hemoglobina < 85 g/l - Calcio sérico corregido > 12 mg/dl - Lesiones líticas en > 2 áreas óseas - Componente monoclonal: IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l, BJ > 12 g/24 h.
Subclasificación	A: Creatinina sérica < 2 mg/dl B: Creatinina sérica > 2 mg/dl	

RX: radiografía; BJ: proteína de Bence-Jones

Tabla 4. Estadios del International Staging System (ISS)

		Mediana de supervivencia (meses)
ISS I	B2M < 3.5 mg/l y albúmina ≥ 3.5 g/dl	62
ISS II	B2M < 3.5 mg/L y albúmina < 3.5 g/dL, o B2M 3.5–5.5 mg/L independientemente de la albúmina	44
ISS III	β2micoglobulina ≥ 5.5 mg/L	29

B2M: β2-microglobulina

El estudio citogenético constituye uno de los factores pronóstico más importante en los pacientes con mieloma múltiple. Es por ello que el IMWG desarrolló en el 2015 el modelo pronóstico denominado ISS revisado (R-ISS, *Revised-International Staging System*) que incorpora el estudio FISH y la determinación de LDH. Este modelo permite la identificación de 3 grupos pronósticos con supervivencia global a 5 años del 82%, 62% y 40%, respectivamente (51)(tabla 5). La principal limitación de este sistema se debe a que un 62% de los pacientes fueron clasificados como riesgo intermedio (R-ISS II), incluyéndose posiblemente pacientes con diferente riesgo de progresión.

Tabla 5. Estadios del Revised International Staging System (R-ISS)

Estadio	
I	ISS I + LDH normal + citogenética de riesgo estándar *
II	No cumple criterios de R-ISS I ni R-ISS III
III	ISS III + citogenética de alto riesgo ** y/o LDH alta

*Citogenética de riesgo estándar: ausencia de del (17) i/o t(4;14) i/o t(14;16).

**Citogenética de alto riesgo: presencia de del (17p) i/o t(4;14) i/o t(14;16).

LDH alta: LDH sérica superior al límite de la normalidad

Recientemente, D'Agostino et al. validó el nuevo R2-ISS basado en datos del proyecto HARMONY donde se identificaron 4 grupos de riesgo: R2-ISS I (19.2%), II (30.8%), III (41.2%) y IV (8.8%), redirigiendo el grupo de riesgo intermedio R-ISS II en dos estadios diferentes consiguiendo ser más preciso pronósticamente. Las variables con mayor impacto en la PFS y OS fueron el ISS, del(17p), LDH, t(4;14) y 1q+, a cada variable de riesgo se le asignó un valor en función de su impacto en la OS (ISS-III 1.5, ISS-II 1, del(17p) 1, LDH elevada 1; t(4;14) 1, y 1q+ 0.5 puntos) (52).

1.2.6 Factores pronósticos

El MM es una enfermedad muy heterogénea tanto en su biología como en su comportamiento clínico, por lo que son numerosos los factores que impactan en el pronóstico de la enfermedad. Aunque se han definido factores clínicos pronósticos que dependen del paciente (edad, comorbilidades, fragilidad) y otros de la enfermedad (estadios que cuantifican la cantidad de tumor, la hipercalcemia, la insuficiencia renal, la hipoalbuminemia, el tipo de componente monoclonal, la morfología plasmablastica, la β 2microglobulina, la LDH y aumento de la PCR), en la actualidad los que son considerados de mayor importancia son los factores pronósticos relacionados con la biología de la enfermedad, en especial al perfil citogenético y molecular de la CP. Destacar que otro de los factores fundamentales relacionados con el pronóstico de los pacientes con MM es la respuesta alcanzada al tratamiento.

El consenso del IMGW clasifica como citogenética de alto riesgo la delección de 17p o las translocaciones del gen IgH con los genes MMSET/FGF3 o MAF en la t(4;14) y la t(14;16) respectivamente; posteriormente se incluyeron las anomalías del cromosoma 1 (53) (tabla 6). Walker et al. mediante el análisis del genoma identificó un MM de muy alto riesgo, los llamado *doble hit*, que incluyen la inactivación bialélica de TP53 o el ISS III junto con amplificación de CKS1B (1q21) (54).

Tabla 6. Principales alteraciones citogenéticas y su impacto pronóstico

Alto riesgo	Prevalencia	Riesgo estándar	Prevalencia
t(14;16)	2-3%	t(11;14)	15%
t(14;20)	1%	t(6;14)	5%
t(4;14)	15%	Hiperploidia	50%
del(17/17p)	10%		
Ganancia (1q)	35-40%		
Pérdida (1p)	10%		

Respecto al análisis del perfil de expresión génica (GEP), esta técnica se ha implementado como una potente herramienta de estratificación pronóstica aunque tiene una serie de inconvenientes que dificulta su incorporación en la práctica clínica como el hecho de que no existe un GEP estándar y su reproductibilidad es limitada por su dificultad logística y técnica (55).

La respuesta al tratamiento constituye otro de los factores pronósticos más relevantes en el MM. Los enfermos que alcanzan la repuesta completa (RC) o estricta, definida por los criterios del IMWG (56,57) logran las mejores supervivencias libres de progresión y globales (58,59). El desarrollo de técnicas con mayor sensibilidad para detectar enfermedad mínima residual (EMR) permiten discriminar poblaciones de pacientes con comportamiento clínico y pronóstico diferente. La EMR puede determinarse mediante citometría de flujo (CMF), la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa basada en la secuencia de oligonucleótidos alelo-específica de la Ig (ASO-PCR) y la secuenciación masiva (NGS) del reordenamiento VDJ. Diferentes estudios demostraron con gran evidencia que alcanzar una EMR negativa se asocia a una mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global con independencia de haber recibido un trasplante o del riesgo citogenético (59-61).

Aunque todavía no hay consenso sobre el mejor momento para su monitorización y con qué frecuencia se ha de determinar, probablemente la EMR negativa mantenida en el tiempo (≥ 12 meses) es el mejor criterio indirecto de supervivencia de larga duración (57,62). No obstante, la monitorización de la EMR en la médula ósea puede fallar para detectar enfermedad extramedular y puede ser falsamente negativa por infiltración parcheada de la médula ósea (63). El PET/TC con F18-FDG es una técnica de imagen sensible que permite determinar la actividad metabólica de las lesiones focales extramedulares y en MO. Diversos estudios confirman que el

PET/TC al diagnóstico y en la evaluación posterior al tratamiento proporciona información pronóstica (64,65).

En base a los resultados de estos estudios, el IMWG en el año 2011 incorpora los criterios de RC inmunofenotípica o molecular; y en 2016 se incluye los criterios de EMR negativa mediante CFM y técnicas de secuenciación (57,66) y como novedad se incorpora el uso de técnicas de imagen para evaluar el grado de enfermedad residual mediante PET-TAC (65).

1.3. EL SISTEMA INMUNE EN EL MIELOMA MÚLTIPLE

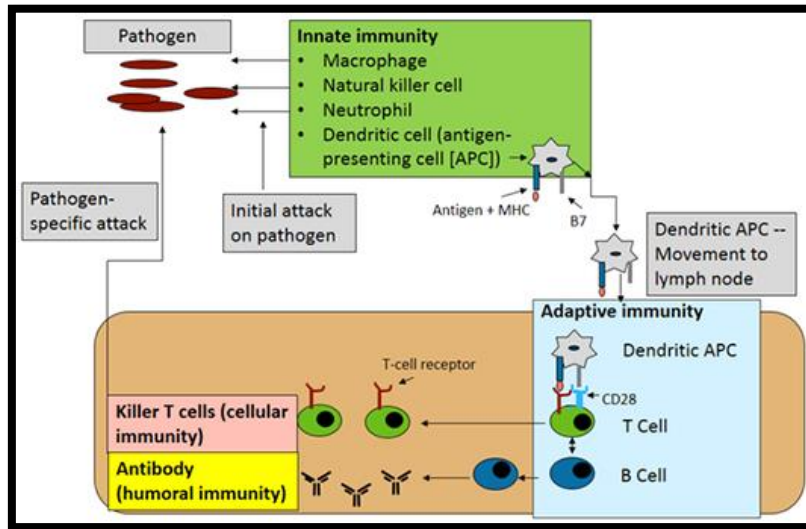
El MM se caracteriza por un estado de inmunosupresión progresivo en el cual destaca la inmunodeficiencia humoral y celular, el incremento de células T y B reguladores y células mieloides supresoras de la médula ósea. Esta condición contribuye a crear un ambiente inmunosupresor que proporciona una ventaja proliferativa a las CP (68,69). Para una mejor comprensión de estos mecanismos a continuación se detalla el funcionamiento de la respuesta inmunitaria y como actúa frente a los tumores incluido el MM.

1.3.1. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa

El sistema inmunitario (SI) lo constituye un conjunto de estructuras y procesos cuya función es mantener la integridad del organismo y defenderlo de las amenazas externas causadas por agentes infecciosos exógenos así como de eliminar células tumorales y senescentes (70). Una característica distintiva del SI es la capacidad que tiene para discriminar entre lo propio y lo extraño, de mantener la tolerancia frente a antígenos propios, así como de generar una respuesta inmune eficaz contra patógenos y células malignas. La tolerancia y la inmunidad es dinámica y la pérdida de dicha tolerancia desencadena eventos adversos tales como infecciones, tumores malignos o enfermedades autoinmunes (71).

El SI se ha clasificado tradicionalmente en SI innato y SI adaptativo. El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores y el cáncer. Hay una serie de células que componen el sistema inmunitario innato, como son los neutrófilos, macrófagos, células NK (*natural Killer*) que eliminan directamente a otras células y las células dendríticas que captan antígenos y presentan los péptidos antigénicos a las células del SI adaptativo, iniciando el segundo componente del SI (figura 2).

Figura 2. Sistema inmunitario innato y adaptativo



Adaptado de Akira S. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Oct 12;366(1579):2748-55 ⁽⁶⁸⁾. Este esquema muestra cómo el sistema inmunitario puede combatir a un invasor extraño. Inicialmente, los marcadores del patógeno son reconocidos por las células del sistema inmunitario: los macrófagos, las células NK, los neutrófilos. Los antígenos liberados por estos patógenos destruidos son recogidos por las células dendríticas, que presentan estos antígenos en los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides a las células del SI adaptativo, que es el segundo componente del SI.

1.3.2. Inmunidad innata

Los mediadores de la respuesta innata representan la primera línea de defensa frente a cualquier agresión, se caracteriza por carecer de memoria inmunológica y por poseer mecanismos de reconocimiento de diversidad limitada (72). Lo conforman las barreras físicas, como la piel y mucosas, células con función fagocítica (polimorfonucleares y macrófagos) o citotóxica (células NK y linfocitos CD8+) y factores solubles como el sistema del complemento, citoquinas y reactantes de fase aguda.

La respuesta innata es constitutiva, los mecanismos de defensa están presentes antes de la exposición al microorganismo por lo que es una respuesta rápida y eficiente. Este tipo de respuesta implica por lo general un proceso inflamatorio citotóxico. Destacar el papel de las células NK que pueden discriminar entre células infectadas o tumorales y células sanas sin necesidad del antígeno y las células dendríticas que captan antígenos y presentan péptidos antigénicos a otras células del sistema inmunitario. Estas células reconocen patrones moleculares conservados en microorganismos invasores para desencadenar una respuesta inmune. Destruyen a los patógenos y presentan los antígenos a las células del SI adaptativo

para iniciar el segundo componente del sistema inmunitario llamado sistema inmunitario adaptativo (70).

1.3.3. Inmunidad adaptativa

El SI adaptativo es el componente de memoria especializado del sistema inmunitario y se compone de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB). A diferencia de la RI innata, existe una gran especificidad antigénica generada a partir del receptor de células T (TCR, T cell receptor) y el receptor de las células B (BCR, B cell receptor) que reconocen péptidos antigénicos muy específicos. La respuesta inmune adaptativa presenta memoria inmunológica lo que garantiza una respuesta rápida y efectiva y con mayor capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas. La inmunidad adaptativa posee dos tipos de respuesta inmunes: inmunidad humoral e inmunidad celular (73).

La inmunidad humoral es un proceso donde el LB maduro después del reconocimiento del antígeno a través de su receptor de membrana (BCR) se diferencia en células B de memoria y células plasmáticas para generar los anticuerpos (las Igs). Cada célula plasmática está programada para producir Igs de una sola especificidad.

Para que la respuesta inmune adaptativa sea eficaz es muy importante que el LT se active y diferencie a una célula efectora (LT CD4+). La activación del LT tiene lugar en la llamada sinapsis inmunológica y consta de 2 pasos:

El primer paso o también llamada señal 1 comienza con la presentación del antígeno por parte de una célula presentadora de antígenos (CPA) que ofrece un péptido anclado a una molécula de histocompatibilidad (HLA) interaccionando con el receptor TCR del LT.

El segundo paso o señal 2 es independiente del receptor antigénico y procede de moléculas de membrana coestimuladoras cuyos ligandos se encuentran en la membrana de los LT. Concretamente por la interacción entre la molécula CD28 presente en la superficie de los LT con las moléculas CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) presentes en las CPA. La segunda señal es esencial para que el LT se active y pueda diferenciarse a LT efector dando lugar a la respuesta inmune.

La identificación de vías adicionales de coestimulación como CD154-CD40, CD11A-CD54, CD18-CD54 y CD2-CD58 ha validado y extendido el modelo de dos señales de activación de las células T (74) (figura 3A). Una vez activado el LT, como consecuencia de la señal 1 y señal 2, se desencadena la producción de interleucina 2 (IL-2). La producción simultánea de la IL-2 y un componente de su receptor de alta afinidad (IL-2R-alfa o CD25) inicia un ciclo de retroalimentación positiva que es importante para la proliferación de LT.

Como consecuencia de este fenómeno de amplificación de la respuesta se reclutan más células efectoras que activarán la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B. Una vez activados los LT tiene lugar la fase efectora en los tejidos tumorales donde los LT citotóxicos activados interaccionan con las células cancerosas (75).

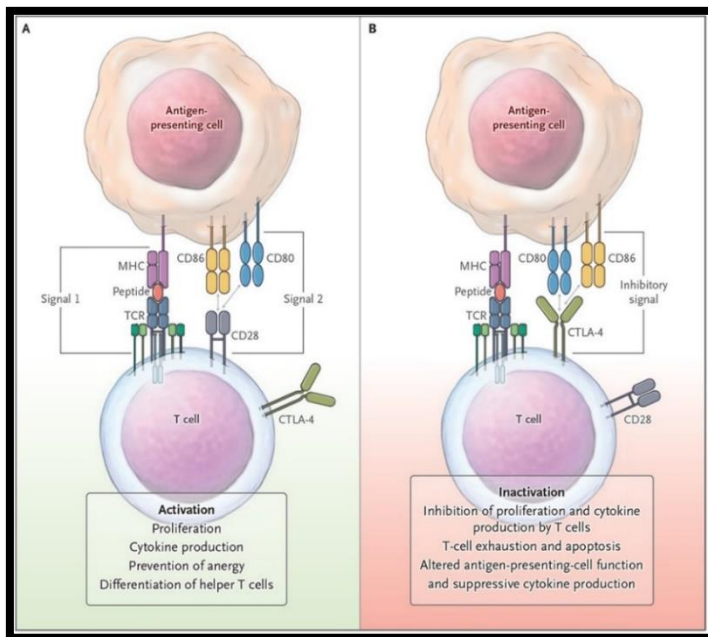
Tras eliminarse el antígeno se produce una fase de contracción de la respuesta inmune en donde la mayor parte de los LT efectores mueren por apoptosis. Los LT supervivientes denominados LT memoria permanecen con la misma especificidad antigénica de los LT de los que proceden y son de larga vida media. Estas células de memoria tienen una mayor densidad de moléculas de adhesión y consiguen adquirir funciones efectoras en poco tiempo lo que le permite responder rápidamente a patógenos previamente expuestos. No obstante, puede que no se produzca la respuesta inmune y el LT se inactive o se elimine dando lugar a la tolerancia (75).

Una vez activado el LT expresa en su membrana receptores inhibidores que inician la transmisión intracelular de señales negativas para frenar la respuesta inmune como mecanismo de regulación y así evitar que se produzca el daño de tejidos sanos o fenómenos autoinmunes por sobreactivación de la respuesta inmune. El SI mantiene un preciso equilibrio entre activación y tolerancia. A las pocas horas de la activación del LT se inician señales coinhibidoras a través de la molécula CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) expresada en la membrana del LT activado, alcanzando su pico de producción a los 2 o 3 días.

La inhibición de las señales coestimuladoras se produce porque la molécula CTLA-4 tiene una afinidad mucho mayor por CD80 que la molécula CD28. De forma que CTLA-4 compite con ventaja por los ligandos CD80/CD86 desplazando a la molécula co-estimuladora CD28. Además, CTLA-4 tiene la capacidad de secuestrar los ligandos B7 de las células presentadoras de antígenos a través del mecanismo de transendocitosis evitando que se encuentren disponibles en la sinapsis inmunitaria, atenuando la activación de las células T.

No conocemos completamente el mecanismo de transducción de señales de CTLA-4, aunque algunos estudios sugieren que la cascada de señalización podría iniciarse con la desfosforilación de quinasas o sustratos asociados al TCR (76). La consecuencia de esta señal se traduce en limitación de la producción de IL-2, reducción de la proliferación y supervivencia de la célula T (figura 3B) (77).

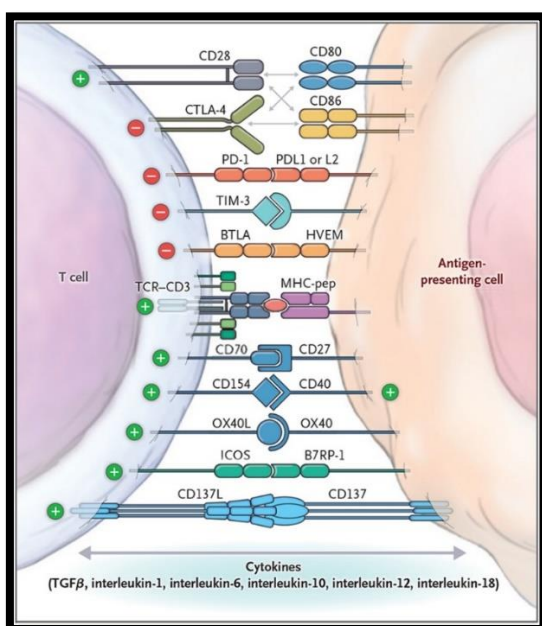
Figura 3A. Activación del linfocito T. **Figura 3B.** Señal coinhibidora del linfocito



Bluestone JA. *N Engl J Med* 2020.; 383:1156-66 (73)

El equilibrio entre señales de coestimulación y de inhibición determinaran la funcionalidad de las células T durante la respuesta inmune y la tolerancia. En este sentido, tan importante son las moléculas inhibitoras como las moléculas coestimuladoras (figura 4) en el control de la respuesta inmune. El bloqueo de los puntos de control inmunológico constituye una estrategia eficaz para mejorar la actividad efectora de los LT antitumorales.

Figura 4. Vías de coestimulación y de inhibición del linfocito T



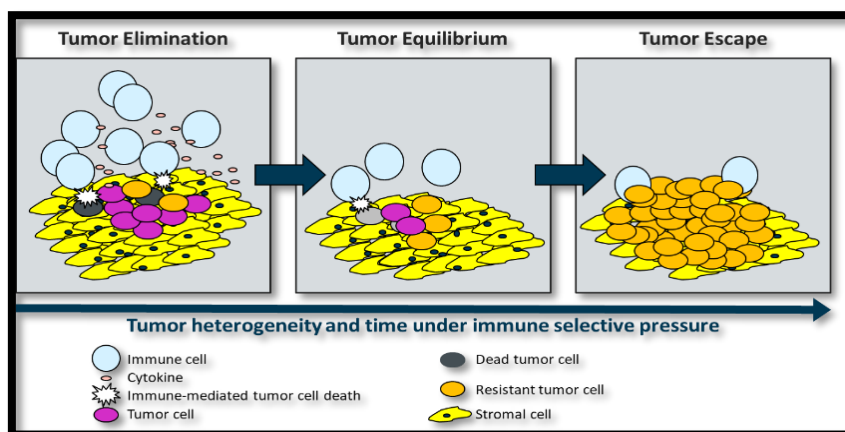
Bluestone JA. *N Engl J Med* 2020.; 383:1156-66 (73)

1.3.4. Inmunovigilancia y inmunotolerancia frente a los tumores

El sistema inmunitario está preparado para identificar y eliminar células dañadas que han escapado a los mecanismos supresores de tumores antes de que puedan desarrollar un cáncer, es lo que se conoce como inmunovigilancia. Alrededor de este fenómeno se desarrolló la hipótesis de la inmunoección del cáncer que propone que los eventos patogénicos originados de forma temprana por células pre-cancerosas pueden ser eliminados por el sistema inmune a no ser que esas células evolucionen para tener la habilidad de escapar de él (78,79) (figura 5). Es la llamada teoría de las tres "E" que propone tres etapas: eliminación, equilibrio y escape.

1. Eliminación o lo que es lo mismo inmunovigilancia: En esta etapa inicial, el sistema inmunológico innato y adaptativo, identifican y eliminan de forma satisfactoria a las células neoplásicas. Un tumor sumamente inmunogénico en un individuo inmunocompetente conduce a una óptima estimulación del sistema inmunitario innato, con una elevada producción de citosinas inmunoestimulantes, inflamación aguda, y activación de gran número de linfocitos T y B, eliminando al tumor que emerge.
2. Equilibrio: Es un equilibrio dinámico. El SI no puede eliminar por completo a todas las células neoplásicas, pero si puede controlar hasta cierto punto su crecimiento. En esta etapa, se produce la edición inmune del tumor como resultado de las interacciones entre tumor-sistema inmunitario ya que durante un periodo largo de latencia se puede crear tolerancia inmunológica frente a antígenos tumorales o nuevas modificaciones en la célula tumoral que permitan su adaptación.
3. Escape: como resultado de la presión selectiva del SI se produce selección de células menos inmunogénicas y con capacidad para inducir mecanismos inmunosupresores que favorecen la expansión de las células tumorales y su escape del SI. En esta fase el SI ya no es capaz de controlar la proliferación de las células neoplásicas.

Figura 5. Proceso de inmunoección del cáncer



Adaptado de Dunn GP et al. *Nat Immunol* 2002 (78) y Scrieber R et al *Science* 2011 (79)

Los LT al reconocer a la célula tumoral, a través del complejo HLA-TCR, se activan y se produce la destrucción de las células cancerosas. Este proceso se conoce como ciclo inmune frente al cáncer y puede dividirse en 7 pasos (80) (figura 6):

Paso 1: las células tumorales liberan los neoantígenos fabricados durante la oncogénesis.

Paso 2: Las CPA capturan los antígenos tumorales y los presentan a los LT que están en los ganglios linfáticos.

Paso 3: Los LT se activan por la presentación del antígeno.

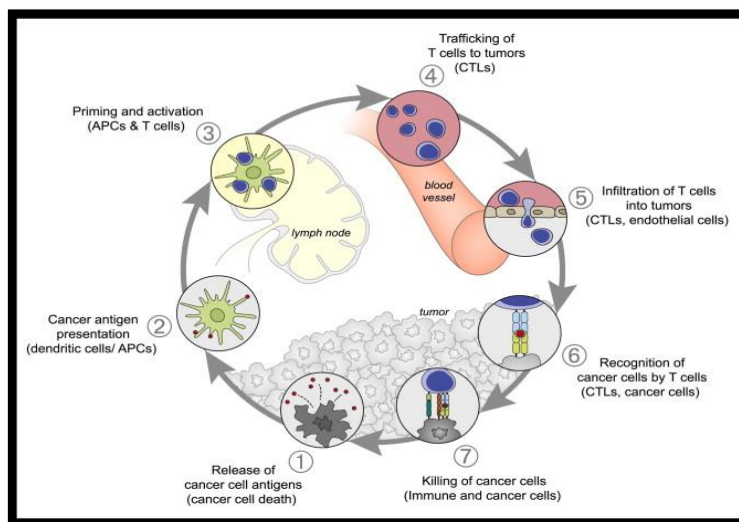
Paso 4: Los LT activados viajan desde los ganglios hasta la localización del tumor a través de los vasos sanguíneos.

Paso 5: infiltración de los LT activados en el tumor.

Paso 6: Reconocimiento de las células tumorales por el LT que ha sido activado por los antígenos que han liberado estas mismas.

Paso 7: Los LT destruyen las células tumorales.

Figura 6. Ciclo inmune contra el cáncer

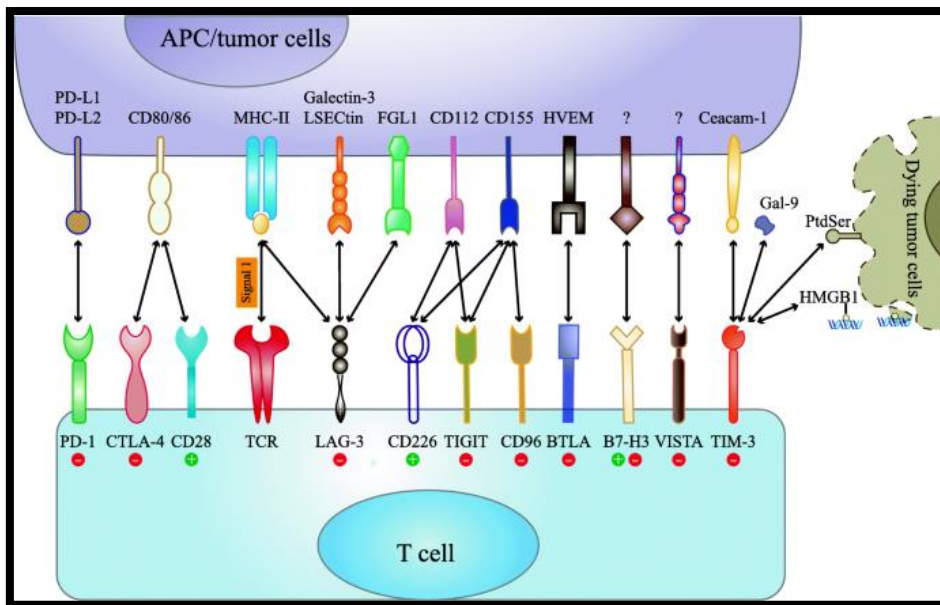


APCs: células presentadoras de antígenos; CTLs: linfocitos T citotóxicos
 Chen DS et al. *Immunity* 2013 July 25;39 (76)

La eliminación de las células tumorales es solamente uno de los pasos del ciclo inmune, el cual gestiona un delicado equilibrio entre el reconocimiento de lo extraño y la prevención de la autoinmunidad. Las células tumorales utilizan diversos mecanismos supresores capaces de evadir la inmunovigilancia al impedir el reconocimiento inmune o discapacitando a las células T efectoras. Entre estos mecanismos están las alteraciones de los componentes implicados en el reconocimiento del antígeno, los defectos de señalización proximal del TCR, secreción de factores inmunosupresores y proapoptóticos, activación de vías de regulación inhibitorias y reclutamiento específico de células reguladoras (80) (81).

Destacar el papel de las moléculas reguladoras de los puntos de control inmunitario, en especial las que tienen un efecto inhibitorio (ICIs) por su aplicabilidad para el tratamiento de los tumores. En condiciones normales las moléculas inhibitorias previenen la hiperreacción del SI evitando el daño de los tejidos sanos y los fenómenos autoinmunes. Desafortunadamente, también las células tumorales pueden sobreexpresarlas para escaparse de la inmunovigilancia. En este sentido bloquear con anticuerpos los puntos de control de la respuesta inmune conllevaría revertir el estado de agotamiento de las células T efectoras y de esta manera revitalizar su función antitumoral. Esta es la base de la inmunoterapia que ha revolucionado en los últimos años el tratamiento de un gran número de cánceres. Son varias las moléculas reguladoras de los puntos de control inmunitario que están anormalmente expresadas en los tumores, las más conocidas son CTLA-4 y PD-1/PD-L1 (*programmed death 1* y *programmed death-ligand 1*) aunque también están identificadas otras moléculas como LAG-3 (*lymphocyte activation 3*), TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*), TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*) y BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) (81,82) (figura 7).

Figura 7. Moléculas reguladoras de los puntos de control inmunológico y sus ligandos



Qin, S. et al. *Mol Cancer* 18, 155 (2019) (83)

1.3.5. Inmunidad antitumoral en el mieloma múltiple

Como anteriormente hemos descrito el escape inmunológico y la alteración de la vigilancia inmune son características identificativas del cáncer. El mieloma múltiple representa un ejemplo claro de vigilancia inmunológica disfuncional caracterizada por la alteración de la producción de anticuerpos, desregulación del compartimento de las células T y células NK, interrupción de la maquinaria de presentación de antígenos, regulación positiva de ligandos de superficie inhibidores y reclutamiento de células inmunosupresoras (84).

Son múltiples los mecanismos por los cuales las células del MM se escapan de la inmunovigilancia durante el ciclo inmune contra el tumor, como a continuación se describen (85) :

1. Linfocitos B: Disminución cuantitativa de los linfocitos B, en particular los linfocitos naive y transicionales a diferencia de los linfocitos B de memoria que están aumentados. La población de células B está muy comprometida con el equilibrio desplazado hacia una alta proliferación de células plasmáticas tumorales. Como resultado de la disminución de los linfocitos B la producción de inmunoglobulinas está reducida es lo que conocemos como inmunoparesia (86).
2. Compartimento de las células T: La respuesta inmune del LT es defectuosa debido a alteraciones cuantitativas y funcionales. Hay una disminución de los LT CD4+ con inversión de la ratio CD4+/CD8+. El perfil fenotípico de los LT colaboradores Th1/Th2 está alterado a favor de una respuesta inmune de Th2 por lo que aumenta la producción de las citoquina IL-10 y IL-4 (87,88). La producción de TGF- β y IL-6 por las células MM y células estromales de la médula ósea induce la diferenciación de LT naive a linfocito T helper17 (Th17). Los linfocitos Th17 son un subtipo de LT CD4+ que secretan citoquina IL-17 y IL-22. La expansión de linfocitos Th17 junto con los niveles elevados de IL-17 producen supresión de la respuesta inmune protegiendo a la célula MM del ataque de los linfocitos citotóxicos y promoviendo su crecimiento y supervivencia (89).
3. Células NK: están inhibidas por disminución de la expresión de receptores activadores y en paralelo por la sobreexpresión de PD-1 (90,91).
4. Reclutamiento de células reguladoras inmunosupresoras:
 - Las células Tregs: Son un subtipo de LT CD4+ que expresa el fenotipo CD25+/CD127bajo/FoxP3+. En el MM están cuantitativamente aumentadas contribuyendo al estado de inmunosupresión. Su proliferación y su supervivencia depende de concentraciones elevadas de APRIL e IDO secretadas principalmente por las células mieloides activadas y los osteoclastos (92) en la médula ósea. Los linfocitos Tregs secretan IL-10 y TGF- β conduciendo al LT a un estado

- de anergia. El crecimiento de la célula mielomatosa es favorecido por IL-17A derivada de las células Th17 y por la producción paracrina IL-6 (93).
- Las células supresoras de estirpe mieloide (MDSCs): Están aumentadas, a través de la liberación de citoquinas inflamatorias también son reclutadas potenciando el microambiente permisivo y favoreciendo la evasión de la célula tumoral del control inmune. Son funcionalmente y fenotípicamente diferentes en pacientes con MM comparado con pacientes con GMSI o individuos sanos. Las células MDSCs de estirpe granulocítica son las que más predominan tanto en sangre periférica como en médula ósea y su acción inmunosupresora se ejerce mayoritariamente sobre el LT y células NK (94,95).
 - Linfocitos B reguladores: son linfocitos B que expresan el fenotipo CD19+/CD24 alto/CD38 alto. Se ha observado que aumentan en la transición de MGUS a MM. Son linfocitos B reguladores que pueden suprimir la lisis tumoral mediada por células NK por mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y pueden producir IL-10 (96).
5. La presentación de antígenos y la activación de los LT contra las células tumorales también está alterada. Las células dendríticas son disfuncionales especialmente en su función de célula presentadora de antígenos y en su relación con los LT (97). Hay una disminución del número de precursores de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides en sangre. La interacción con el LT permite a estas células secretar IL-6 y el enzima inmunosupresor indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) que provoca la anergia de las células T activadas y la diferenciación hacia Treg supresora CD4+/CD25 alto/ FOXP3+ (43). Además, hay menor expresión del complejo HLA tipo II y una disminución de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD80 reduciendo su capacidad para presentar antígenos (98).
6. Sobreexpresión de las moléculas inhibitoras de los puntos de control inmunitarios (ICIs). Lo cual deriva en anergia y agotamiento de las células T. A continuación, se desarrolla con más profundidad este mecanismo de inmunoevasión.

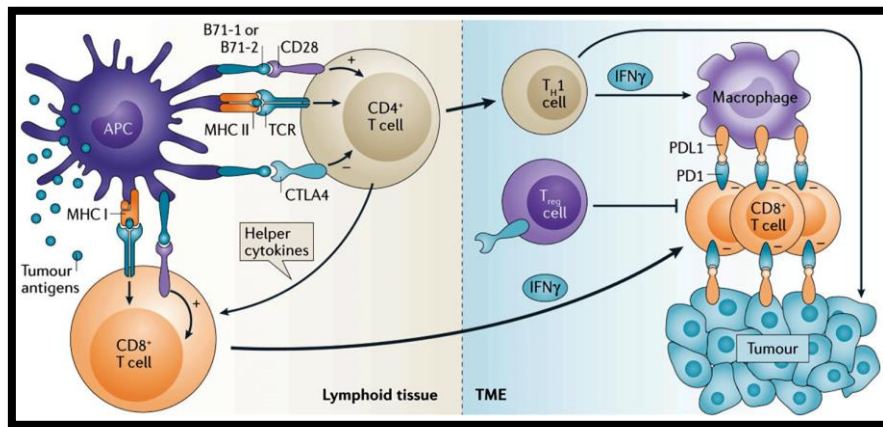
1.3.6. Moléculas inhibitoras de los puntos de control inmunitario en el mieloma múltiple

La respuesta inmune mediada por células T está regulada por un equilibrio entre señales estimuladoras e inhibitoras. Los puntos de control inmunitario son las vías inhibitorias que equilibran fisiológicamente las vías coestimuladoras, en el cual participan receptores inhibidores y sus respectivos ligandos. Las células

plasmáticas del MM pueden potenciar la expresión de moléculas ICIs para evitar el reconocimiento inmunitario y su eliminación.

Las moléculas ICIs más relevantes y conocidas en el MM son CTLA-4 y PD-1. Son dos receptores expresados en las células T activadas que desencadenarán vías inhibitoras de la función del LT, LB y células NK. CTLA-4 se expresa en las células T durante las primeras etapas de su activación. La molécula CTLA-4 interacciona con las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 que están expresadas en la CPA inhibiendo la producción de linfocitos T efectores. Por otro lado, PD-1 se expresa en el LT inmediatamente después de la activación de la vía del TCR silenciando señales de activación y proliferación (99) (figura 8).

Figura 8. CTLA-4 y PD-1 inhibidores de la respuesta inmune antitumor



Topalian SL et al. *Nat Rev Cancer*. 2016 May;16(5) (100)

En referencia al MM y la vía PD-1/PD-1-L, se ha descrito que las células plasmáticas del MM expresan anormalmente PD-L1 a diferencia de los individuos sanos, siendo la expresión más intensa en el MM recaído/refractario. Niveles elevados de PD-L1 soluble se asocian con peor pronóstico (101,102) y parece que las células tumorales muestran mayor resistencia a los fármacos (103) además de mayores niveles de proteínas antiapoptóticas (104). Las células dendríticas plasmocitoides también expresan en su superficie altos niveles de PD-L1 manteniendo el microambiente inmunosupresor del MM. Por otro lado, también se observa sobreexpresión de PD-1 en las células T en comparación con los individuos sanos (91,105). Lo mismo sucede con las células NK que también expresan altos niveles de PD-1 (88,89).

Paralelamente, CTLA-4 es expresado anormalmente en las CP del MM y se ha asociada con progresión de la enfermedad ya que la intensidad de expresión es mayor en el MM activo comparado con las GMSI. Se ha descrito que la sobreexpresión de CTLA-4 en la médula ósea es un signo de acumulación LT regs y producción de citoquinas inmunosupresoras (106,107).

Otra molécula ICIs de interés en el MM es LAG-3, también llamada CD223. Es una proteína estructuralmente homóloga a CD4 presente en los LT CD4+, LT CD8+ y células NK. El ligando de LAG-3 es HLA-II, que a su vez es el ligando canónico de CD4, en este sentido LAG-3 compite con CD4 y lo hace con mayor afinidad. Su mecanismo de acción es muy similar a otros ICIs ya que se expresa una vez activado el linfocito T. La interacción de LAG-3 con HLA-II produce inhibición de las señales de proliferación, producción de citoquinas e induce activación de los LT reg estimulando su función inmunosupresora. En el MM, la expresión de LAG-3 está aumentada en el LT y además se ha observado que las CP del MM expresan la molécula galectin-3 (GAL-3), otro ligando de LAG-3, contribuyendo más a la inmunosupresión (108,109).

TIGIT es otra molécula ICIs, es un receptor coinhibidor expresado en el LT que compite con CD226 (DNAM-1) en la unión con los ligandos CD155 y CD112 ubicados en la superficie de las CP tumorales. La interacción de TIGIT con sus ligandos activa señales intracelulares coinhibidoras suprimiendo directamente la señal TCR y la función del LT efector. TIGIT es frecuentemente sobreexpresado en las células T CD8+ de la médula ósea de pacientes con MM en comparación con individuos sanos. Los LT que expresan esta molécula se asocian a fenotipos de LT agotado. Este proceso es parcialmente mediado por células dendríticas tolerogénicas al interactuar con TIGIT y secretan anormalmente IL-10. (110,111).

TIM-3 es otra molécula expresada en los LT y que actúa como ICIs regulando negativamente la actividad de las células NK a través de la vía de señalización de NF- κ B con lo cual se regula positivamente la supervivencia de la CP mieloma. Los LT CD8+ con expresión de TIM-3 presentan una marcada pérdida de función y con frecuencia también presentan co-expresión de PD-1 (112,113).

La molécula CD200 junto con su receptor CD200R cumplen múltiples funciones regulando la inflamación y promoviendo las actividades inhibitoras del sistema inmune. Juegan un papel importante en el control de la autoinmunidad, la inflamación, las actividades inhibitoras y la hipersensibilidad. CD200 se expresa en superficie en células de extirpe mieloide como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos, y también en linfocitos B y linfocitos T activados (114). La interacción CD200-CD200R inhibe la activación de la respuesta inmune con el reclutamiento de RasGAP y contribuye a la inhibición de las células efectoras. La activación de CD200R estimula la diferenciación de los linfocitos T a linfocitos Treg, aumenta la actividad de la indoleamina 2,3-dioxigenasa, modula el entorno de citocinas de un patrón Th1 a uno Th2 y facilita la síntesis de las IL-10 y TGF- β antiinflamatorias. Es una molécula inmunosupresora que se requiere para mantener la auto-tolerancia, su unión con CD200R conduce a la secreción inadecuada de citoquinas por parte de algunos macrófagos como IL-13, TNF α , INF α e IL-17; regulando negativamente a los LT citotóxicos (115,116). En el MM, niveles

altos de expresión de CD200 en la CP se han asociado con peor pronóstico, y se ha descrito que inducen la generación de células dendríticas tolerogénicas y como consecuencia la inducción de LT regs que inhiben a los LT citotóxicos (117–119).

1.3.7. Polimorfismos de genes reguladores de los puntos de control inmunitario en el mieloma múltiple

Las variables genéticas más frecuentes en la población general son los polimorfismos genéticos, presentes en al menos el 1% de los individuos de una población. Son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma raza.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* SNPs) consisten en la sustitución de un nucleótido por otro y pueden dar lugar a variaciones en la secuencia del ADN. Se localizan por todo el genoma y típicamente son bialélicos. Algunos SNP pueden afectar a regiones codificantes o funcionales del genoma, lo que se traduce en alteraciones funcionales y/o en la expresión del gen, que podrían influir en la predisposición a desarrollar una enfermedad, la agresividad clínica de la enfermedad y la respuesta al tratamiento farmacológico.

Gran parte de los trabajos publicados hasta ahora hacen referencia a estudios poblacionales que describen la susceptibilidad a mieloma múltiple en relación a la variabilidad genética del sistema inmunitario. Son muy pocos los estudios en pacientes con MM que analizan el impacto clínico de los polimorfismos de los genes reguladores de la respuesta inmune. Por otro lado, la mayoría de estos estudios tienen como principal limitación el pequeño tamaño de la muestra o bien son estudios realizados en población no caucásica lo cual dificulta la valoración de los resultados y su reproductibilidad en población caucásica dadas las diferencias de las frecuencias alélicas que existen entre las razas.

Karabon y colaboradores (120) genotiparon pacientes con MM e individuos sanos como control para diferentes polimorfismos de CTLA-4 en población caucásica. El análisis demostró que los alelos CTLA-4c.49A>G[G], CT60[G], y Jo31[G] se observaron con mayor frecuencia en los pacientes con MM en comparación con el control sano. Además, el haplotipo CTLA-4c.49A>G[G], CTLA-4g.319C>T[C], CTLA-4g.*642AT(8_33), CT60[G], Jo31[G] aumenta el riesgo de MM.

Zheng y colaboradores (121) analizaron polimorfismos microsatélite en el exón 3 del gen CTLA-4 en pacientes con MM y GMSI, y en individuos sanos como control en población caucásica. Los resultados mostraron que la frecuencia del genotipo 86/86 y del alelo 86 estaban significativamente disminuida en los pacientes con MM y

MGUS comparada con el control sano indicando que polimorfismo microsatélite de CTLA-4 puede suponer una mayor susceptibilidad genética para MM y GMSI.

Tan solo se ha publicado un estudio en población asiática que correlacione polimorfismos de CTLA-4 con respuesta al tratamiento y supervivencia, Qin y colaboradores (122) estudiaron en individuos chinos los polimorfismos -1772(rs733618), -1661 (rs4553808), -318 (rs5742909), CT60(rs3087243) y +49 (rs231775) en pacientes con MM. En este estudio los pacientes con genotipo rs733618 GG que han recibido tratamiento con esquemas basados en bortezomib presentan una peor supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

Lee y colaboradores (123) describen en población caucásica como diversos polimorfismos del gen LAG-3 (rs2365094) y de CD4(rs11064392) se han asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar MM.

Woszczyk y colaboradores (124) analizaron en población caucásica la susceptibilidad a MM en relación a diferentes polimorfismos genéticos de ICOS. Para ello compararon un grupo control de individuos sanos con pacientes afectados de MM que habían recibido tratamiento para su enfermedad. También se analizó la evolución clínica de los pacientes con MM en función de los genotipos expresados. Aunque no observaron mayor riesgo de desarrollar MM con ninguno de los polimorfismos estudiados sí que observaron como la presencia del alelo C para ICOSc.2373(rs4675379) se asociaba a peor supervivencia global en los pacientes con MM.

Kasamatsu y colaboradores (125) investigaron en población asiática el papel de los polimorfismos genéticos de PD-1(rs36084323, rs41386349 y rs2227982) y PD-L1 (rs2297136 y rs4143815) como factores de riesgo para el desarrollo de MM y su impacto en las características clínicas de la enfermedad. En este estudio observaron que los pacientes con MM presentaban con más frecuencia el haplotipo PD-1 GCC/GCC (rs36084323/rs41386349/rs2227982) en comparación con el grupo control de individuos sanos. También observaron que los polimorfismos PD-1rs2227982 y PD-L1rs2297136 influían en las características clínicas de los pacientes con MM en relación a la presencia de lesiones óseas y niveles bajos de albúmina en suero. No se observaron diferencias en supervivencia global.

Por último, no se han encontrado publicaciones que hayan analizado polimorfismos genéticos de BTLA, CD28 o CD200 en pacientes con MM.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El MM continúa siendo una enfermedad incurable a pesar de la incorporación de nuevas terapias. La historia natural del MM es la recaída después de los sucesivos tratamientos debido a la reaparición del tumor a partir de la enfermedad residual que no ha podido ser erradicada viendo reducida su esperanza de vida de forma significativa.

El progresivo deterioro inmunológico que se produce a lo largo de la enfermedad es una característica distintiva del MM. Los defectos de la inmunidad celular y humoral contribuyen a la inmunosupresión profunda de estos pacientes facilitando el escape de la célula tumoral del control inmune natural, promoviendo el crecimiento de la enfermedad y la resistencia a la terapia.

Son múltiples los mecanismos por los cuales las células del MM se escapan de la inmunovigilancia. El aumento de la expresión de moléculas inhibitoras de los puntos de control inmunitario, que regulan negativamente la función de las células T, es un mecanismo de inmunoevasión al cual se le ha atribuido un papel importante.

Los polimorfismos genéticos de genes implicados en la respuesta inmunitaria, los llamados inhibidores de los puntos de control inmunitario, como son CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1 y CD200 podrían modular el control o la recidiva tumoral, la duración de la remisión y la supervivencia global. Es probable que la presencia de un polimorfismo genético específico determine unas células T más tolerantes inmunológicamente y esto podría conducir al fallo del sistema inmune y causar las recaídas sucesivas en los pacientes con mieloma múltiple que han recibido tratamiento.

Esta hipótesis nos permitiría identificar polimorfismos genéticos de alto riesgo para la recaída y una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Si esto se confirma, sería interesante la búsqueda de mecanismos que puedan aumentar la activación y proliferación de células T, para mejorar la respuesta inmune antitumoral.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Objetivo principal:

Determinar retrospectivamente si las variaciones genéticas de los genes moduladores de la respuesta inmune impactan en la supervivencia de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico que han recibido tratamiento sistémico para su enfermedad. Para dar respuesta a la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Objetivos secundarios:

- a. Describir las frecuencias genotípicas de los polimorfismos CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1, LAG-3 y CD200 en una cohorte homogénea de pacientes afectos de mieloma múltiple.

- b. Identificar aquellos polimorfismos genéticos de CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1, LAG-3 y CD200 relacionados con supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

4. METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PACIENTES

Se diseñó un estudio retrospectivo multicéntrico que engloba a cuatro centros hospitalarios: Hospital Durán y Reynals Instituto Catalán de Oncología (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona), Hospital Germans Trias y Pujol Instituto Catalán de Oncología (Badalona, Barcelona), Hospital Joan XXIII Instituto Catalán de Oncología (Tarragona) y el Hospital Universitari Josep Trueta Instituto Catalán de Oncología (Girona).

Se seleccionó una cohorte de pacientes adultos con MM de nuevo diagnóstico, entre enero de 1995 y diciembre de 2018, elegibles para tratamiento de primera línea y con seguimiento en los centros participantes. Adicionalmente se analizó una segunda cohorte de pacientes con diagnóstico de MM quiescente para analizar la relación entre genotipo expresado y tiempo de progresión a MM sintomático.

Se excluyeron los pacientes de nuevo diagnóstico que no eran elegibles para tratamiento de primera línea o que no se dispusiera de la información básica suficiente.

Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito de acuerdo con la declaración de Helsinki. El comité ético del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta, Girona, aprobó el estudio. El ADN para el genotipado de los polimorfismos se obtuvo de muestras de médula ósea o de sangre periférica. Las muestras fueron proporcionadas por el Biobanco IDIBGI (Biobanc IDIBGI, B.0000872) integrado en la red de Biobancos Nacionales Españoles.

Para este proyecto de tesis se diseñó una base de datos donde se registraron las siguientes variables:

- Datos demográficos
- Características de la enfermedad al diagnóstico
- Presencia de GMSI o MQ previos
- Estadiaje según ISS
- Citogenética (riesgo estándar vs alto riesgo)
- Tratamiento de primera línea.

Para registrar la respuesta alcanzada al tratamiento y el criterio de progresión se utilizaron las definiciones de consenso del IMWG del 2006 (anexo 1).

Las variables de supervivencia, que son uno de los objetivos principales de este proyecto, se definieron de la siguiente forma:

- SLP: tiempo que transcurre desde inicio de tratamiento hasta que ocurre una recidiva, progresión o muerte (lo primero que suceda).
- SG: tiempo que transcurre desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la última fecha de la que se tiene constancia (fecha de muerte o fecha de la última visita).

La selección de los polimorfismos a estudiar se realizó mediante la revisión de la bibliografía existente y de las principales bases de datos de polimorfismos para determinar los SNPs con mayor grado de evidencia en relación a su influencia en la modulación de la respuesta inmune en pacientes con MM y otras neoplasias hematológicas malignas.

Para dar respuesta a la hipótesis de la tesis se diseñaron dos trabajos. Los objetivos del primer trabajo fueron describir las frecuencias genotípicas de los polimorfismos CTLA-4, BTLA, CD28, LAG-3 y PD-1; e identificar aquellos polimorfismos genéticos que están relacionados con supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. El segundo trabajo los objetivos fueron describir las frecuencias genotípicas de los polimorfismos genéticos de CD200 e identificar aquellos polimorfismos genéticos que están relacionados con supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Dado que la expresión de CD200 en la célula plasmática de pacientes con MM se ha correlacionado con un peor pronóstico exploramos si el genotipo CD200 podía influir en la intensidad de expresión de CD200 en la célula plasmática.

La descripción de los pacientes y los resultados se realizarán de forma separada para cada trabajo.

4.2. DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN CTLA-4, BTLA-4, CD28, PD-1 y LAG-3

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 200 µl de sangre completa utilizando un kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Analizamos polimorfismos de los genes CTLA4 (rs231775 y rs733618), BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821) y LAG3 (rs870849). El genotipado para estos polimorfismos se determinó mediante gráficos de discriminación alélica en el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex, usando sondas y cebadores de PCR en tiempo real TaqMan® según las instrucciones del fabricante, obtenidos como reactivos AB “Assay on demand” comercialmente disponibles (Applied Biosystems™).

4.3. DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN CD200

Al igual que los anteriores polimorfismos genéticos la extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 200 µl de sangre completa utilizando un kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Analizamos dos polimorfismos del gen CD200: rs1131199 y rs2272022. El genotipado para estos polimorfismos se determinó mediante gráficos de discriminación alélica en el sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex, usando sondas y cebadores de PCR en tiempo real TaqMan® según las instrucciones del fabricante, obtenidos como reactivos AB “Assay on demand” comercialmente disponibles (Applied Biosystems™).

4.4. EXPRESIÓN DE CD200 EN LA CÉLULA PLASMÁTICA

El estudio inmunofenotípico se realizó utilizando muestras frescas de médula ósea anticoaguladas con EDTA procedentes del aspirado de médula ósea de pacientes con MM de nuevo diagnóstico. Se utilizó un protocolo estándar de tinción, lisis y lavado utilizando BC Versalyse™ y fijado con paraformaldehído, teñido con el siguiente panel de 9 fluorescencias: CD38 PB- CD45-KrO, CD81-FITC, CD27-PE, CD117-ECD, CD19-PC5.5, CD200-PC7 (clone OX-104: IgG1 against Human OX2CD4d3+4 soluble fusion protein), CD138-APC, CD56-APC-AF750. La adquisición se realizó con el citómetro Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter™), calibrado diariamente con partículas BC Flowset Pro particles™ con un mínimo de adquisición de 100.000 eventos. El análisis del FCS se realizó usando un proceso en bloque (Batch process) con el software BC Kaluza con una plantilla prediseñada para estandarizar medidas. El porcentaje de expresión positiva, la intensidad media de la fluorescencia, el coeficiente de variación y el patrón de expresión se evaluaron en diferentes poblaciones: compartimento de células plasmáticas normales y anormales, linfocitos B maduros CD27-, linfocitos B maduros CD27+, linfocitos T CD27+CD19-CD56-, linfocitos NK. Además, se determinó la ratio de la intensidad media de la fluorescencia de CD200 (MFIR) calculada entre las células plasmáticas anormales y los linfocitos B CD27 negativos.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias y los genotipos se formularon mediante contaje directo. La homogeneidad entre grupos fue evaluada utilizando el test de Chi-square o el test

exacto de Fisher para variables cualitativas y el test de Student para variables continuas.

La gráfica de SG y SLP se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre curvas se analizaron mediante el test log-rank. El análisis multivariante se realizó mediante el modelo de regresión de Cox. Todas las variables con un valor de p igual o inferior a 0,2 en el análisis univariante se incluyeron en el análisis multivariante.

Se utilizaron estimaciones de incidencia acumulada considerando riesgos competitivos para determinar la relación entre los grupos genéticos y la probabilidad de recidiva o de mortalidad en los pacientes con MM que reciben tratamiento de primera línea. La comparación de las curvas se determinó con el test de Gray.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Presentaremos en primer lugar los resultados obtenidos al analizar el impacto de los genotipos de las variantes genéticas de los genes CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1 y LAG-3, seguidos de los resultados al analizar el impacto del genotipo de CD200 y del análisis de la expresión de la molécula CD200 en la célula plasmática MM.

5.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS CTLA4, BTLA, CD28, PD-1 y LAG3

Tal como se ha explicado en el apartado “Diseño del estudio y Pacientes” se analizaron los polimorfismos de los genes CTLA4 (rs231775 y rs733618), BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821) y LAG3 (rs870849).

5.1.1. Características de la cohorte analizada

Analizamos 239 pacientes adultos con MM de nuevo diagnóstico elegibles para tratamiento de primera línea y en seguimiento, en 4 centros hospitalarios pertenecientes al Instituto Catalán de Oncología desde el año 1995 hasta el año 2018.

Las características clínico-biológicas de la cohorte analizada se pueden ver en la tabla 7.

TABLE 7. Características clínicas de la cohorte analizada

Características (N=239)	Total %
Edad (años)	
Mediana (rango)	68 (61-76)
Sexo	
Hombre	56.5
Mujer	43.5
Tipo de proteína monoclonal	
IgG	53.1
IgA	27.2
Cadenas ligeras	13.4
Otras	6.3
Historia de GMSI	8.1
Estadio ISS	
I-II	70.4
III	29.6
LDH	
Alta	8.5
Normal	91.5
[†] Insuficiencia renal	
No	77.6
Si	22.4
Auto-TPH	
Si	40.9
No	59.1
Tratamiento primera línea	
Agentes alquilantes	20.5
Inhibidores proteosoma	53.1
Inmunomoduladores	5.4
Inhibidores proteosoma más Inmunomoduladores	20.5
Daratumumab monoterapia	0.4

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto; LDH: lactato deshidrogenasa; [†]Insuficiencia renal: creatinina \geq 2 mg/dl; Auto-TPH: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Adicionalmente se analizó una segunda cohorte de 62 pacientes con diagnóstico de MM quiescente para analizar la relación entre genotipo expresado y tiempo de progresión a MM sintomático. Las características clínicas de este grupo de pacientes no están disponibles.

5.1.2. Distribución de genotipos en la cohorte analizada

La distribución de los genotipos en los polimorfismos estudiados se puede observar en la tabla 8.

TABLA 8. Distribución de los genotipos en los pacientes estudiados

Genes	Genotipo	[%]	
		MM	MQ
CTLA4 rs231775	AA	46.6	56.4
	GG	9.5	5.1
	AG	44.0	38.5
CTLA4 rs733618	CC	0.0	0.0
	TT	92.5	95.2
	CT	7.5	4.8
BTLA rs9288953	CC	62.2	63.2
	TT	5.2	7.9
	CT	32.6	28.9
PD-1 rs36084323	CC	93.2	94.6
	TT	0.0	2.7
	CT	6.8	2.7
PD-1 rs11568821	CC	82.3	73.0
	TT	1.3	0.0
	CT	16.4	27.0
LAG3 rs870849	CC	35.7	35.1
	TT	49.3	43.2
	CT	14.9	21.6

MM: Mieloma múltiple; MQ: Mieloma quiescente

Las frecuencias de los genotipos fueron similares a las descritas previamente en la literatura en población caucásica.

5.1.3. Homogeneidad entre grupos genéticos para los polimorfismos CTLA4, BTLA, CD28, PD-1 and LAG3

La comparación de los factores pronósticos clínicos al diagnóstico entre los grupos genéticos para cada polimorfismo estudiado mostró una distribución equilibrada para la edad, sexo, tipo de proteína monoclonal, historia previa de GMSI, estadiaje ISS, citogenética, niveles de LDH en suero o insuficiencia renal. Además, la proporción de pacientes que recibieron un auto-TPH de sangre periférica fue comparable entre los grupos genéticos.

La tabla 9 y 10 respectivamente muestran el análisis de homogeneidad entre genotipos para BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821), LAG3 (rs870849) y para CTLA4 (rs231775 y rs733618).

Tabla 9. Características de los pacientes según genotipos BTLA rs9288953, CD28 rs3116496, PD-1 rs36084323, PD-1 rs11568821 y LAG3rs870849

	Total	BTLA rs9288953			CD28 rs3116496			PD-1 rs36084323			PD-1 rs11568821			LAG3 rs870849		
	%	CC+CT	TT	P	TT+CT	CC	P	CC+CT	TT	P	CC+CT	TT	P	TT+CT	CC	P
Total	239 (100.0)	94.8	5.2		67.5	32.5		100.0	0.0		98.7	1.3		64.3	35.7	
Edad (años)																
Mediana (rango)	68 (61-76)	69 (61-76)	66.5(59-71.8)	0.720	68 (60-75)	68.5 (62-76)	0.539	68 (61-76)	-	-	68 (61-75.8)	66 (63-72.5)	0.907	67 (62-75)	69(58.8-76.3)	0.787
Sexo																
Hombre	56.5	57.9	33.3	0.094	54.4	59.2	0.490	56.2	0.0	-	56.8	66.7	0.731	59.9	49.4	0.132
Mujer	43.5	42.1	66.7		45.6	40.8		43.8			43.2	33.3		40.1	50.6	
Tipo proteína monoclonal																
IgG	53.1	54.3	41.7	0.488	56.5	51.4	0.626	52.8	0.0	-	53.7	33.3	<0.001	53.5	49.4	0.839
IgA	27.2	25.8	41.7		27.9	26.4		27.2	0.0		27.1	0.0		26.1	30.4	
Cadenas ligeras	13.4	13.1	16.7		11.4	17.1		13.6	0.0		13.6	0.0		12.6	15.2	
Otras	6.3	6.8	0.0		7.0	5.2		6.4	0.0		5.7	66.7		7.7	5.1	
Historia GMSI																
	8.1	7.3	16.7	0.481	7.1	10.5	0.671	8.2	0.0	-	8.0	0.0	0.865	9.2	1.3	0.079
Estadio ISS																
I/II	70.4	70.2	70.0	0.989	69.5	74.6	0.448	71.5	0.0	-	70.4	0.0	0.125	70.9	69.0	0.780
III	29.6	29.8	30.0		30.5	25.4		28.5			29.6	100.0		29.1	31.0	
Riesgo citogenético (N=166)																
*Alto	8.6	9.4	0.0	0.396	6.5	11.1	0.343	8.7	0.0	-	9.0	0.0	-	10.1	4.1	0.215
Estándar	91.4	90.6	100.0		93.5	88.9		91.3			91.0	-		89.9	95.9	
LDH																
Alta	8.5	8.4	12.5	0.690	5.6	14.3	0.060	8.6	0.0	-	8.9	0.0	0.588	8.2	9.3	0.823

Normal	91.5	91.6	87.5		94.4	85.7		91.4			91.1	100.0		91.8	90.7	
↑ Insuficiencia renal																
No	77.6	77.3	75.0	0.857	81.2	71.4	0.102	78.1	0.0	-	76.6	100.0	0.339	79.3	78.7	0.919
Si	22.4	22.7	25.0		18.8	28.6		21.9			23.4	0.0		20.7	21.3	
Auto-TPH																
Si	40.9	41.0	41.7	0.964	43.6	36.5	0.307	40.7	0.0	-	41.3	33.3	0.780	42.0	39.2	0.688
No	59.1	59.0	58.3		56.4	63.5		59.3			58.7	66.7		58.0	60.8	

GMSI: Gammapatía monoclonal significado incierto; *FISH alto riesgo: del (17p), t(4;14), t(14;16); LDH: lactato deshidrogenasa; ↑ Insuficiencia renal: creatinina ≥ 2 mg/dl; Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

Tabla 10. Características de los pacientes según genotipos CTLA4 rs2311775 y CTLA4 rs733618

	Total	CTLA4 rs2311775			CTLA4 rs733618		
	%	AA+AG	GG	P	CC+CT	TT	P
Total	239 (100.0)	90.5	9.5		7.5	92.5	
Edad (años)							
Mediana (rango)	68 (61-76)	68.0 (61-75.5)	70.0 (64-75.3)	0.480	68.0 (61-73)	69.0 (61.5-76)	0.426
Sexo							
Hombre	56.5	55.2	54.5	0.950	50.0	57.0	0.564
Mujer	43.5	44.8	45.5		50.0	43.0	
Edad agrupada							

≤ 69 años	53.0	54.1	45.5	0.439	64.7	52.1	0.314
> 69 años	47.0	45.9	54.5		35.3	47.9	
Tipo de proteína monoclonal							
IgG	53.1	54.8	45.5	0.284	66.7	52.0	0.678
IgA	27.2	26.7	22.8		16.7	28.0	
Cadenas ligeras	13.4	12.4	22.7		11.1	13.6	
Otros	6.3	6.2	9.0		5.6	6.3	
Historia de GMSI	8.1	8.7	4.8	0.701	11.1	7.8	0.206
Estadio ISS							
I/II	70.4	70.9	64.7	0.590	53.3	71.8	0.131
III	29.6	29.1	35.3		46.7	28.2	
Riesgo citogenético							
* Alto	8.6	9.6	0.0	0.282	0.0	9.3	0.290
Estándar	91.4	90.4	100.0		100.0	90.7	
LDH							
Alta	8.5	8.7	8.3	0.968	0.0	9.2	0.253
Normal	91.5	91.3	91.7		100.0	90.8	
† Insuficiencia renal							
No	77.6	78.3	70.0	0.394	61.1	79.0	0.080
Si	22.4	21.7	30.0		38.9	21.0	
Auto-TPH							
Si	40.9	41.1	38.1	0.792	52.9	39.9	0.292
No	59.1	58.9	61.9		47.1	60.1	

GMSI: Gammapatía monoclonal significado incierto; *FISH alto riesgo: del (17p), t(4;14), t(14;16); LDH: lactato deshidrogenasa; † Insuficiencia renal: creatinina ≥ 2 mg/dl; Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

5.1.4. Impacto clínico de las variantes genéticas de CTLA-4

Seleccionamos la cohorte adicional de 62 pacientes que habían estado diagnosticados de MQ y analizamos la correlación entre los polimorfismos BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821), LAG3 (rs870849) o CTLA4 (rs733618 y rs231775) y la progresión a MM. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados y tiempo transcurrido a inicio de tratamiento de primera línea.

En esta cohorte, la mediana de tiempo a recibir tratamiento fue de 22.8 meses para pacientes con genotipo CTLA4 rs231775 GG versus 102 meses para el genotipo AA+AG (p: 0.7). Resultados similares se obtuvieron cuando analizamos el impacto de CTLA4 rs733618 (CC+CT: 174.5 meses vs. TT: 65.2 meses; p: 0.4), BTLA rs9288953 (CC+CT: 65.2 meses vs. TT: 135.1 meses; p: 0.6), CD28 rs3116496 (CC+CT: 61.6 meses vs. TT: 135.1 meses; p: 0.7), PD-1 rs36084323 (CC+CT: 102 meses vs. TT: no alcanzada; p: 0.6) y LAG3 rs870849 (TT+CT: 61.6 meses vs. CC: 122.6 meses; p: 0.3).

En la cohorte de 239 pacientes con nuevo MM de nuevo diagnóstico que iniciaron tratamiento de primera línea analizamos el impacto clínico de los polimorfismos BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821), LAG3 (rs870849) o CTLA4 (rs733618 y rs231775) y la progresión a MM. En esta cohorte, no encontramos ninguna correlación significativa entre polimorfismos genéticos de BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821), LAG3 (rs870849) o CTLA4 (rs733618) y SLP o SG (tabla 11).

Tabla 11. Supervivencia global y supervivencia libre de progresión según polimorfismos genéticos

Genes	SG (95% IC)			SLP (95% IC)		
	5-años	10-años	<i>P</i>	5-años	10-años	<i>P</i>
CTLA4 rs231775						
AA+AG	65.8 (59.6-73.0)	37.0 (29.1-47.2)	0.9	25.0 (19.0-33.0)	10.5 (5.2-21.1)	0.008
GG	69.2 (51.0-93.9)	43.2 (20.7-90.2)		55.4 (34.3-89.3)	36.9 (14.5-93.7)	
CTLA4 rs733618						
CC+CT	72.9 (53.1-100.0)	39.1 (17.5-87.0)	0.9	42.6 (21.4-84.6)	-	
TT	65.4 (59.1-72.4)	38.1 (30.3-48.0)		27.6 (21.4-35.5)	13.6 (7.8-23.6)	
BTLA rs9288953						
CC+CT			0.4			1.0
	65.9 (59.5-72.9)	36.4 (28.4-46.7)		29.2 (22.9-37.3)	15.1 (8.9-25.5)	
TT	79.5 (57.7-100)	56.8 (32.2-100)		21.2 (6.3-71.6)	10.6 (1.7-67.1)	
CD28 rs3116496						
CC+CT	71.4 (64.3-79.2)	39.4 (30.6-50.7)	0.2	30.1 (20.3-44.4)	14.2 (6.9-28.9)	0.3
TT	56.8 (45.2-71.5)	37.5 (21.3-66.0)		28.1 (20.7-38.2)	14.1 (5.6-35.2)	
PDCD1 rs36084323						
CC+CT	66.4 (60.2-73.1)	38.0 (30.3-47.7)	0.1	28.5 (22.4-36.3)	13.7 (7.9-23.7)	-
TT	100.0 (100.0-100.0)	100.0 (100.0-100.0)		-	-	
PDCD1 rs11568821						
CC+CT	66.1 (59.9-73.0)	38.0 (30.3-47.6)	0.4	27.9 (21.8-35.8)	13.6 (7.8-23.5)	0.8
TT	100.0 (100.0-100.0)	100.0 (100.0-100.0)		-	-	
LAG3 rs870849						
TT+CT	67.4 (59.7-76.1)	38.9 (29.3-51.8)	0.2	26.8 (19.4-37.0)	11.5 (5.3-24.7)	0.3
CC	60.1 (49.6 -72.9)	31.3 (20.1-48.6)		29.9 (20.0-44.8)	11.9 (2.7-52.2)	

SG: Supervivencia global; SLP: Supervivencia libre de progresión; 95% IC: 95% intervalo confianza

No obstante, el análisis del polimorfismo genético CTLA4 rs231775 reveló que la presencia del genotipo agrupado AA+AG se asocia a una mediana de SLP significativamente más corta que el genotipo GG: 32.3 meses (95% intervalo de confianza (95% IC): 26.4 – 36.1) y 96.8 meses (95% IC: 44.5 – no alcanzada) respectivamente (p: 0.008) (Figura 9A y Figura 9B). Además, la mediana tiempo hasta el siguiente tratamiento fue significativamente menor en el genotipo CTLA4 rs231775 AA+AG (36.3 meses; 95% IC: 33.5-43) comparado con los pacientes con genotipo GG (no alcanzada; 95% IC 44.6-no alcanzada) (p: 0.01).

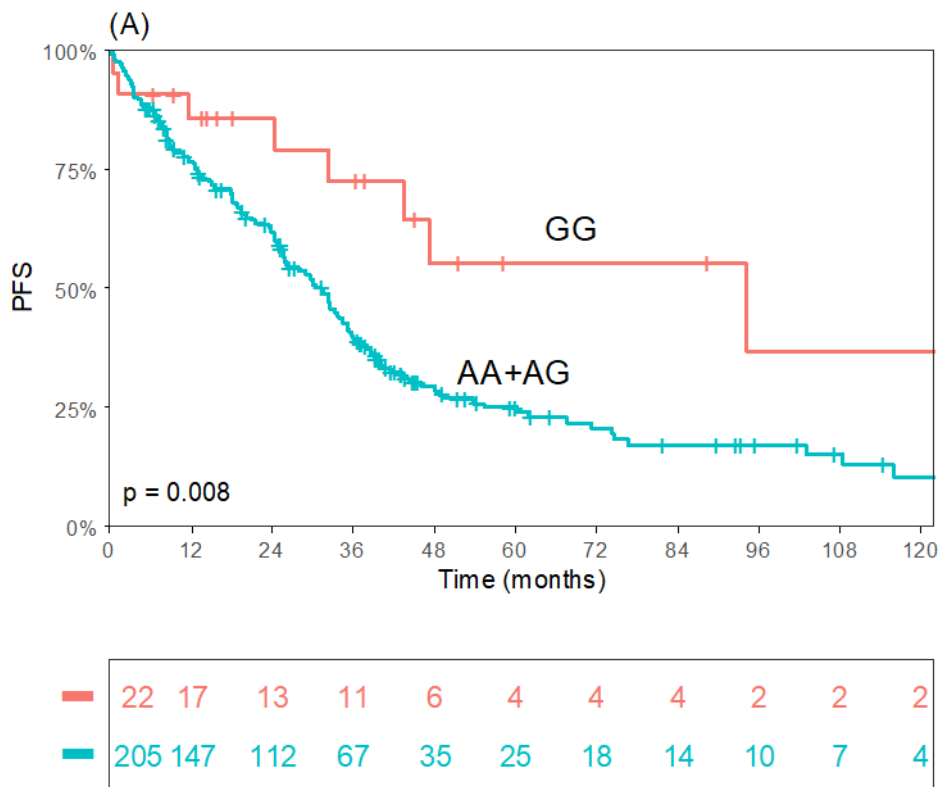


Figura 9A. Supervivencia libre de progresión según genotipos agrupados CTLA4 rs231775

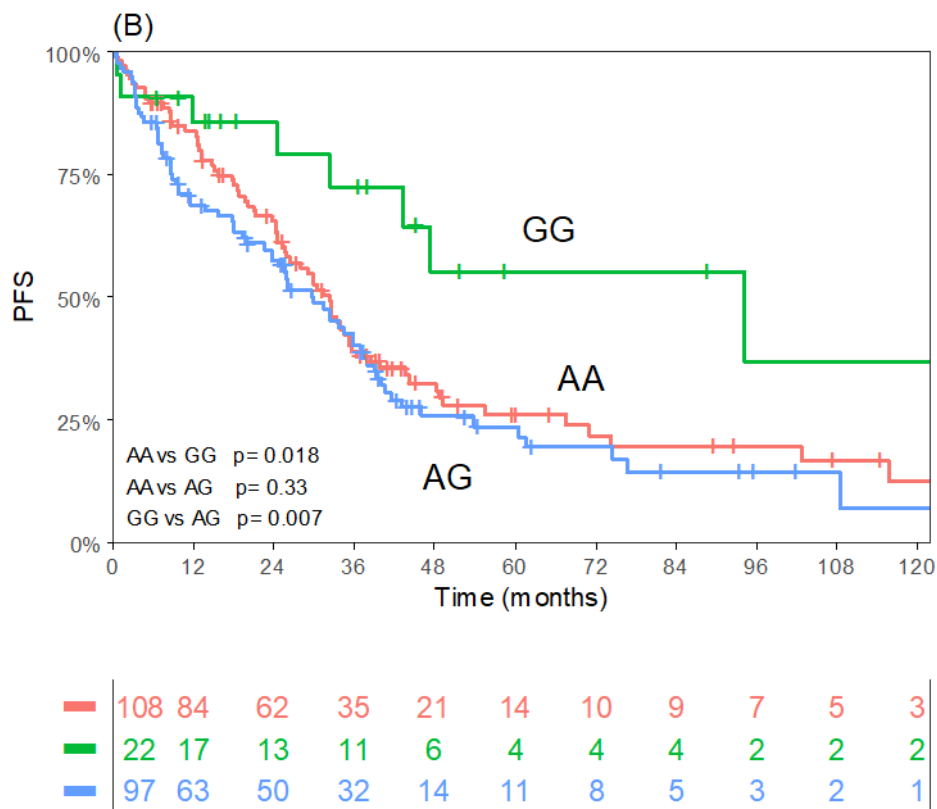


Figura 9B. Supervivencia libre de progresión según genotipos independientes CTLA4 rs231775

La SLP a los 5 años fue del 25% para los pacientes con el genotipo agrupado AA+AG vs 55% para los pacientes con el genotipo GG. También fueron factores de riesgo para una peor SLP el sexo hombre (30.8 vs 36.4 meses; p: 0.03), edad \geq 69 años (30.2 vs 36.8 meses; p: 0.02), alto riesgo citogenético (18.6 vs 33.5 meses; p: 0.01), ISS alto (24.2 vs 38.5 meses; p: 0.02) y no haber recibido una auto-TPH (39.6 vs 26.6 meses; p < 0.001).

En el análisis multivariante, el polimorfismo CTLA4 rs231775 permaneció como factor independiente para la SLP (Hazard Ratio (HR): 2.05; 95% CI: 1.0-6.2; p: 0.047). La tabla 12 muestra los resultados del análisis multivariante.

Tabla 12. Análisis univariante y multivariante de la SG y SLP de los pacientes con MM

	Análisis univariante				Análisis multivariante			
	SG HR (95% IC)	P	SLP HR (95% IC)	P	SG HR (95% IC)	P	SLP HR (95% IC)	P
Sexo								
Hombre	1.5 (1.0-2.1)	0.04	1.4 (1.0-2.0)	0.031	1.7 (1.1-2.6)	0.013	1.5 (1.0-2.2)	0.027
Edad por grupos								
> 69 años	2.3(1.5-3.3)	<0.001	1.5 (1.1-2.0)	0.020	0.9 (0.5-1.6)	0.741	0.6 (0.3-1.0)	0.050
Estadio ISS								
III	1.7 (1.1-2.7)	0.02	1.5 (1.1-2.3)	0.021	1.8 (1.1-2.8)	0.022	1.4 (1.0-2.1)	0.071
Auto-TPH								
No auto-TPH	2.5 (1.6-3.9)	<0.001	1.9 (1.3-2.6)	<0.001	2.9 (1.6-5.5)	<0.001	2.9 (1.6-5.0)	<0.001
Genotipo CTLA4 rs231775								
AA+AG	1.0 (0.5-2.0)	0.924	2.6 (1.2-5.3)	0.008	0.8 (0.4-1.9)	0.684	2.5 (1.0-6.2)	0.047

Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza

Durante el análisis de subgrupos en los pacientes con ISS 1 y ISS 2 se observaron diferencias más evidentes según el genotipo expresado CTLA4 rs231775. Detectamos que los pacientes con el genotipo GG presentaban una supervivencia mucho más larga (mediana no alcanzada) que los pacientes con genotipo AA+AG quienes alcanzaron una mediana de SLP de 43.3 meses ((95%CI: 31.4 – 39.8; p: 0.0062) (Figura 10).

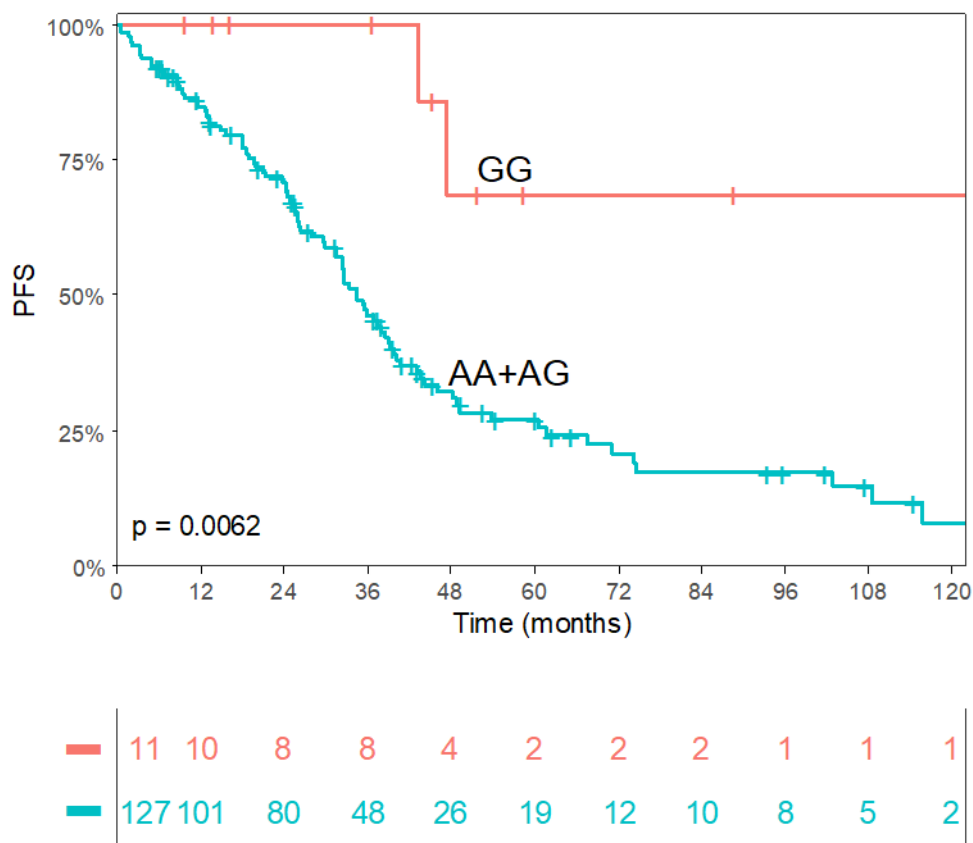


Figura 10. Supervivencia libre de progresión en pacientes ISS 1+ ISS 2 según genotipos CTLA4 rs231775

Por otro lado, en el subgrupo de pacientes que habían recibido un auto-TPH la presencia del genotipo agrupado AA+AG se asoció con una SLP significativamente peor comparado con los pacientes con el genotipo GG: 35.9 meses (95% CI: 32.6 – 53.7) y no alcanzada, respectivamente (p 0.02) (Figura 11). En contraste con estos resultados no se observaron diferencias significativas en la SLP en los pacientes que no habían recibido un auto-TPH.

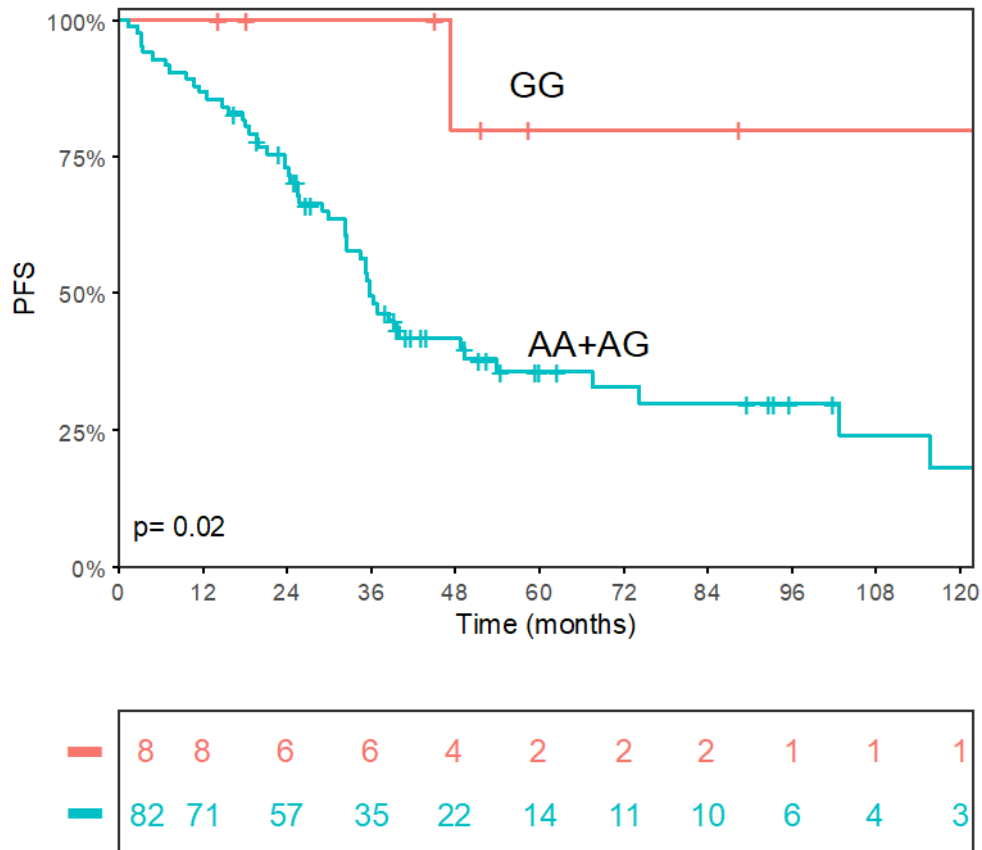


Figura 11. Supervivencia libre de progresión para pacientes que han recibido auto-TPH según el genotipo. CTLA4 rs231775

No encontramos ninguna asociación significativa entre los polimorfismos CTLA4 rs733618, BTLA rs9288953, CD28 rs3116496, PD-1 rs36084323 y PD-1rs11568821, LAG3 rs870849 y la SG o SLP.

5.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS CD200

Tal como se ha explicado en el apartado “Diseño del estudio y Pacientes” se analizaron los polimorfismos del gen CD200 (rs1131199 and rs2272022).

5.2.1. Características de la cohorte analizada

Analizamos 291 pacientes adultos con MM de nuevo diagnóstico elegibles para tratamiento de primera línea y en seguimiento, en 4 centros hospitalarios

pertenecientes al Instituto Catalán de Oncología desde el año 1995 hasta el año 2018. Las características clínico-biológicas de la cohorte analizada se pueden ver en la tabla 13.

Tabla 13. Características clínicas de la cohorte analizada

Características (N=291)	Total %^a
Edad (años)	
Mediana (rango)	66 (59-73)
Sexo	
Hombre	56.0
Mujer	44.0
Tipo de proteína monoclonal	
IgG	52.4
IgA	27.8
Cadenas ligeras	14.5
Otras	5.2
Historia de GMSI	9.4
Estadio ISS	
I-II	70.0
III	30.0
LDH	
Alta	12.0
Normal	88.0
† Insuficiencia renal	
No	76.5
Yes	23.5
Auto-TPH	
Si	42.5
No	57.5
Tratamiento primera línea	
Agentes alquilantes	18.6
Inhibidores proteosoma	48.9
Inmunomoduladores	5.6
Inhibidores proteosoma + Inmunomoduladores	26.5
Daratumumab monoterapia	0.4

GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto; LDH: lactato deshidrogenasa; †Insuficiencia renal: creatinina \geq 2 mg/dl; Auto-TPH: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

Adicionalmente se analizó una segunda cohorte de 67 pacientes con diagnóstico de MM quiescente para analizar la relación entre genotipo expresado y tiempo de progresión a MM sintomático. Las características clínicas de este grupo de pacientes no están disponibles.

5.2.2. Distribución de genotipos en la cohorte analizada

La distribución de genotipos en los polimorfismos estudiados se puede observar en la tabla 14.

El genotipo CD200 rs1131199 pudo ser analizado con éxito en 289 pacientes. El alelo G fue el mayoritario, siendo detectado en el 78.9% de los casos mientras que el alelo C fue identificado en el 69.9% de los casos estudiados. La distribución de los genotipos mostró 87 patients (30.1%) homocigotos para el alelo G, 61 homocigotos para el alelo C (21.1%) y 141 heterocigotos CG (48.8%).

El genotipo CD200 rs2272022 pudo ser analizado con éxito en 279 pacientes. El alelo C alelo fue el mayoritario, siendo detectado en el 82.4% de los casos mientras que el alelo A fue identificado en el 63.8% de los casos estudiados. La distribución de los genotipos mostró 101 pacientes (36.2%) homocigotos para el alelo C, 49 homocigotos para el alelo A (17.6%) y 129 heterocigotos AC (46.2%).

Tabla 14. Distribución de los polimorfismos en los pacientes analizados

Genes	Genotipo	%
CD200 rs1131199	CC	21.1
	GG	30.1
	CG	48.8
CD200 rs2272022	AA	17.6
	CC	36.2
	AC	46.2

Las frecuencias de los genotipos fueron similares a las descritas previamente en la literatura en población caucásica.

5.2.3. Homogeneidad entre grupos genéticos para los polimorfismos CD200

La comparación de los factores pronósticos clínicos al diagnóstico entre los grupos genéticos para cada polimorfismo estudiado mostró una distribución equilibrada para la edad, sexo, tipo de proteína monoclonal, historia previa de GMSI, estadiaje ISS, citogenética, niveles de LDH en suero o insuficiencia renal. Además, la proporción de pacientes que recibieron un auto-TPH de sangre periférica fue comparable entre los grupos genéticos.

La tabla 15 muestran la comparación de las características clínicas de los pacientes con MM entre los genotipos de CD200.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes según genotipos CD200 rs1131199 y CD200 rs2272022

Características	Total	CD200 rs1131199			CD200 rs2272022		
	%	CC+CG	GG	P	AA+AC	CC	P
Total	291 (100.0)	202 (69.9)	87 (30.1)		178 (63.8)	101 (36.2)	
Edad (años)							
Mediana (rango)	66 (59-73)	65 (59-72)	67 (60-76)	0.169	65 (59-72)	67 (60-76)	0.739
Sexo							
Hombre	56.0	56.9	54.0	0.648	55.6	58.4	0.650
Mujer	44.0	43.1	46.0		44.4	41.6	
Edad agrupada							
< 66 años	49.5	51.0	45.9	0.429	47.8	51.5	0.548
>= 66 años	50.5	49.0	54.1		52.2	48.5	
Tipo de proteína monoclonal							
IgG	52.4	55.7	43.5	0.156	55.1	49.0	0.333
IgA	27.8	25.8	33.0		26.2	30.0	
Cadenas ligeras	14.5	14.0	16.5		13.6	16.0	
Otras	5.2	4.5	7.1		5.1	5.0	
Historia de GMSI	9.4	10.1	8.2	0.923	9.7	10.1	0.687
Estadio ISS (N= 229)							
I/II	70.0	71.4	66.2	0.413	72.5	67.4	0.398
III	30.0	28.6	33.8		27.5	32.6	
Riesgo citogenético(N=182)							
* Alto	8.8	9.9	6.1	0.563	8.8	10.3	0.737
Estándar	91.2	90.1	93.9		91.2	89.7	
LDH							

Alta	12.0	14.1	7.7	0.190	16.0	7.3	0.068
Normal	88.0	85.9	92.3		84.0	92.7	
† Insuficiencia renal							
No	76.5	77.2	74.4	0.616	76.3	77.1	0.889
Si	23.5	22.8	25.6		23.7	22.9	
Auto-TPH							
Si	42.5 (auto)	43.1	41.9	0.841	42.2	45.0	0.652
No	57.5	56.9	58.1		57.8	55.0	

GMSI: Gammapatía monoclonal significado incierto; *FISH alto riesgo: del (17p), t(4;14), t(14;16); LDH: lactato deshidrogenasa; † Insuficiencia renal: creatinina \geq 2 mg/dl; Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

5.2.4. Impacto clínico de las variantes genéticas de CD200

Seleccionamos la cohorte adicional de 67 pacientes que habían estado diagnosticados de MQ y analizamos la correlación entre los polimorfismos CD200 rs1131199 y CD200 rs2272022 y la progresión a MM. No se observaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados y tiempo transcurrido a inicio de tratamiento de primera línea.

En esta cohorte, la mediana de tiempo a recibir tratamiento fue de 14.1 meses para los pacientes con genotipo GG CD200 rs1131199 versus 30 meses para los patients con el genotipo CC+GG (p: 0.4). Se obtuvieron resultados similares cuando analizamos el impacto de CD200 rs2272022 (AA+AC: 35.6 meses vs. CC: 19.1 meses; p: 0.3).

En una cohorte de 47 pacientes con MM fue posible disponer de muestra para el análisis de la expresión de CD200 mediante citometría de flujo, como se ha referido en el apartado "Diseño del estudio y Pacientes ". Dado que la expresión de CD200 en la célula plasmática de pacientes con MM se ha correlacionado con un peor pronóstico exploramos si el genotipo CD200 podía influir en la intensidad de expresión de CD200 en la célula plasmática. La intensidad media de fluorescencia de CD200 (IMF) no fue diferente entre los grupos genéticos: 2.03 (intercuartil rango (ICR) 8.27) para pacientes con genotipos CD200 rs1131199 CC o CG y 3.31 (ICR 12.81) para pacientes con genotipo CD200 rs1131199 GG (p: 0.541). La ratio de expresión de CD200 (RIMF) entre células plasmáticas neoplásicas y linfocitos B normales fue 1.17 (ICR: 3) vs. 3.16 (ICR: 3) (p: 0.109).

En la cohorte de los 291 pacientes con MM de nuevo diagnóstico que iniciaron tratamiento de primera línea analizamos el impacto clínico de los genotipos expresado en los polimorfismos CD200 rs1131199 y CD200 rs2272022. En esta cohorte, los pacientes con genotipo GG CD200 rs1131199 mostraron una mediana de SG más corta en comparación a los que expresaban el genotipo CC o CG: 67.8 meses (95% intervalo confianza (IC): 53.2 – 99.0) y 94.4 meses (95% IC: 77.5 – 125) respectivamente; p: 0.022) (Figura 12). La SG a los 5 años fue del 53.0% para los pacientes con genotipo GG vs 68% para los pacientes con genotipo agrupado CC+CG.

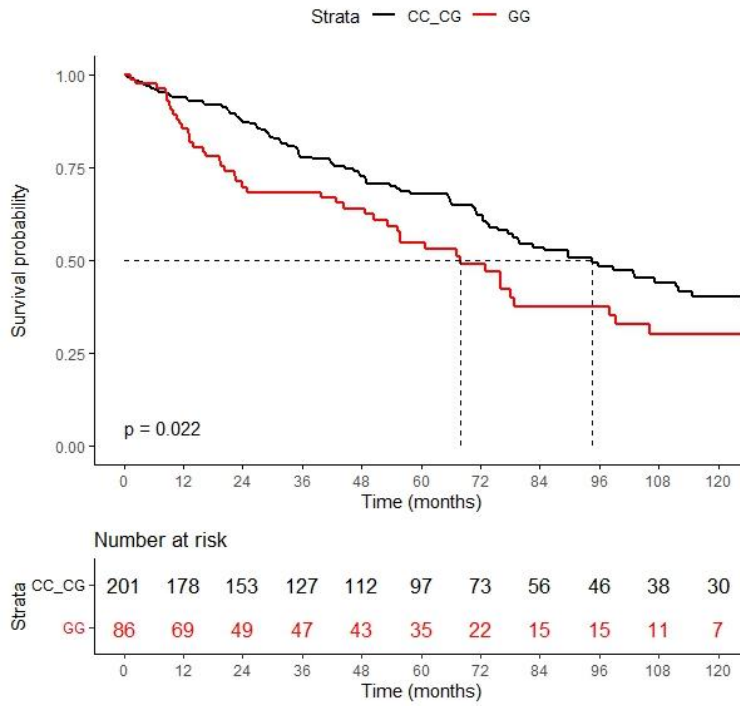


Figura 12A. Supervivencia global según genotipos agrupados CD200 rs1131199

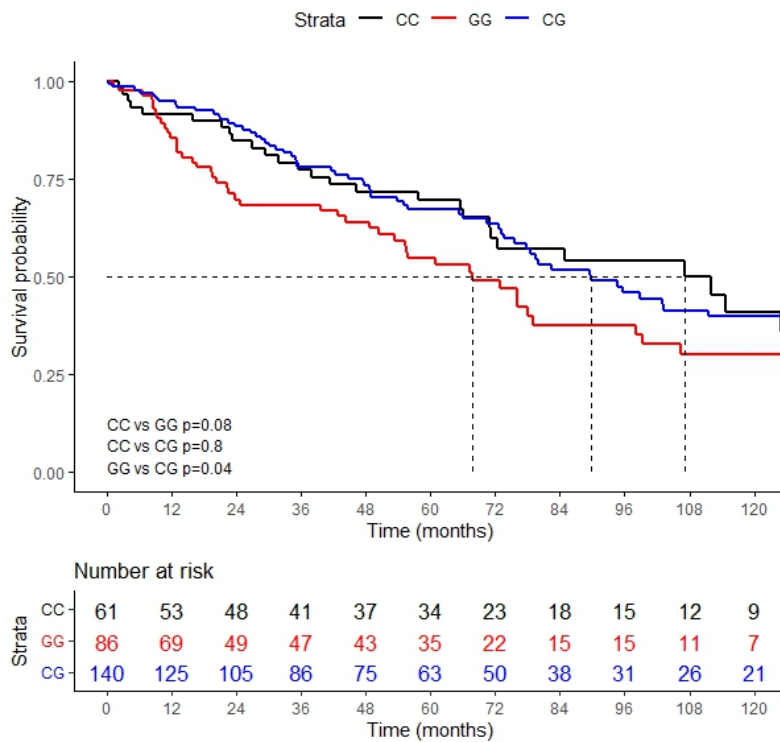


Figura 12B. Supervivencia global según genotipos independientes CD200 rs113119

También fueron factores de riesgo para una peor SG la edad ≥ 66 años (67.1 vs 124.6 meses; $p < 0.001$), alto riesgo citogenético (29.2 vs 98.6 meses; $p < 0.001$), ISS alto (55.2 vs 94.4 meses; $p: 0.001$) y no haber recibido un auto-TPH (66.0 vs 142.0 meses; $p < 0.001$).

En el análisis multivariante, el polimorfismo CD200 rs1131199 permaneció como un factor de riesgo independiente para la SG (Hazard Ratio (HR): 1.8; 95% IC: 1.1–3.2; $p: 0.03$). La tabla 16 muestra los resultados del análisis multivariante.

Cuando se analizaron las causas de muerte según los genotipos CD200 rs1131199 se detectó que la principal razón fue la progresión en ambos grupos genéticos (GG: 61.2% vs agrupados juntos CC y CG: 55.2%), seguido de la infección (GG: 16.3% vs CC+CG: 15.6%) sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ($p: 0.914$).

Tabla 16. Análisis univariante y multivariante de los pacientes con diagnóstico de MM

	Análisis univariante				Análisis multivariante			
	SG HR (95% IC)	P	SLP HR (95% IC)	P	SG HR (95% IC)	P	SLP HR (95% IC)	P
Sexo								
Hombre	1.3 (1.0-1.9)	0.09	1.4 (1.1-1.9)	0.01	1.1 (0.7-1.9)	0.660	1.5 (1.0-2.3)	0.070
Edad agrupada								
>= 66 años	2.4 (1.7-3.4)	<0.001	1.8 (1.4-2.4)	<0.001	1.4 (0.63-3.2)	0.417	1.1 (0.5-2.1)	0.900
Riesgo citogenético								
* Alto	3.3 (1.6-6.8)	<0.001	2.0 (1.1-3.7)	0.03	3.4 (1.6-7.4)	0.002	1.9 (1.0-3.7)	0.006
Estadio ISS								
III	1.9 (1.3-2.8)	0.001	1.8 (1.3-2.4)	<0.001	2.1 (1.2-3.5)	0.007	1.8 (1.2-2.9)	0.007
Auto-TPH								
No auto-TPH	2.4 (1.7-3.5)	<0.001	2.0 (1.5-2.7)	<0.001	1.8 (0.8-4.1)	0.185	1.8 (0.9-3.5)	0.110
Genotipo CD200 rs1131199								
GG	1.5 (1.1-2.2)	0.02	1.1 (0.8-1.5)	0.42	1.8 (1.1-3.2)	0.030	1.0 (0.6-1.5)	0.820

*Riesgo alto: del (17p), t(4;14), t(14;16); Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión; HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza

El análisis de subgrupos mostró que el efecto negativo sobre la SG de el genotipo CD200 rs1131199 GG fue abolido en los pacientes que habían recibido una auto-TPH: la SG a los 5 años fue del 80.8% para los pacientes con el genotipo CD200 rs1131199 GG y 81.7% para los otros genotipos (p: 0.6). Sin embargo, el genotipo GG fue asociado con una mediana de SG significativamente menor en comparación con el genotipo CC+CG cuando solo se considera los pacientes que no han recibido un auto-TPH: 24.8 meses (95% IC: 16.6 – 67.1) vs. 77.5 meses (95% IC: 65.9-111.7), respectivamente (p < 0.001) (Figure 13).

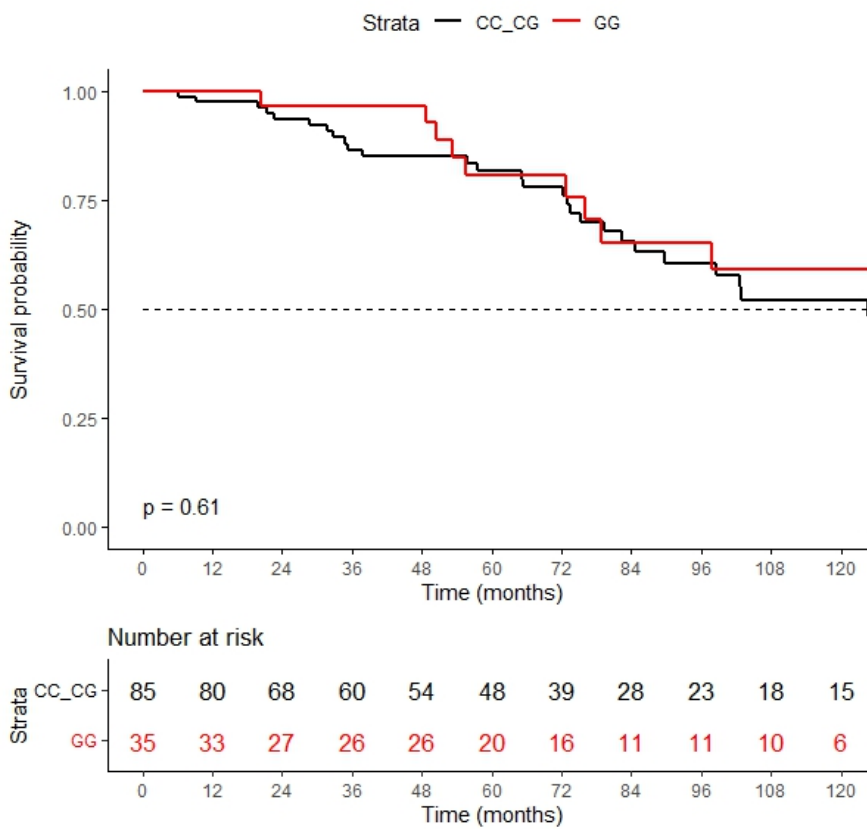


Figura 13A. Supervivencia global según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes que han recibido una auto-TPH

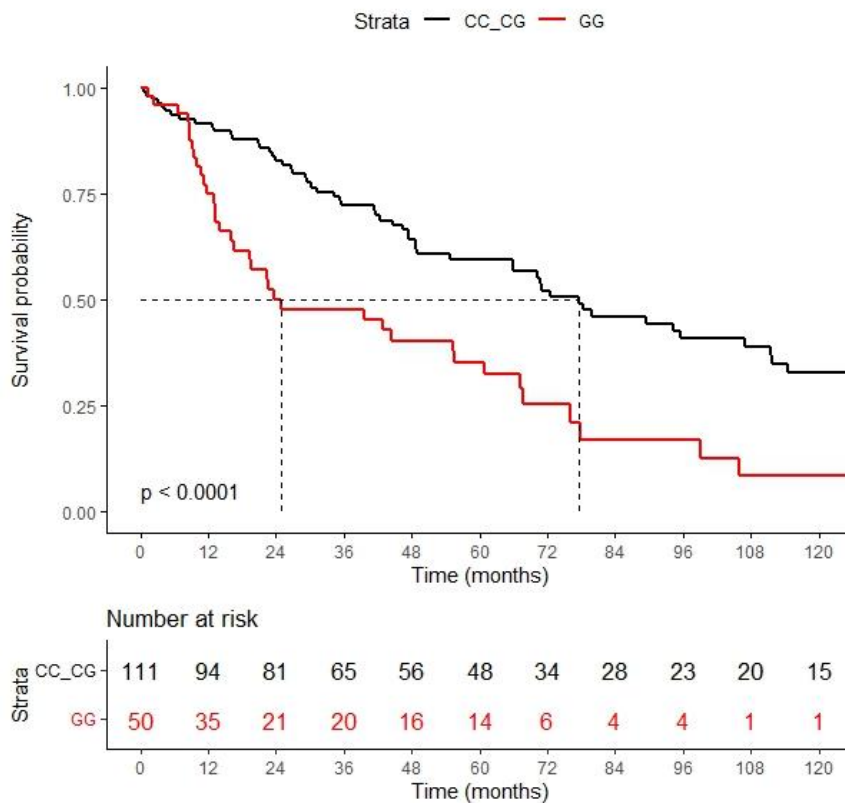


Figura 13B. Supervivencia global según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes que no han recibido una auto-TPH

Cuando consideramos la cohorte global, destacar que la incidencia acumulada de progresión después de la primera línea de tratamiento no fue diferente entre los grupos genéticos (43.1% para pacientes con el genotipo CD200 rs1131199 GG y 45.4% para pacientes con el genotipo CC o CG; $p: 0.399$) (Figura 14). Consecuentemente, la SLP a los 5 años tampoco fue estadísticamente diferente entre los pacientes homocigotos para el alelo G y para aquellos con el genotipo rs1131199 CC o CG genotype (23.0% vs 27.9%; $p: 0.42$). Esta pérdida de correlación se mantuvo cuando se consideró solamente a los pacientes que no habían recibido un auto-TPH, tanto para la incidencia acumulada de progresión ($p: 0.27$) como para la SLP ($p: 0.063$).

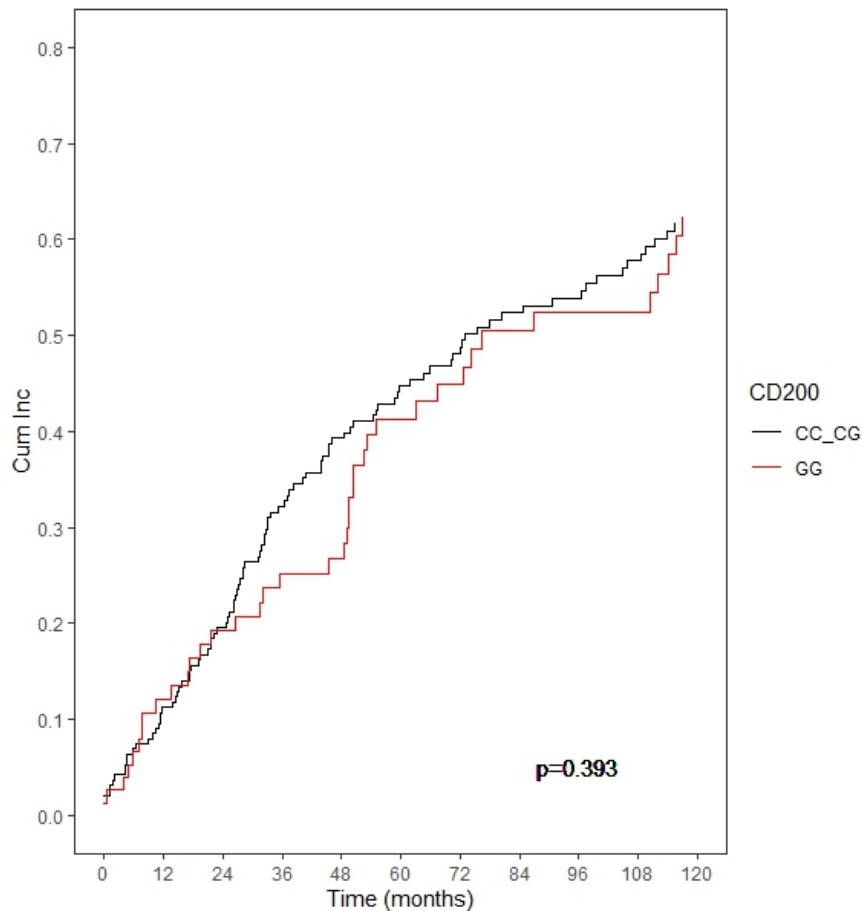


Figura 14. Incidencia acumulada de progresión según genotipo CD200 rs1131199 en los pacientes con diagnóstico de MM

Nuestro objetivo fue determinar las razones asociadas a la peor SG observada en los pacientes que no habían recibido un auto-TPH con el genotipo CD200 rs1131199 GG, para ello se definieron dos situaciones diferentes: a) pacientes que murieron después de documentarse la progresión del MM (muerte asociada con la progresión de la enfermedad) o b) pacientes sin progresión del MM antes de la muerte.

Al considerar a los pacientes que no habían recibido un auto-TPH y que presentaron progresión de la enfermedad, se observó una mayor incidencia acumulada de mortalidad en los pacientes con el genotipo CD200 rs1131199GG en comparación con los genotipos CC o CG, pero esta diferencia no alcanzó la significancia estadística ($p= 0.06$) (Figure 15A). Sin embargo, en el análisis multivariante el genotipo CD200 rs1131199GG se mostró como un factor de riesgo independiente para una mayor mortalidad después de la progresión del MM ($p = 0.007$; HR: 2.1; 95% IC 1.25-3.52). También fueron factores de riesgo para una mayor mortalidad después de

detectarse la progresión de la enfermedad; el alto riesgo citogenético ($p = 0.036$; HR: 3.7; 95% IC 1.5-9.2) y un ISS alto ($p < 0.001$; HR: 2.8; 95% IC 1.2-6.4).

Por otro lado, cuando exploramos la incidencia acumulada de mortalidad en los pacientes que no habían recibido un auto-TPH y sin progresión del MM previamente documentada, las diferencias entre grupos genéticos fueron más evidentes: 21.2% de los pacientes con genotipo CD200 rs1131199 GG vs. 10.5% para los pacientes agrupados con genotipos CC o CG ($p: 0.02$) (Figure 15B). Como la progresión no estaba presente en este grupo de pacientes, la mayoría de ellos murieron a causa de la infección, toxicidad o fallo orgánico. Cuando analizamos las causas de muerte en este grupo encontramos que el 71.4% de los pacientes con genotipo GG murieron de infección (5 de los 12 pacientes), mientras que la infección fue el evento final en solo el 28.6% de los pacientes con el genotipo CG+GG (2 de los 14 pacientes).

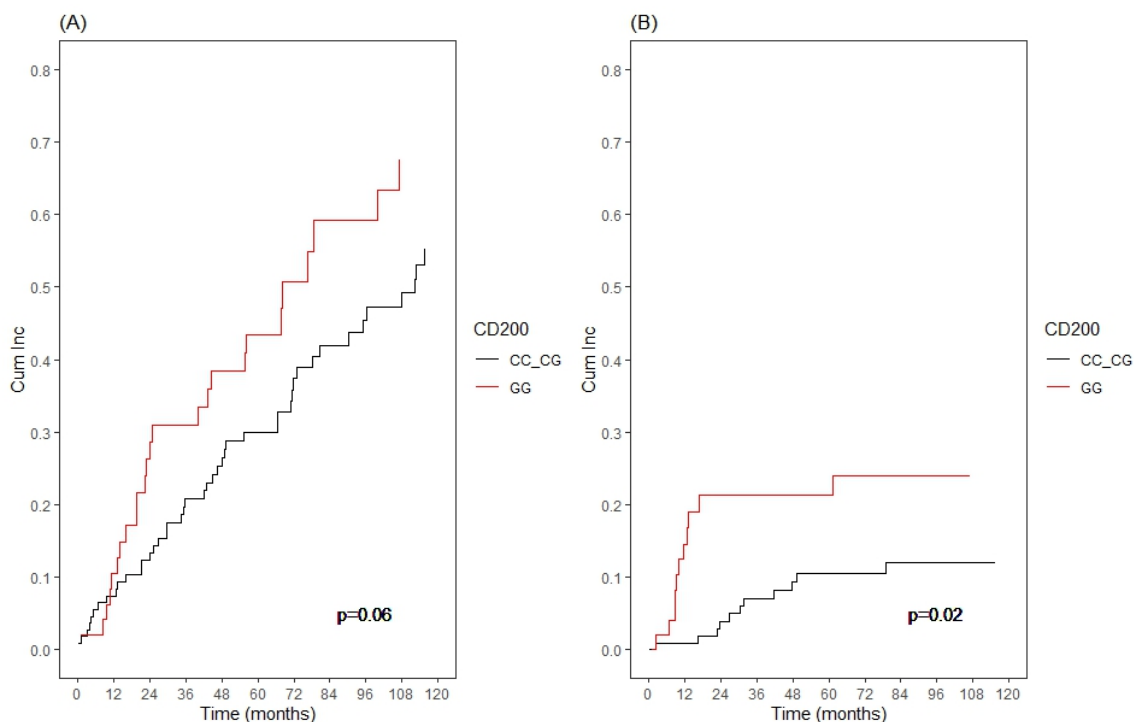


Figura 15. Incidencia acumulada de mortalidad en pacientes que no habían recibido un auto-TPH según genotipo CD200 rs1131199; para aquellos que murieron después de documentar la progresión del MM (**15A**) o para aquellos sin progresión del MM antes de la muerte (**15B**)

No encontramos ninguna asociación significativa entre el polimorfismo CD200 rs2272022 y la SG (AA+AC: 94.4 meses vs CC: 72.8 meses; $p: 0.27$) o SLP (AA+AC: 29.9 meses vs CC: 33.4 meses; $p: 0.97$).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El MM se caracteriza por un estado de inmunosupresión donde el sistema inmune juega un papel primordial tanto en el desarrollo como en el control de la enfermedad. La sobreexpresión de moléculas reguladoras de los puntos de control inmunológico que modulan negativamente la función de los LT se ha reconocido como un mecanismo importante de inmunoevasión de la célula tumoral.

Varios estudios han demostrado una relación entre los polimorfismos genéticos en moléculas coestimuladoras/inhibidoras y la susceptibilidad al desarrollo de MM, sin embargo son pocos los datos disponibles que relacionan polimorfismos de genes reguladores de la respuesta inmune con el pronóstico de estos pacientes.

Un mayor conocimiento de los factores genéticos junto con los factores clínicos posibilita una evaluación más ajustada del riesgo pronóstico de los pacientes con MM de nuevo diagnóstico tras un tratamiento de primera línea. El análisis de las variaciones alélicas de los genes implicados en la regulación de la respuesta inmune permite identificar pacientes con alto riesgo pronóstico. El tratamiento individualizado podría revertir este efecto negativo y aumentar la supervivencia de estos pacientes. Finalmente, en un futuro podría ayudar al desarrollo de un índice pronóstico para el MM.

En el presente trabajo nos planteamos analizar el impacto pronóstico de los polimorfismos en la molécula CTLA-4, BTLA, CD28, PD-1 y CD200 en el marco del MM de nuevo diagnóstico elegible para tratamiento de primera línea. A continuación, serán discutidos el conjunto de resultados obtenidos en los diferentes objetivos planteados y serán revisados de acuerdo con la bibliografía publicada hasta la fecha.

6.1. IMPACTO PRONÓSTICO DEL POLIMORFISMO CTLA4 rs231775

CTLA-4 es una molécula que regula la intensidad y duración de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T. CTLA-4 juega un papel importante en la regulación negativa de la proliferación y activación de los linfocitos T. La molécula CTLA-4 interacciona con el ligando B7 en la superficie de las células presentadoras de antígenos, provocando una parada del ciclo celular del linfocito T y una inhibición de la producción de citoquinas y por consiguiente elimina la fase de proliferación de linfocitos T que es fundamental como respuesta antitumoral.

El gen de CTLA-4 se encuentra en el cromosoma 2q33 y dentro de este gen se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), y algunos de ellos se han relacionado con la capacidad de CTLA-4 para inhibir respuestas inmunes, desempeñando un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (126) o cáncer (127). Los polimorfismos del gen del CTLA-4 se han asociado con un incremento del riesgo de desarrollar MM en comparación con controles sanos emparejados (120,121).

En nuestro estudio hemos detectado una asociación entre el genotipo CTLA4 rs231775 y la SLP. El polimorfismo CTLA4 rs231775 es un SNP no-sinónimo que se encuentra en la región del péptido señal de CTLA-4 y se caracteriza por la sustitución de una treonina a una alanina en el codón 17. Los resultados de nuestro estudio muestran que la presencia del genotipo agrupado CTLA4 rs231775 AA+AG se asocia a una mediana de SLP significativamente más corta que el genotipo GG. Además, la mediana tiempo hasta el siguiente tratamiento fue significativamente menor en el genotipo CTLA4 rs231775 AA+AG. Estos hallazgos pueden ser explicados por el efecto del alelo G, que se asocia a una reducción de la función inhibidora de CTLA en las células T, una menor inhibición de las células T activadas que da lugar a una respuesta inmune más intensa y una inmunovigilancia más fuerte (128,129). Estos resultados necesitan ser confirmados en otras cohortes, debido a la baja incidencia del genotipo rs231775 GG.

Hasta la fecha, solo un estudio realizado en una pequeña cohorte de 82 pacientes de China ha correlacionado variantes genéticas de CTLA-4 con respuesta al tratamiento y supervivencia. Qin X-Y y colaboradores (122) analizaron los polimorfismos -1772(rs733618), -1661 (rs4553808), -318 (rs5742909), CT60(rs3087243) y +49 (rs231775) en 86 pacientes con MM. En este estudio los pacientes con genotipo rs733618 GG que habían recibido tratamiento con esquemas basados en bortezomib presentaban una peor supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Este hallazgo se diferencia de nuestros resultados ya que en nuestra cohorte el polimorfismo genético rs733618 no impactaba en la SLP y SG de los pacientes. Esta discrepancia se explicaría por las diferencias genéticas que existen entre la población asiática y la caucásica. La población estudiada en nuestro trabajo corresponde en su mayoría a caucásica los cuales raramente expresan el genotipo CC CTLA-4rs733618 mientras que en la población china el alelo C es muy prevalente.

Por otro lado, destacar los resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes que habían recibido un auto-TPH en los cuales la presencia del genotipo agrupado AA+AG se asoció con una SLP significativamente peor comparado con los pacientes con el genotipo GG: 35.9 meses (95% CI: 32.6 - 53.7) y no alcanzada, respectivamente (p 0.02). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la SLP en los pacientes que no habían recibido un auto-TPH.

Existe una creciente evidencia de que el beneficio clínico del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos es una consecuencia de la citorreducción con la quimioterapia combinada con los cambios inmunológicos que se producen durante este proceso. Estudios recientes sugieren que el auto-TPH produce efectos inmunomoduladores que incluyen reconstitución inmune, producción de citoquinas inflamatorias, linfopenia, potenciación de la muerte celular inmunogénica, mejor presentación de antígenos e interrupción del microambiente tumoral (130,131). Estos sucesos estimulan el control inmune anti-mieloma y parece que restauran el equilibrio inmunológico. La expansión de clones de células T después del trasplante autólogo y la recuperación temprana de los linfocitos se ha asociado con una mejor SLP sugiriendo que la reconstitución inmune precoz contribuye al control de la progresión de la enfermedad en el MM (131,132).

Consistente con esta observación, en nuestra serie los pacientes con genotipo CTLA4 rs231775 AA/AG mostraron una media de SLP significativamente menor que los pacientes portadores del genotipo GG, siendo más evidente este efecto negativo en los pacientes que han recibido una auto-TPH.

En base a lo referido anteriormente, el estado de enfermedad mínima residual y la linfopenia después del auto-TPH proporcionaría una excelente plataforma para promover la incorporación de terapias basadas en la inmunidad durante el periodo post- trasplante, con el objetivo de inducir o restaurar la repuesta inmune anti-tumor. A pesar de que en el MM las agencias reguladoras de medicamentos no han aprobado el uso de fármacos inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICI), los resultados de nuestro estudio sugieren que terapias basadas en el bloqueo de puntos de control inmunológico podría beneficiar a un subgrupo de pacientes con MM.

En consecuencia, los pacientes con genotipo AA/AG CTLA-4 rs231775 serían candidatos ideales para participar en ensayos clínicos que analicen el impacto clínico de seleccionadas combinaciones de terapias basadas en la inmunidad.

6.2. IMPACTO PRONÓSTICO DEL POLIMORFISMO CD200 rs1131199

CD200 juega un papel importante en el control de la autoinmunidad, la inflamación y las respuestas inmunes. Es una proteína con funciones inmunosupresoras, la unión con su receptor conduce a la secreción inadecuada de citoquinas, incrementa la producción de células supresoras de estirpe mieloide y LT reguladores contribuyendo a la inhibición de las células T efectoras. Es conocido que la proteína CD200 actúa promoviendo las actividades inhibitoras del sistema inmunitario lo

que genera una respuesta inmunosupresora en el microambiente tumoral favoreciendo el crecimiento de algunos cánceres incluido el MM (115,133).

La expresión de CD200 en las células tumorales de algunas enfermedades hematológicas se ha asociado a una peor supervivencia; concretamente en el MM varios estudios han correlacionado niveles altos de expresión de CD200 en las células plasmáticas con un peor pronóstico de la enfermedad. A continuación, se detallan los estudios publicados hasta la actualidad:

Moreaux y colaboradores (118) analizaron la expresión de CD200 en pacientes con MM que habían recibido un auto-TPH y observaron una mejor SLP en los pacientes con CD200 ausente (24 meses) comparado con los pacientes con CD200 presente (14 meses) con independencia del estadio ISS y del valor de beta2-microglobulina. Sugieren que esta mejor SLP podría ser explicada por el efecto inmunosupresor de CD200 y acaban concluyendo que la expresión de CD200 en las células plasmáticas es un factor pronóstico independiente.

Aref y colaboradores (134) analizaron la expresión de CD200 en pacientes de nuevo diagnóstico observando que la expresión de CD200 era significativamente superior en MM con estadio ISS III y que la expresión de CD200 se correlacionaba con mayor porcentaje de células Treg. Además, detectaron que los pacientes con CD200 positivo y mayores niveles de Treg presentaban peor SG y SLP.

Por último, Shi y colaboradores (135) analizaron la expresión de CD200 en pacientes de nuevo diagnóstico que recibieron tratamiento de primera línea detectando una mediana de SG significativamente peor en pacientes con CD200 presente (41 meses) comparado con CD200 ausente (no alcanzada). También analizaron los cambios de expresión de CD200 durante el tratamiento describiendo una mejor supervivencia en los pacientes que se convirtieron a CD200 negativo durante el tratamiento. Como conclusión refieren que la expresión de CD200 es un marcador pronóstico independiente.

En base a estos estudios previos, exploramos la expresión de CD200 en las células plasmáticas tumorales obtenidas al diagnóstico de la enfermedad en una pequeña cohorte de pacientes elegibles para tratamiento. No observamos diferencias significativas en la expresión de CD200 en función del genotipo CD200. Por lo que podemos especular que en nuestra cohorte global las diferencias observadas en la supervivencia global no estarían interferidas por el factor pronóstico asociado al nivel de expresión de CD200.

A pesar de que estudios previos han descrito la correlación entre la expresión de CD200 en las células MM y supervivencia, actualmente no existen estudios que analicen el potencial impacto pronóstico de los polimorfismos en el gen CD200. Este es el primer estudio que muestra una asociación entre el genotipo CD200 y supervivencia global en pacientes con MM.

El gen de CD200 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 (3q13.2) muy cerca de los genes que codifican CD80/CD86. Este gen codifica una glicoproteína de membrana de tipo 1 que contiene dos dominios extracelulares de inmunoglobulinas, una transmembrana y un dominio citoplasmático único.

En nuestro estudio hemos detectado una asociación entre el genotipo CD200 rs1131199 y SG en pacientes con MM de nuevo diagnóstico. Este polimorfismo se caracteriza por la sustitución de una serina a una cisteína en el codón 11 del péptido señal. El efecto biológico de esta sustitución actualmente es desconocido.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la presencia del genotipo rs1131199 CD200 GG se asocia a una mediana de SG significativamente más corta que el genotipo agrupado CC+GG y esta diferencia es más evidente en el grupo de pacientes que no habían recibido un auto-TPH. El análisis de subgrupos mostró que el efecto negativo sobre la SG del genotipo CD200 rs1131199 GG fue abolido en los pacientes que habían recibido una auto-TPH.

Es de interés remarcar que en nuestra serie no encontramos diferencias significativas en la incidencia acumulada de progresión y consecuentemente tampoco en la SLP a diferencia de los resultados obtenidos con el análisis del genotipo de CTLA-4, tal como hemos descritos en el apartado anterior. Estos hallazgos nos hacen suponer que el genotipo estudiado rs1131199 CD200 no está relacionado con el mecanismo de escape de la célula tumoral de la vigilancia inmune.

Sorprendentemente, el genotipo rs1131199 CD200 impactó negativamente en la mortalidad no relacionada con la progresión del MM. Cuando exploramos las posibles causas de la peor SG en el subgrupo de pacientes no trasplantados con el genotipo CD200 rs1131199 GG, observamos que las diferencias de SG fueron más evidentes en el grupo que no había progresado antes de la muerte en comparación con el grupo de pacientes que habían progresado antes de la muerte.

Esta observación sugiere que el genotipo GG resulta en una inadecuada respuesta inmune permitiendo un riesgo aumentado de infección o peor evolución clínica.

En concordancia con nuestra hipótesis, algunos autores hacen referencia al concepto inmunidad pulmonar correlacionando la expresión de CD200 en los macrófagos alveolares con mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas secundarias (136–138). La interacción CD200-CD200R regula negativamente la señalización de los receptores de tipo Toll y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos alveolares, esenciales para mantener la homeostasis inmune. Destacan la importancia de este hecho debido a que durante la infección esta interacción puede conducir a la desensibilización de los ligandos de los receptores de tipo Toll bacterianos, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de NF- κ B en los macrófagos alveolares, contribuyendo así a una mayor susceptibilidad bacteriana secundaria.

Nuestros resultados sugieren que los pacientes con genotipo rs1131199 GG podrían mejorar su supervivencia aplicando una estricta vigilancia de la infección. Desconocemos si bloquear CD200 sería suficiente para restaurar o estimular la respuesta inmune y potencialmente reducir la mortalidad no relacionada con la progresión de la enfermedad. No disponemos de datos previos para dar soporte a esta hipótesis.

Identificar marcadores genéticos de alto riesgo de mortalidad como es el caso del polimorfismo CD200 rs1131199 permitiría instaurar estrategias de tratamiento individualizadas para mejorar el pronóstico de estos pacientes. Acorde con nuestros resultados los pacientes con genotipo rs1131199 GG serían candidatos ideales para participar en ensayos clínicos que analicen el impacto clínico de inmunoterapias combinadas con el objetivo de reducir la mortalidad debido a las infecciones y a la progresión de la enfermedad.

6.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS CON FÁRMACOS INHIBIDORES DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO

En relación con el MM, las terapias basadas en la inmunidad ofrecen un creciente potencial para el control de la célula tumoral y revertir la pérdida de respuesta de las células T anti-tumor. Sin embargo, la experiencia inicial con terapias basadas en el bloqueo de puntos de control inmunológico ha demostrado escasa eficacia, toxicidad y efectos secundarios importantes.

Los resultados preliminares obtenidos en los ensayos clínicos con nivolumab (anticuerpo monoclonal anti-PD1) en MM recaído/refractario fueron muy desalentadores (139). La inmunoterapia con pembrolizumab (anticuerpo monoclonal anti-PD1) no mostró ninguna actividad en los pacientes con MM recaído/refractario, y su combinación con inumomoduladores, lenalidomida o pomalidomida, se asoció a una elevada toxicidad por los efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario y mortalidad (140,141). Del mismo modo, en un ensayo fase I en pacientes con enfermedades hematológicas en recaída/refractaria el uso de nivolumab en combinación con ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4) tampoco demostró resultados favorables en los pacientes con MM (139).

Varios estudios en el MM han investigado el beneficio clínico de los anticuerpos monoclonales ICIs como consolidación después del auto-TPH. Datos preliminares de un ensayo clínico fase I/II con nivolumab en pacientes que habían obtenido una respuesta subóptima después del auto-TPH, describen un 56% de mejoría de la respuesta y una aceptable toxicidad (142). Un estudio fase 2, con pembrolizumab en

monoterapia en pacientes que no alcanzaron la respuesta completa después del auto-TPH se dio por terminado anticipadamente al no cumplir con su objetivo provisional de detectar una diferencia del 20% en la tasa de conversión a respuesta completa al final del tratamiento (143). La combinación de ICIs como consolidación después del auto-TPH, con nivolumab más ipilimumab, fue analizada en un ensayo fase Ib-IIA en pacientes hematológicos. Se incluyó una cohorte de pacientes con MM de nuevo diagnóstico de alto riesgo citogenético; la SLP fue del 57.1% y la SG 87% a los 18 meses. Otra cohorte incluía pacientes que recayeron durante los 3 primeros años del primer auto-TPH pero que habían respondido a la terapia de rescate, la SLP fue del 40% y la SG del 100%. El tratamiento fue bien tolerado sin toxicidad significativa inesperada (144).

En referencia a CD200, algunos estudios en modelos pre-clínicos *in vitro* han proporcionado evidencia que con el bloqueo de la proteína CD200 se obtiene mejoría de la respuesta inmune anti-tumor en neoplasias sólidas y hematológicas (145–147). En cuanto a ensayos clínicos en MM, solamente está publicada la información de un ensayo clínico fase I con samalizumab, un anticuerpo monoclonal recombinante humano dirigido contra CD200, que incluyó pacientes con LLC-B en recaída o refractaria y pacientes con MM. El estudio mostró cierta eficacia en la mayoría de los pacientes con LLC-B avanzada (64% del total LLC-B), pero todos los pacientes con MM presentaron enfermedad progresiva. La dosis máxima tolerada no fue determinada y la severidad de los efectos adversos por samalizumab fueron de moderados a severos. Aunque el ensayo clínico terminó antes de su complementación por causas administrativas, los datos preliminares demuestran la relativa seguridad del fármaco y su potencial para reducir la carga tumoral en pacientes con LLC (148).

Recientemente, Shao A y colaboradores (149) publicaron una revisión sobre la expresión y función de CD200 en el microambiente tumoral, así como estrategias alternativas para la posible neutralización de CD200 en cánceres humanos. Estos autores indican que una probable explicación para el fallo de samalizumab en el ensayo fase I podrían ser los mecanismos alternativos de la actividad protumoral de CD200; haciendo referencia a la vía del CD200/CD200R, mecanismos transcripcionales en relación a la escisión de la cola citoplasmática y al desprendimiento del ectodominio. En base a estas observaciones, sugieren que el bloqueo combinado con otras moléculas ICIs, como CTLA-4 y PD-1 y CD200, podría ser una opción para mejorar sinérgicamente la actividad anti-tumoral y mejorar los resultados.

Por último, TIGIT ha emergido como una atractiva diana para la inmunoterapia en el MM. Estudios recientes en modelos preclínicos han demostrado que el bloqueo de TIGIT con anticuerpos monoclonales incrementa la función efectora de los LT CD8+ y prolonga la supervivencia en pacientes con MM (111,130).

En vista de todo lo anterior, necesitamos de biomarcadores en la práctica clínica diaria que identifiquen aquellos pacientes que podrían beneficiarse del uso de terapias basadas en el bloqueo de puntos de control inmunológico.

Es preciso confirmar el valor de estos biomarcadores con estudios prospectivos que incorporen como objetivo explorar la importancia de los polimorfismos de genes inmunorreguladores y finalmente, determinar si estos datos genéticos podrían ser marcadores predictivos de supervivencia para futuras intervenciones clínicas en los pacientes con MM.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Hemos descrito la frecuencia de los genotipos relacionados con los polimorfismos CTLA4 (rs231775 y rs733618), BTLA (rs9288953), CD28 (rs3116496), PD-1 (rs36084323 y rs11568821), LAG3 (rs870849), CD200 (rs1131199 y rs2272022) en una cohorte de pacientes con mieloma múltiple de nuevo diagnóstico que inician tratamiento de primera línea. La distribución de genotipos no difiere de la previamente descrita en población caucásica.

2. No se pudo establecer ninguna correlación significativa entre los polimorfismos estudiados y la progresión de mieloma múltiple quiescente a mieloma múltiple.

3. El genotipo CTLA4 rs231775 se asoció a una menor supervivencia libre de progresión siendo más evidente esta correlación en los pacientes con mieloma múltiple que habían recibido un trasplante autólogo. Este hecho sugiere su efecto inmune en el control de la enfermedad.

4. El genotipo CD200 rs1131199 se asoció a una menor supervivencia global siendo más evidente esta correlación en los pacientes con mieloma múltiple que no habían recibido un trasplante autólogo. El genotipo CD200 impacta negativamente en la mortalidad no relacionada con la progresión del MM siendo la infección la causa más frecuente. Este hecho sugiere que su efecto inmune no está relacionado con el control de la enfermedad sino con una respuesta inadecuada a la infección.

5. La determinación de los genotipos de CTLA-4 y CD200 podrían considerarse nuevos biomarcadores de riesgo si se validan los resultados en estudios prospectivos.

8. ANEXO

8. ANEXO

I. Anexo

Criterios de respuesta IMWG (2006)⁽⁵⁶⁾

1- Respuesta completa (RC)

Se requieren las 3 condiciones:

- Inmunofijación negativa en suero y orina.
- Desaparición de todos los plasmocitomas de partes blandas.
- < 5% de células plasmáticas en médula ósea.

En pacientes en los que la enfermedad sólo sea medible por las cadenas libres en suero hay que considerar la RC si se alcanza un cociente normal en dos determinaciones consecutivas, además del resto de criterios.

2- Respuesta completa rigurosa (RCr) (*Stringent complete response [sCR]*)

Cumplir los criterios de RC más:

- Cociente de cadenas ligeras libres normal y
- Ausencia de células plasmáticas fenotípicamente aberrantes en la médula ósea por determinación con citometría de flujo multiparamétrica (≥ 4 colores).

3- Muy buena respuesta parcial (MBRP) (*Very good partial response [VGPR]*)

- Proteína M en suero y orina detectable por inmunofijación pero no por electroforesis, o bien
- Reducción de la proteína M en suero $\geq 90\%$ y una cantidad de proteína M en orina menor de 100 mg en 24 horas (0,1 g/24 h).

En pacientes en los que la enfermedad sólo puede medirse mediante las cadenas libres en suero, hay que considerar la MBRP si se consigue una disminución > 90% de la diferencia de niveles entre la cadena afectada y la no afectada con ratio persistentemente anormal.

4- Respuesta parcial (RP)

- Reducción de la proteína M en suero $\geq 50\%$ y reducción de proteína M en orina $\geq 90\%$ o menor de 200 mg en 24 horas (0,2 g/24 h).

Si la proteína M no es medible en suero ni orina, es necesaria una reducción $\geq 50\%$ de la diferencia de niveles entre la cadena ligera afectada y la cadena no afectada, y si las cadenas ligeras libres en suero tampoco son medibles es necesaria una disminución $\geq 50\%$ del porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea siempre que el nivel basal sea $\geq 30\%$.

-Además del criterio previo, si en el momento basal había plasmocitomas medibles de partes blandas, estos tienen que haberse reducido a menos del 50% del tamaño basal.

5- Enfermedad estable (EE) (*Stable disease [SD]*)

No cumple criterios de RC, MBRP o RP, pero tampoco de progresión.

6- Progresión o enfermedad progresiva (EP) (*Progressive disease [PD]*)

- Aumento $\geq 25\%$ respecto al nivel más bajo alcanzado de cualquiera de los siguientes parámetros:

- Proteína M en suero (con aumento absoluto $\geq 0,5$ g/dl).
 - Proteína M en orina (con aumento absoluto ≥ 200 mg/24 h).
 - Para pacientes sin componente M medible ni en suero ni en orina, aumento absoluto ≥ 10 mg/l en la diferencia entre los niveles de cadena ligera afecta y la cadena no afecta.
 - Porcentaje de células plasmáticas en médula ósea (con incremento absoluto $\geq 10\%$).
 - Nuevas lesiones óseas o plasmocitomas de partes blandas o aumento de tamaño de los presentes en el momento basal.
- Aparición de hipercalcemia (calcio sérico corregido $> 11,5$ mg/dl) atribuible únicamente al mieloma.

Todas las categorías de respuesta tienen que ser confirmadas en dos evaluaciones consecutivas. Para el criterio de MBRP y RC se requieren estudios de suero y/o orina independientemente de si la enfermedad al diagnóstico se podía detectar en suero y/o orina.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: A prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.
2. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418-22.
3. Bladé J. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2006 Dec 28;355(26):2765-70.
4. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Melton LJ, Colby CL, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *Lancet*. 2010;375(9727):1721-8.
5. Kyle RA, Durie BGM, Rajkumar S V, Landgren O, Blade J, Merlini G, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*. 2010;24(6):1121-7.
6. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E, et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2002;20:1625-34.
7. Turesson I, Kovalchik SA, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Goldin LR, Drayson MT, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and risk of lymphoid and myeloid malignancies: 728 cases followed up to 30 years in Sweden. *Blood*. 2014;123(3):338-45.
8. Kyle RA, Therneau TM RS. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346:564-9.
9. Rajkumar S V, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, Bradwell AR, Clark RJ, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2010;148(3):491.
10. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 2007;110(7):2586-92.
11. Katzmann, J, Clark, R, Kyle R. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia*. 2013;27:208-12.

12. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538–48.
13. Vélez R, Turesson I, Landgren O, Kristinsson SY, Cuzick J. Incidence of multiple myeloma in Great Britain, Sweden, and Malmö, Sweden: The impact of differences in case ascertainment on observed incidence trends. *BMJ Open.* 2016;6(1):1–5.
14. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* 2016;43(6):676–81.
15. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(1):21–33.
16. Palumbo A AK. Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2011;364:1046–60.
17. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K AS. SEER cancer statistics review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda,MD. SEER. 2020.
18. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74–108.
19. Durie BG. The epidemiology of multiple myeloma. *Semin Hematol.* 2001;38(2 Suppl 3):1–5.
20. Mogollón P, Díaz-Tejedor A, Algarín EM, Paíno T, Garayoa M, Ocio EM. Biological background of resistance to current standards of care in multiple myeloma. *Cells.* 2019;8(11):1–18.
21. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. Multiple myeloma: Biology of the disease. *Blood Rev.* 2010;24(Suppl. 1):S5–11.
22. Bazarbachi AH, Avet-Loiseau H, Szalat R, Samur AA, Hunter Z, Shamma M, et al. IgM-MM is predominantly a pre-germinal center disorder and has a distinct genomic and transcriptomic signature from WM. *Blood.* 2021;138(20):1980–5.
23. Pertesi M, Went M, Hansson M, Hemminki K, Houlston RS, Nilsson B. Genetic predisposition for multiple myeloma. *Leukemia.* 2020;34(3):697–708.
24. Morgan GJ, Johnson DC, Weinhold N, Goldschmidt H, Landgren O, Lynch HT, et al. Inherited genetic susceptibility to multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(3):518–24.
25. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res.* 1994;137(2 Suppl):S68-97.
26. Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, et al. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood.* 2009;113(25):6386–91.

27. Wallin A, Larsson SC. Body mass index and risk of multiple myeloma: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2011;47(11):1606–15.
28. Gavriatopoulou M, Paschou SA, Ntanasis-stathopoulos I, Dimopoulos MA. Metabolic disorders in multiple myeloma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
29. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335–48.
30. Corre J, Cleyngen A, Robiou du Pont S, Buisson L, Bolli N, Attal M, et al. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia*. 2018;32(12):2636–47.
31. Kuehl WM, Bergsagel PL. Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;100707(480):346–52.
32. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3456–63.
33. Bergsagel PL KW. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6333–8.
34. Prideaux S, O'Brien E, Chevassut T. The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Adv Hematol*. 2014;1–16.
35. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I, et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2019;10(1):1–12.
36. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467–72.
37. Cardona-Benavides IJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic abnormalities in multiple myeloma: Prognostic and therapeutic implications. *Cells*. 2021;10(2):1–28.
38. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2014;4(5).
39. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2011;117(2):553–62.
40. Caracciolo D, Di Martino MT, Amodio N, Morelli E, Montesano M, Botta C, et al. miR-22 suppresses DNA ligase III addiction in multiple myeloma. *Leukemia*. 2019;33(2):487–98.
41. Qin Y, Zhang S, Deng S, An G, Qin X, Li F, et al. Epigenetic silencing of miR-137 induces drug resistance and chromosomal instability by targeting AURKA in multiple

- myeloma. *Leukemia*. 2017;31(5):1123–35.
42. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: From bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018;8(1).
 43. Giannakoulas N, Ntanasis-Stathopoulos I, Terpos E. The role of marrow microenvironment in the growth and development of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
 44. Tricot G. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet*. 2000;355(9200):248–50.
 45. Lomas OC, Tahri S, Ghobrial IM. The microenvironment in myeloma. *Curr Opin Oncol*. 2020;32:170–5.
 46. Rifkin RM, Abonour R, Terebelo H, Shah JJ, Gasparetto C, Hardin J, et al. Connect MM registry: The importance of establishing baseline disease characteristics. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2015;15(6):368–76.
 47. Van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet*. 2021;397(10272):410–27.
 48. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV, Durie BGM, Mateos MV, Lonial S, et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. *Lancet Oncol*. 2019;20(6):e302–12.
 49. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842–54.
 50. Greipp PR, San-Miguel J, Dune BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412–20.
 51. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863–9.
 52. D'agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ, Wester R, Bertsch U, Waage A, et al. Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project. *J Clin Oncol*. 2022;364(29).
 53. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: A consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016;127(24):2955–62.
 54. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies F, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis.

- Leukemia. 2019;33(1):159–70.
55. Cerchione C, Usmani SZ, Stewart AK, Kaiser M, Rasche L, Kortüm M, et al. Gene Expression Profiling in Multiple Myeloma: Redefining the Paradigm of Risk-Adapted Treatment. *Front Oncol.* 2022;12:1–10.
 56. Durie BGM, Harousseau JL, San-Miguel J, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20(9):1467–73.
 57. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):e328–46.
 58. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Dingli D, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2013;31(36):4529–35.
 59. Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, Cerdán L, Cedena MT, Puig N, et al. Depth of response in multiple myeloma: A pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials. *J Clin Oncol.* 2017;35(25):2900–10.
 60. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Minimal residual disease predicts superior survival in patients with multiple myeloma: a meta-analysis HHS Public Access. *JAMA Oncol.* 2017;3(1):28–35.
 61. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien ML, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2018;132(23):2456–64.
 62. Mateos MV, Cavo M, Bladé J, Dimopoulos MA, Suzuki K, Jakubowiak A, et al. Daratumumab Plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone Versus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone in Patients with Transplant-Ineligible Newly Diagnosed Multiple Myeloma: Overall Survival in ALCYONE. *Blood.* 2019;134(Suppl. 1):859–859.
 63. Anderson KC, Auclair D, Kelloff GJ, Sigman CC, Avet-Loiseau H, Farrell AT, et al. The role of minimal residual disease testing in myeloma treatment selection and drug development: Current value and future applications. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):3980–93.
 64. Charalampous C, Goel U, Broski SM, Dingli D, Kapoor P, Gertz MA, et al. Utility of PET/CT in assessing early treatment response in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Adv.* 2022;6(9):2763–72.
 65. Zamagni E, Tacchetti P, Cavo M. Imaging in multiple myeloma: How? When? *Blood.* 2019;133(7):644–51.

66. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*. 2011;117(18):4691–5.
67. Cavo M, Terpos E, Nanni C, Moreau P, Lentzsch S, Zweegman S, et al. Role of 18F-FDG PET/CT in the diagnosis and management of multiple myeloma and other plasma cell disorders: a consensus statement by the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):e206–17.
68. Feyler S, Selby PJ, Cook G. Regulating the regulators in cancer-immunosuppression in multiple myeloma (MM). *Blood Rev*. 2013;27(3):155–64.
69. Harrison SJ, Cook G. Immunotherapy in multiple myeloma - Possibility or probability? *Br J Haematol*. 2005;130(3):344–62.
70. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 SUPPL. 2):S3–23.
71. Bluestone JA, Bour-jordan H, Cheng M, Anderson M. T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2250–60.
72. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):1–3.
73. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019;25(1):13–26.
74. Schwartz RH. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(4).
75. Bluestone JA, Anderson M. Tolerance in the Age of Immunotherapy. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1156–66.
76. Sobhani N, Tardiel-Cyril DR, Davtayan A, Generali D, Roudi R, Li Y. CTLA-4 in regulatory T cells for cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1–18.
77. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016;30(45):6347–58.
78. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991–8.
79. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (80)*. 2011;331(6024):1565–70.
80. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10.
81. Motz GT, Coukos G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity*. 2013;39(1):61–73.

82. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2020;30(8):660–9.
83. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: Moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–15.
84. Lagreca I, Riva G, Nasillo V, Barozzi P, Castelli I, Basso S, et al. The Role of T Cell Immunity in Monoclonal Gammopathy and Multiple Myeloma: From Immunopathogenesis to Novel Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):1–19.
85. Casey M, Nakamura K. The cancer-immunity cycle in multiple myeloma. *ImmunoTargets Ther.* 2021;10:247–60.
86. Rawstron AC, Davies FE, Owkn RG, English A, Pratt G, Child JA, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol.* 1998;100(1):176–83.
87. Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassone P, Shamma MA, Allam CK, et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood.* 2006;107(1):301–4.
88. Ogawara H, Handa H, Yamazaki T, Toda T, Yoshida K, Nishimoto N, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res.* 2005;29(2):135–40.
89. Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, Song W, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood.* 2010;115(26):5385–92.
90. García-Sanz R, González M, Orfao A, Moro MJ, Hernández JM, Borrego D, et al. Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol.* 1996;93(1):81–8.
91. Benson DM, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. 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.* 2010;116(13):2286–94.
92. Tai YT, Lin L, Xing L, Cho SF, Yu T, Acharya C, et al. APRIL signaling via TACI mediates immunosuppression by T regulatory cells in multiple myeloma: therapeutic implications. *Leukemia.* 2019;33(2):426–38.
93. Favaloro J, Brown R, Aklilu E, Yang S, Suen H, Hart D, et al. Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(5):1090–8.
94. Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim BG, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: The green light for myeloma immune escape. *Blood Rev.*

- 2016;30(5):341–8.
95. Giallongo C, Tibullo D, Parrinello NL, La Cava P, Di Rosa M, Bramanti V, et al. Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC). *Oncotarget*. 2016;7(52):85764–75.
 96. Zhang L, Tai YT, Ho M, Xing L, Chauhan D, Gang A, et al. Regulatory B cell-myeloma cell interaction confers immunosuppression and promotes their survival in the bone marrow milieu. *Blood Cancer J*. 2017;7(3):2–5.
 97. Brimnes MK, Svane IM, Johnsen HE. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(1):76–84.
 98. Strobl H, Knapp W. TGF- β 1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect*. 1999;1(15):1283–90.
 99. Xia Y, Medeiros LJ, Young KH. Immune checkpoint blockade: Releasing the brake towards hematological malignancies. *Blood Rev*. 2016;30(3):189–200.
 100. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275–87.
 101. Wang L, Wang H, Chen H, Wang W Da, Chen XQ, Geng QR, et al. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(38):41228–36.
 102. Sunakawa M, Tamura H, Ishibashi M, Sasaki M, Handa H, Imai Y, et al. Clinical impact and possible immunosuppressive function of soluble B7-H1 (PD-L1) in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(1):e110–1.
 103. Ishibashi M, Tamura H, Sunakawa M, Kondo-Onodera A, Okuyama N, Hamada Y, et al. Myeloma drug resistance induced by binding of myeloma B7-H1 (PD-L1) to PD-1. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(9):779–88.
 104. Tamura H, Ishibashi M, Sunakawa-Kii M, Inokuchi K. PD-L1-PD-1 pathway in the pathophysiology of multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1–14.
 105. Sponaas AM, Moharrami NN, Feyzi E, Standal T, Rustad EH, Waage A, et al. PDL1 expression on plasma and dendritic cells in myeloma bone marrow suggests benefit of targeted anti PD1-PDL1 therapy. *PLoS One*. 2015;10(10):1–8.
 106. Braga WMT, da Silva BR, de Carvalho AC, Maekawa YH, Bortoluzzo AB, Rizzatti EG, et al. FOXP3 and CTLA4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4+ T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(11):1189–97.

107. Kulikowska de Nałęcz A, Ciszak L, Usnarska-Zubkiewicz L, Pawlak E, Frydecka I, Szmyrka M, et al. Inappropriate expression of PD-1 and CTLA-4 checkpoints in myeloma Patients is more pronounced at diagnosis: Implications for time to progression and response to therapeutic checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
108. Huo JL, Wang YT, Fu WJ, Lu N, Liu ZS. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. *Front Immunol.* 2022;13(July):1–10.
109. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Okazaki T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2).
110. Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends Immunol.* 2017;38(1):20–8.
111. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD81 T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood.* 2018;132(16):1689–94.
112. Liu Z, Xiang C, Han M, Meng N, Luo J, Fu R. Study on Tim3 Regulation of Multiple Myeloma Cell Proliferation via NF- κ B Signal Pathways. *Front Oncol.* 2020;10.
113. Batorov E V, Aristova TA, Sergeevicheva V V, Sizikova SA, Ushakova GY, Pronkina N V, et al. Quantitative and functional characteristics of circulating and bone marrow PD-1- and TIM-3-positive T cells in treated multiple myeloma patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12.
114. Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology.* 2001;102(2):173–9.
115. Kotwica-Mojzych K, Jodłowska-Jędrych B, Mojzych M. Cd200: Cd200r interactions and their importance in immunoregulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1–21.
116. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD. Regulation of Myeloid Cell Function through the CD200 Receptor. *J Immunol.* 2006;176(1):191–9.
117. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented induction of CD4+CD25+ treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation.* 2005;79(4):488–91.
118. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2006;108(13):4194–7.
119. Conticello C, Giuffrida R, Parrinello N, Buccheri S, Adamo L, Sciuto MR, et al. CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: Another piece of the puzzle. *Leuk Res.* 2013;37(12):1616–21.
120. Karabon L, Pawlak-Adamska E, Tomkiewicz A, Jedynak A, Kielbinski M, Woszczyk D,

- et al. Variations in suppressor molecule CTLA-4 gene are related to susceptibility to multiple myeloma in a Polish population. *Pathol Oncol Res.* 2012;18(2):219–26.
121. Zheng C, Huang DR, Liu L, Björkholm M, Holm G, Yi Q, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 microsatellite polymorphism is associated with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2001;112(1):216–8.
 122. Qin XY, Lu J, Li GX, Wen L, Liu Y, Xu LP, et al. CTLA-4 polymorphisms are associated with treatment outcomes of patients with multiple myeloma receiving bortezomib-based regimens. *Ann Hematol.* 2018;97(3):485–95.
 123. Lee KM, Baris D, Zhang Y, Hosgood HD, Menashe I, Yeager M, et al. Common single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes and multiple myeloma risk among women in Connecticut. *Am J Hematol.* 2010;85(8):560–3.
 124. Woszczyk D, Partyka A, Kielbinski M, Frydecka I, Karabon L. Study of ICOS gene polymorphisms associations with the risk and clinical course of multiple myeloma. *Postepy Hig Med Dosw.* 2019;73:165–72.
 125. Kasamatsu T, Awata M, Ishihara R, Murakami Y, Gotoh N, Matsumoto M, et al. PDCD1 and PDCD1LG1 polymorphisms affect the susceptibility to multiple myeloma. *Clin Exp Med.* 2020;20(1):51–62.
 126. Ueda H, Howson JMM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003;423(6939):506–11.
 127. Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer Res.* 2008;68(17):7025–34.
 128. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkhalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46478–86.
 129. Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* 2001;2(3):145–52.
 130. Minnie SA, Kuns RD, Gartlan KH, Zhang P, Wilkinson AN, Samson L, et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood.* 2018;132(16):1675–88.
 131. Minnie SA, Hill GR. Autologous Stem Cell Transplantation for Myeloma: Cytoreduction or an Immunotherapy? *Front Immunol.* 2021;12(March):1–7.
 132. Jimenez-Zepeda VH, Reece DE, Trudel S, Chen C, Franke N, Winter A, et al. Absolute

- lymphocyte count as predictor of overall survival for patients with multiple myeloma treated with single autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(9):2668–73.
133. Xiong Z, Mesias EA, Elizabeth Pluhar G, Rathe SK, Largaespada DA, Sham YY, et al. CD200 checkpoint reversal: A novel approach to immunotherapy a C. *Clin Cancer Res*. 2020;26(1):232–41.
 134. Aref S, Azmy E, El-Gilany AH. Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2017;35(1):51–7.
 135. Shi Q, Wu C, Han W, Zhao S, Wu Y, Jin Y, et al. Clinical significance of CD200 expression in newly diagnosed multiple myeloma patients and dynamic changing during treatment. *Leuk Lymphoma*. 2021;62(3):709–15.
 136. Rodriguez-Rodriguez L, Gillet L, Machiels B. Shaping of the alveolar landscape by respiratory infections and long-term consequences for lung immunity. *Front Immunol*. 2023;14(April):1–18.
 137. Goulding J, Godlee A, Vekaria S, Hilty M, Snelgrove R, Hussell T. Lowering the threshold of lung innate immune cell activation alters susceptibility to secondary bacterial superinfection. *J Infect Dis*. 2011;204(7):1086–94.
 138. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med*. 2008;205(2):323–9.
 139. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: Preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2698–704.
 140. Mateos MV, Blacklock H, Schjesvold F, Oriol A, Simpson D, George A, et al. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6(9):e459–69.
 141. Usmani SZ, Schjesvold F, Oriol A, Karlin L, Cavo M, Rifkin RM, et al. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naive multiple myeloma (KEYNOTE-185): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6(9):e448–58.
 142. Pirogova O, Darskaya E, Porunova V, Kudyasheva O, Babenko E MN. Results of phase I/II study of nivolumab with autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma patients with suboptimal response to primary induction therapy. *EHA Libr*. 2019;267013(PS1396):640–1.

143. D'Souza A, Hari P, Pasquini M, Braun T, Johnson B, Lundy S, et al. A Phase 2 Study of Pembrolizumab during Lymphodepletion after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(8):1492–7.
144. Skarbnik AP, Donato ML, Feinman R, Rowley SD, Vesole DH, Goy AH, et al. Safety and Efficacy of Consolidation Therapy with Ipilimumab Plus Nivolumab after Autologous Stem Cell Transplantation. *Transplant Cell Ther.* 2021;27(5):391–403.
145. Gorczynski RM, Clark DA, Erin N, Khatri I. Role of CD200 expression in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(1):49–60.
146. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, et al. CD200 Expression on Tumor Cells Suppresses Antitumor Immunity: New Approaches to Cancer Immunotherapy. *J Immunol.* 2007;178(9):5595–605.
147. Gorczynski RM, Chen Z, Khatri I, Podnos A, Yu K. Cure of metastatic growth of EMT6 tumor cells in mice following manipulation of CD200: CD200R signaling. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;142(2):271–82.
148. Mahadevan D, Lanasa MC, Farber C, Pandey M, Whelden M, Faas SJ, et al. Phase I study of samalizumab in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: Blockade of the immune checkpoint CD200. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1–13.
149. Shao A, Owens DM. The immunoregulatory protein CD200 as a potentially lucrative yet elusive target for cancer therapy. *Oncotarget.* 2023;14:96–103.

