

Proteína CD200 de mal pronóstico en pacientes con mieloma múltiple

Vela-Ojeda J,^{a,b} García-Ruiz Esparza MA,^a Padilla-González Y,^a
Pérez-Retiguín F,^a Reyes-Maldonado E,^b Maillet D,^b Montiel-Cervantes LA^{a,b}

CD200 protein, bad prognostic in patients with multiple myeloma

Background: Multiple myeloma (MM) is a monoclonal gammopathy characterized by abnormal proliferation of malignant plasma cells. The median overall survival rate has changed from 2-3 to 5-6 or more years with the introduction of novel agents. Recently CD200 protein has been described as an immunosuppressive protein that confers a poor prognostic factor in several neoplastic diseases, including MM. The purpose of our study was to determine CD200 protein in plasma cells of newly diagnosed patients with MM and in CD3+ lymphocytes of healthy donors.

Methods: 35 newly diagnosed MM patients and 25 healthy donors were studied. For flow cytometry tests, a FACS Calibur device and CellQuest-Pro software were used. Monoclonal antibodies for CD38 (PeCyC5), CD138 (APC), and CD200 (PE) were used. The statistical analysis was performed with SPSS 19v. Mann-Whitney U test, Kaplan-Meier survival curves with Log-Rank tests were done when indicated.

Results: The frequencies of anemia, hypercalcemia, increased in LDH, serum creatinine and b2-microglobulin were 68%, 34%, 20%, 22% and 45% respectively. The treatment consisted in MPT 20 (57%), Thal-Dex 8 (23%), and VAD 7 (20%). Five patients (14%) achieved complete response, 17 (49%) partial response, and 13 (37%) minor response or failure to treatment.

Conclusions: CD200 is a poor prognostic factor for overall survival in multiple myeloma patients. Bone marrow CD3 lymphocytes from MM patients express CD200 protein in higher proportion than healthy donors.

Keywords Palabras clave

Anemia	Anemia
Multiple myeloma	Mieloma múltiple
Survival	Supervivencia

El mieloma múltiple (MM) es una gammopatía monoclonal maligna caracterizada por la proliferación anormal de células plasmáticas malignas, las cuales son productoras de proteína monoclonal y que, en conjunto con las células del estroma de la médula ósea, secretan citocinas y factores de crecimiento que son los responsables del cuadro clínico de esta enfermedad.¹

El promedio de vida de estos pacientes es de 2 a 3 años, sin embargo, a partir del año 1998 con el uso de nuevos medicamentos (talidomida, bortezomib, y lenalidomida) y del trasplante de células hematopoyéticas, la mediana de supervivencia se ha duplicado, y en algunos casos se ha convertido en una enfermedad crónica.²

En esta enfermedad existen factores pronósticos bien reconocidos que permiten predecir la gravedad de la enfermedad. Recientemente se ha descrito que la proteína CD200 pudiera jugar un papel importante en la biología, inmunología, y pronóstico de esta enfermedad.

La CD200 es una proteína de membrana tipo Ia que está relacionada con la familia de receptores coestimuladores de B7. Contiene dos dominios extracelulares, una región transmembrana y una cola citoplásmica con función aún no del todo conocida.

Forma parte de la superfamilia de inmunoglobulinas y se expresa comúnmente en células de linaje mieloide como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos. Sin embargo, también se ha encontrado expresada en linfocitos B, linfocitos T activados, células endoteliales y en células de órganos reproductores.³

Por otro lado, la expresión del receptor de CD200 (CD200R) se limita a células de linaje mieloide y linfocitos T.³

La CD200 juega un importante papel en el control de la autoinmunidad, la inflamación y en las respuestas inmunes adaptativas.

Se sabe bien que la CD200 es una molécula inmunosupresora, pues la unión a su receptor conduce a disminución en la secreción de citocinas por parte de algunos macrófagos como: IL-13, TNFα, IFNα, e IL-17.^{4,5}

^aDepartamento de Hematología, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social

^bDepartamento de Morfología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

Distrito Federal, México

Comunicación con: Jorge Vela-Ojeda
Teléfono: (55) 5782 1088, extensión 23213
Correo electrónico: jorge.vela@imss.gob.mx

Recibido: 22/10/2014

Aceptado: 06/03/2015

Resumen

Introducción: el mieloma múltiple (MM) es una gamopatía monoclonal caracterizada por la proliferación anormal de células plasmáticas malignas. La proteína CD200 se ha descrito como una proteína con funciones inmunosupresoras y que es un factor de mal pronóstico en algunas enfermedades malignas, incluyendo al MM. El objetivo de este artículo es determinar la cantidad de proteína CD200 en células plasmáticas de pacientes con MM de reciente diagnóstico y en linfocitos CD3+ de donadores sanos.

Métodos: se estudiaron 35 pacientes con diagnóstico reciente de MM y 25 individuos sanos. Se usaron los anticuerpos monoclonales para CD38 (PeCyC5), CD138 (APC), y CD200 (PE). El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 19v. Se utilizaron

las pruebas estadísticas U de Mann Whitney, curvas de supervivencia de Kaplan y Meier y la prueba de log-rank.

Resultados: las frecuencias de anemia, hipercalcemia, elevación de DHL, creatinina sérica y beta-2 microglobulina fueron de 68%, 34%, 20%, 22% y 45% respectivamente. El tratamiento administrado fue MPT 20, Tal-Dex 8, y VAD 7. Cinco pacientes lograron respuesta completa, 17 respuesta parcial, y 13 respuesta menor o falla al tratamiento.

Conclusiones: el CD200 es un factor de mal pronóstico para supervivencia global en pacientes con mieloma múltiple. Los linfocitos CD3+ de médula ósea de pacientes con MM expresan en mayor proporción CD200 en comparación con sujetos sanos.

Asimismo, con el uso de anticuerpos antiCD200R, se induce el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas y como consecuencia, la inducción de las células T reguladoras que inhiben a los linfocitos T citotóxicos.⁶

Se ha descrito a la CD200 como una proteína que es factor pronóstico en enfermedades hematológicas como MM y leucemia mielobástica aguda.^{7,8}

Moureaux *et al.* han demostrado que en pacientes con mieloma múltiple la expresión de CD200 se observa en el 78 % de los pacientes de diagnóstico reciente y que su expresión se correlaciona con supervivencia libre de evento corta (14 meses frente a 24 meses), independientemente de otros factores de pronóstico adverso como estadio 3 del Sistema Internacional de Estadaje (ISS) y beta 2 microglobulina.⁹

Oltenau *et al.*⁹ han demostrado que existe correlación entre la expresión de CD200 y la edad mayor a 65 años, y con niveles bajos de DHL y hemoglobina.

Asimismo, se ha descrito que por medio de la inmunohistoquímica realizada en biopsias de médula ósea de pacientes con MM, el 80 % de las muestras que contienen más de 50 % de células plasmáticas malignas CD138 positivas expresan CD200 en la membrana de forma difusa en diversos grados de intensidad de tinción, variando desde débil (+) hasta fuerte (+++).¹⁰

Métodos

Se llevó a cabo un estudio clínico prospectivo y comparativo, cuyo objetivo principal fue determinar la expresión de CD200 en células de pacientes con MM; se estudiaron 35 pacientes con diagnóstico de MM *de novo* que ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza del IMSS de julio de 2008 a febrero de 2010, y 25 sujetos sanos pareados por edad y sexo.

Se tomaron muestras de sangre periférica en pacientes y sujetos sanos, y de médula ósea en pacientes con MM. Se cuantificaron las células nucleadas en el analizador automático para biometría hemática modelo Coulter (Immunotech, Marsella, Francia).

Para la detección de marcadores de superficie se utilizó el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton-Dickinson), se colocaron 5000-10 000 x 10⁶/L células mononucleares viables en 100 uL de amortiguador de fosfatos, asimismo, se adicionaron 10 uL del anticuerpo específico marcado y 1 mL de solución de lisis (1:10) (Becton-Dickinson), así como 2 mL de amortiguador de fosfatos, el cual se

Cuadro I Características de los pacientes con MM

Variable	N = 35
Edad (mediana, min-máx)	60 (38-82)
Género (masculino/femenino)	18/17
MM IgG	18 (51 %)
IgA	9 (25 %)
ECL	8 (22 %)
Bence Jones +	21 (60 %)
Estadio II/III	6 (17 %)/29 (83 %)
Tratamiento	
MPT	20 (57 %)
Tal-Dex	8 (23 %)
VAD	7 (20 %)

ECL = enfermedad de cadenas ligeras; MPT = melfalán, prednisona, talidomida; Tal-Dex = talidomida y dexametasona; VAD = vincristina, adriamicina y dexametasona

Cuadro II Valores de laboratorio de pacientes con MM

Variable	Media, (min-máx)	
Hemoglobina g/dL	9.8	(3.3-14.5)
Plaquetas uL	248 000	(69.900-521.000)
Creatinina sérica mg/dL	1.47	(0.6-5.1)
Células plasmáticas médula ósea %	61.4	(11-100)
Beta 2 microglobulina mg/L	5.6	(1.4-17.3)
IL-6 sérica (pg/mL)	59.8	(1.4-77.3)
DHL (U/L)	300.5	(179-500)

IL-6 = Interleucina 6; DHL = Deshidrogenasa láctica

resuspendió, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 0.8 mL de amortiguador de fosfatos, más 0.2 mL de paraformaldehído al 1 %.

Para las muestras de médula ósea de los pacientes se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD38 (PeCyC5), CD138 (APC), y CD200 (PE).

El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando el programa CellQuest Pro.

Para evaluar la expresión de CD200 en células de mieloma múltiple de pacientes se realizó la tinción

en un tubo con los anticuerpos antiCD138, CD38, y CD200. Asimismo, se seleccionó la región R1 de las células de interés a partir de una gráfica tipo dot plot de SSC-A frente a FSC-A para eventos totales (NO GATE).

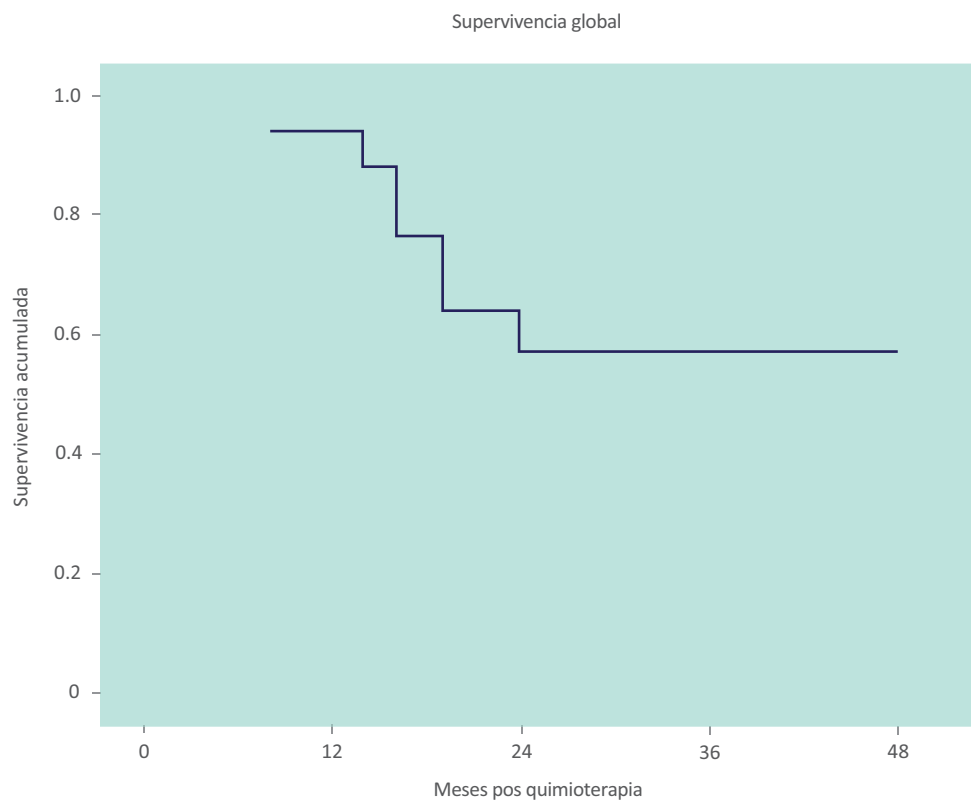
A partir de R1 se determinó la expresión de los marcadores CD38, CD200 y CD138. Para el caso de CD200 se determinó la coexpresión de CD200 y CD138, y se definió a las células plasmáticas con expresión de CD200 como aquellas CD138+ CD200+ (> 30 %).

Para la determinación de la proteína CD200 en linfocitos CD3+ en sangre periférica y médula ósea se realizó la tinción en un tubo conteniendo antiCD3 y antiCD200.

Para el análisis se seleccionó la región linfóide R1 (CD3+) a partir de una gráfica de SSC-A frente a CD3 (NO GATE), a partir de R1 se determinó la expresión de CD200. Se definió a los linfocitos T que expresan CD200 como las células CD3+ CD200+ (> 30 %).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 19. Las diferencias entre expresión de proteína CD200 en linfocitos de sangre periférica de pacientes con MM y sujetos sanos fueron analizadas con la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 1 Supervivencia global en pacientes con MM

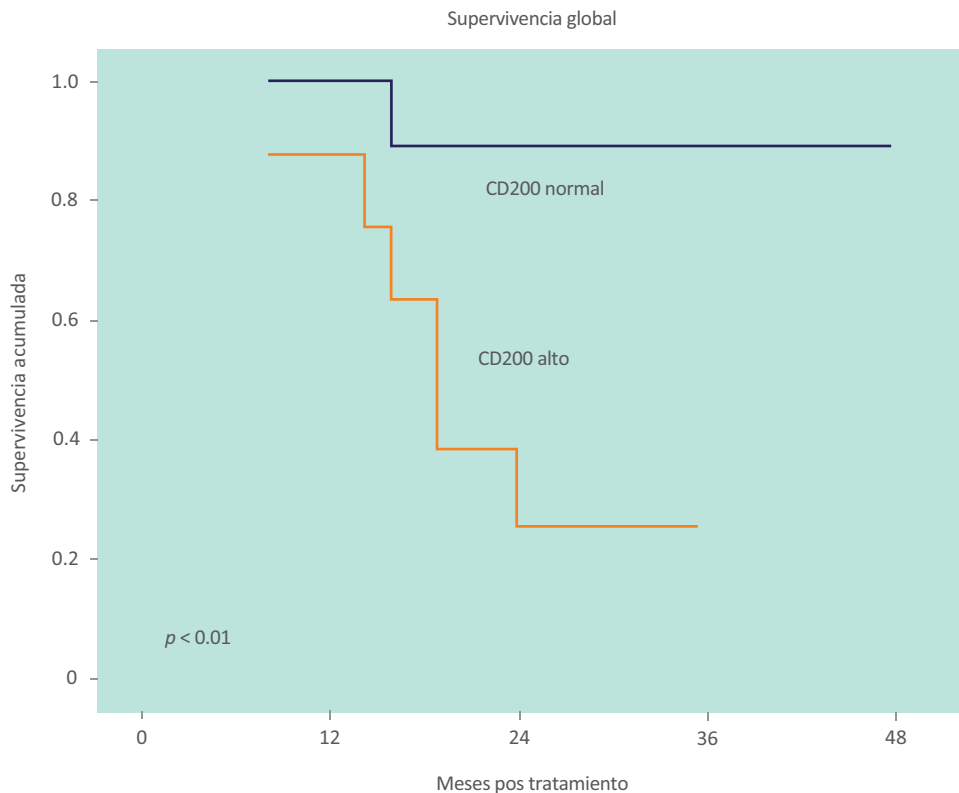


Figura 2 Supervivencia global en pacientes con MM de acuerdo a la expresión de CD200 en células plasmáticas

Las curvas de supervivencia fueron generadas por el método de Kaplan-Mier y las diferencias entre las curvas se analizaron con la prueba de log-rank.

Se definió la supervivencia global (SG) como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte o último contacto documentado del paciente. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo en todos los análisis.

Resultados

Las características clínicas de los pacientes con MM se resumen en el cuadro I y los parámetros de laboratorio en el cuadro II.

Se estudiaron 35 pacientes con diagnóstico clínico de mieloma múltiple, de los cuales, 23 fueron hombres y 12 mujeres, la media de edad fue de 60 años (rango de 38-82 años), así como 25 donadores sanos de los cuales 16 fueron masculinos y 9 del sexo femenino, con una edad media de 55 años (rango de 29-60 años).

Un total de veinticuatro pacientes (68 %) presentaron anemia, 6 (17 %) trombocitopenia, 7 (20 %) DHL elevada, 12 (34 %) hipercalcemia, 8 (22 %) elevación de creatinina sérica > 2.0 mg/dL, y 16 (45 %) elevación de beta 2 microglobulina (> 5.5 mg/L) al diagnóstico.

El tratamiento que les fue administrado consistió en: melfalán, prednisona y talidomida en 20 pacien-

tes (57 %), talidomida-dexametasona en 8 (23 %), y vincristina, adriamicina y dexametasona en 7 pacientes (20 %).

En 5 pacientes (14 %) se logró remisión completa, en 17 (49 %) remisión parcial, y en 13 (37 %) se obtuvo respuesta menor o falla al tratamiento.

Un total de 25 pacientes (72 %) con MM expresaron positividad para proteína CD200 en la superficie de las células plasmáticas en porcentaje mayor a 30 %. La intensidad de fluorescencia se expresó de forma heterogénea.

No se observaron diferencias clínicas entre los pacientes con expresión aumentada de proteína CD200, a excepción de hipercalcemia (media calcio sérico de 10 mg % en proteína CD200 normal, 10.6 mg % en CD200 alto).

La media de supervivencia global fue de 34.6 meses (IC: 95 %, 27 - 42.2 meses) (figura 1). Los pacientes que presentaron CD200 positivo en las células plasmáticas tuvieron una supervivencia global menor en comparación con los pacientes sin expresión de CD200 (44.4 meses, IC: 95 %, 37.8 - 51.0 frente a 21.5 meses, IC: 95 % 14.9 - 28.0, $p < 0.01$) (figura 2).

Del total de donadores que se clasificaron como sanos, el 22 % expresó débilmente CD200 en linfocitos T CD3+, en comparación con el 80 % de los linfocitos de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple.

Discusión

Las células malignas que expresan CD200 pueden interactuar a través de su receptor CD200R con los macrófagos tipo M2 y provocar la secreción de IL-10, la cual es una citocina que ejerce una acción inmunorreguladora en los linfocitos T citotóxicos, que inhibe parte de la respuesta inmune antitumoral.¹¹

Se ha sugerido también que la CD200 es una proteína que se expresa en células progenitoras de cáncer (*cancer stem cells*) induciendo resistencia a la quimioterapia y evadiendo la respuesta antitumoral del sistema inmune en varios tipos de cáncer como próstata, mama, colon, y cerebro.¹²

Otros autores han sugerido que la CD200 se encuentra presente en las células mesenquimales de la gelatina de Wharton, células que poseen propiedades inmunoregulatoras.¹³

Moureaux *et al.* han demostrado, a través de los perfiles de expresión de genes, que la CD200 proteína se encuentra sobreexpresada en varios tipos de neoplasias como cáncer renal, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer testicular, mesotelioma maligno, cáncer de colon, gammopatía monoclonal de significado incierto, mieloma indolente, y en leucemia linfocítica crónica.¹⁴

En nuestro estudio, la CD200 estuvo sobreexpresada en las células plasmáticas de los pacientes, al igual que lo reportado por Moreaux *et al.*⁷ Sin embargo, a diferencia de lo obtenido por estos autores, encontramos que la CD200 estuvo significativamente sobreexpresada en los linfocitos CD3+ de médula ósea de los pacientes en comparación con los donadores sanos.

Los niveles de expresión de CD200 en las células plasmáticas correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de CD200 en los linfocitos CD3+ de médula ósea de los pacientes con MM, por lo que

se deduce que la expresión de CD200 es directamente proporcional en células plasmáticas y linfocitos T CD3+ de la médula ósea de estos pacientes.

Asimismo, los niveles de expresión de CD200 correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de CD138 en las células plasmáticas de médula ósea (datos no mostrados), por lo que podemos deducir que la expresión de CD200 es más alta en las células plasmáticas con elevada expresión de CD138.

El porcentaje de pacientes con expresión de CD200 puede variar de 72 a 86 % de acuerdo a la metodología de laboratorio que se utilice, ya sea citometría de flujo, inmunohistoquímica o perfil de expresión de genes. En nuestro estudio fue de 72 %, parecido a lo reportado por otros autores.¹⁵⁻¹⁷

Es de particular importancia que en nuestro estudio los pacientes con MM cuyas células malignas expresaron CD200 tuvieron menor supervivencia global que los que no expresaron CD200. Este hallazgo ha sido reportado por Moureaux *et al.*⁷ y corroborado por nosotros.

Nuestro estudio fue realizado contando con un grupo reducido de pacientes (35), por lo que se sugiere que los resultados deben reproducirse en una cohorte que cuente con un tamaño de muestra mayor.

En conclusión, la CD200 es una proteína expresada en 72 % de los pacientes con MM y es un factor de pronóstico adverso en estos pacientes. La CD200 se expresa también en linfocitos T CD3+ de médula ósea de pacientes con MM, lo cual puede ser otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, *et al.* Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78(1):21-33.
- Mikhael JR, Dingli D, Roy V, *et al.* Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013;88(4):360-76.
- Wright G.J. *et al.* Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and the interactions with CD200. *J. Immunol* 2003;171:3034-3046.
- Jenmalm M.C. *et al.* Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J. Immunol.* 2006; 176:191-199.
- Cherwinski H.M. *et al.* The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J. Immunol.* 2005;174:1348-1356.
- Gorczynski R.M. *et al.* Induction of tolerance-inducing antigen-presenting cells in bone marrow cultures in vitro using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* 2004;77:1138-1144.
- Moreaux J. *et al.* CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006;108:4194-4197.
- Tonks A. *et al.* CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007;21:566-568.
- Olteanu H, Harrington AM, Hari P, Kroft SH. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br J Haematol* 2011;153 (3) :408-411.
- Conticello C, Giuffrida R, Parrinello N. *et al.* CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: Another piece of the puzzle. *Leuk Res* 2013;37:1616-1621.
- Liao KL, Bai XF, Friedman A. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J Theoret Biol* 2013;328:65-76.

12. Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364:778-782.
13. Najjar M, Raicevic G, Jebbawi F, Bruyn CD, Meuleman N, Bron D, Tounouz M, Lagneaux L. Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. *Immunol Lett* 2012;146:50-56.
14. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:117-22.
15. Olteanu H, Harrington AM, Hari P, Kroft SH. CD200 expression in plasma cellmyeloma. *Br J Haematol* 2011;153(3):408-11.
16. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in b cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2010;134(5 (November)):726-33.
17. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, *et al.* Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012;137:93-100.