

Determinación de los marcadores de apoptosis en pacientes con mieloma múltiple de novo

Palabras clave: Mieloma múltiple, apoptosis, marcadores, determinación, caspasas, Bcl2, anexina V, CD 200, CD38, CD138, citometría de flujo, CD95, células plasmáticas.

Key words: Multiple myeloma, apoptosis, scores, overall, caspases, Bcl2, annexin V, CD 200, CD38, CD138, flow cytometry, CD95, plasma cells.

Rita Gutiérrez Hernández

Correspondencia:

E-mail: rit_gu@yahoo.com.mx

Recibido: 02/09/2009
Aceptado: 21/09/2009

235

Resumen

Antecedentes: El mieloma múltiple es una neoplasia de células plasmáticas; representa alrededor de 1% de todas las neoplasias y 10% de los tumores hematológicos. En Estados Unidos se diagnostican anualmente 14,000 casos nuevos. Su incidencia en México es de 0.4 casos nuevos por cada 100,000 habitantes, con una media en supervivencia de 24-36 meses, que depende de factores pronósticos asociados a la enfermedad; algunos de ellos son marcadores específicos que están presentes o ausentes en las células tumorales del paciente al momento del diagnóstico. Actualmente se han propuesto nuevos factores pronósticos, entre ellos la expresión de CD200 y su asociación con apoptosis para inducción de la intolerancia inmune. Por ello la importancia de determinar los marcadores apoptóticos (anexina V, Bcl-2, caspasa 3, CD95) en médula ósea de pacientes con mieloma múltiple, mediante la citometría de flujo. **Objetivo:** Cuantificar marcadores de apoptosis anexina V, Bcl-2, caspasa 3, CD95, por citometría de flujo en muestras de médula ósea (MO) en

Abstract

Background: Multiple myeloma is a plasma cells malignancy, represents about 1% of all malignancies and 10% of hematological malignancies. In United States there are 14,000 annual cases. In Mexico there are 0.4 new cases per 100,000 people, with a mean survival of 24-36 months depending on prognostic factors associated with the disease, some are specific markers and can be present in cells patients tumor at diagnosis. Actually, there are proposals to new prognostic factors, including the expression of CD200 and its association with apoptosis to induction of immune intolerance; that is the importance of identifying apoptotic markers (annexin V, Bcl-2, caspase 3, and CD95) in bone marrow of patients with myeloma using flow cytometry. **Objective:** To quantify apoptosis marker annexin V, Bcl-2, caspase 3, CD95, using flow cytometry in samples of bone marrow (BM) in patients with novo multiple myeloma. **Material and method:** Transversal, prospective study conducted at «La Raza» National Medical Center in México. Twenty two patients were admit-

pacientes con mieloma múltiple de novo. **Material y método:** Estudio transversal, prospectivo realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional «La Raza». Fueron estudiados 22 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple de novo que ingresaron al Servicio de Hematología Adultos, entre mayo y octubre del 2008. Se cuantificó los marcadores de apoptosis (anexina V, Bcl-2, caspasa 3, CD95) y CD200. Mediante un citómetro de flujo modelo FACSCalibur de Becton Dickinson en el programa de «Cell Quest Pro». **Resultados:** El total de pacientes incluidos con diagnóstico de mieloma múltiple (MM) en el estudio fueron 22, 16 (72.7%) hombres y seis (27.3%) mujeres, con edad media de 59.13 años. La determinación de marcadores se realizó en 15 pacientes, ya que las muestras de los otros siete casos estaban coaguladas. En la determinación de marcadores de apoptosis se encontró Bcl-2 alto en 59.95% y bajo en 40.5% de los casos; caspasa 3 alto en 80.0% y normal en 20.0%; CD38 normal en 6.7% y alto en 93.6%; CD138 normal en 33.3% y alto en 66.57; CD95 alto en 26.63% y normal 73.37%. El coeficiente de correlación entre la expresión de CD200 y CD95 mostró que a mayor expresión de CD200, mayor expresión de CD95 con $p < 0.043$; 45.5% de los pacientes fueron doblemente positivos para CD38 y CD138. **Conclusiones:** De las variables analizadas, mostró tener correlación estadística importante la relación entre la expresión de CD200 y CD95, encontrando que a mayor expresión de CD200 mayor expresión de CD95. Otro punto importante son los pacientes doblemente positivos para CD38 y CD138 (67% de los casos). La correlación entre Bcl2 y CD138 mostró que a mayor Bcl2 menor CD138. Es importante aumentar el tamaño de la muestra y el tiempo de seguimiento, por lo menos a tres años para poder valorar supervivencia y valor pronóstico de los marcadores de apoptosis en relación con el desenlace de la enfermedad. Establecer valores de referencia de CD200 y anexina V en población sana.

ted between May 1st and October 31st 2008 with diagnosis of de novo multiple myeloma at Hematology Service. We quantify marker of apoptosis (annexin V, Bcl-2, caspase 3, CD95) and CD200 using a flow cytometer from Becton Dickinson FACSCalibur model in the program «Cell Quest Pro». **Results:** We included 22 patients. The identification of markers was performed in 15 patients because 7 samples were coagulated. The frequency by sex was 72.7% males and 27.3% female, mean age of 59.13 years, median 60 years. The determination of markers of apoptosis Bcl-2 was found high 59.95%, low 40.5% patients; caspase 3 high 80.0%, normal 20.0% patients; normal CD38 6.7% in patient, high in 93.6%; CD138 normal 33.3%, high 66.57%; CD95 high 26.63% and normal 73.37%. Correlation coefficient between the expression of CD200 and CD95 was that the higher expression of CD200 increased expression of CD95 with $p < 0.043$; too 45.5% patients were doubly positive for CD38 and CD138. **Conclusions:** Of the variables analyzed statistically significant difference was found in the relationship between the expression of CD200 and CD95 and found that a higher expression of CD200 increased expression of CD95. Other important finding was patients with doubly positive for CD38 and CD138 correspond to 67%. The correlation between Bcl2 and CD138 increased Bcl2 see that at least CD138. It is important to increase the sample size and follow-up time at least 3 years to evaluate survival and prognostic markers of apoptosis in relation to the outcome of the disease. Establish benchmarks of CD200 and annexin V in healthy population.

Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas. Representa alrededor de 1% de todas las neoplasias y 10% de los tumores hematológicos. Las células plasmáticas neoplásicas sintetizan cantidades anormales de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas. Las manifestaciones clínicas son heterogéneas, pero incluyen formación del tumor, producción de inmunoglobulina monoclonal, trastorno en la

hematopoyesis (anemia), lesión ósea osteolítica, dolor óseo, hipercalcemia y disfunción renal.^{1,2}

Las células plasmáticas derivan de linfocitos B pequeños tras la estimulación antigénica y la ayuda de las células T. Varias divisiones mitóticas sucesionales tienen lugar durante la diferenciación celular a partir de linfocitos en descanso al plasmoblasto y a la célula plasmática inmadura. La ontogenia de la célula plasmática la medimos de acuerdo a los marcadores de inmunofenotipo de cada una de las células por orden de aparición

de acuerdo a la diferenciación celular, que comienza con una célula madre totipotente y termina en una célula plasmática madura. Una célula madre da lugar a la primera célula B reconocible en el hombre y en los mamíferos; esta célula en humanos es la célula pro-B (progenitora), caracterizada por el receptor CD19 y TdT, pero no contiene inmunoglobulina citoplásmica (Clg) o de unión a la superficie. La diferenciación de pro-B requiere la reorganización de los genes de inmunoglobulinas, la célula pre-B está caracterizada por la presencia de cadena pesada μ intracitoplásmica, sin ninguna inmunoglobulina de unión a la superficie (Slg- μ +), también contiene antígenos HLA-DR, CD19. En la diferenciación de la célula pre-B influyen proteínas humores, cambio de isotipo (cambio de IgM/IgD a IgG1, etcétera) y delección del gen para cadena pesada constante (CH) tiene lugar en las células pre-B y en las células B más diferenciadas.³ Las células plasmáticas son fosfatasa ácida positiva (+); en la mayoría de los casos las células plasmáticas malignas son fenotípicamente Clg (+), CD38 (+), CD138 (+) y CD56 (+). Aunque una minoría expresa CD10, HLA-DR ó CD20, este último marcador se ha asociado con células plasmáticas.^{4,5} El fenotipo de la célula plasmática maligna es: IgS (-), IgC (+), CD38 (+) débil, CD138 (+), (Syndecan-1), CD19 (+), CD56 (-), a diferencia de la célula plasmática normal es CD38 (+) intensa, CD19 (+) y CD56 (-), en algunos estudios han referido que hay una expresión progresiva en la expresión de CD38 desde células plasmáticas normales hasta las clonales de MGUS, MM y leucemias de células plasmáticas. Recientemente se ha informado que las células tallo de MM son CD138 (-), con capacidad para replicarse y diferenciarse a células plasmáticas malignas que expresan el marcador CD138.^{3,6} Harada y colaboradores realizaron un estudio comparativo del inmunofenotipo de las células plasmáticas de pacientes con MM, células plasmáticas de donadores sanos y células plas-

máticas de pacientes con gamopatía monoclonal de significado desconocido (MGUS); encontraron que las células plasmáticas normales eran CD19 (+) y CD56 (-), las de los pacientes con MM no expresaron CD19 (+), CD56 (-) y en los pacientes con MGUS se hallaron células plasmáticas CD19 (+), CD56 (-) y CD19 (-), CD56 (+)(15). La molécula de CD138 también se libera de la superficie celular durante el proceso de apoptosis, por lo tanto, una expresión débil de CD138 puede ser la respuesta a determinadas condiciones fisiológicas o situaciones patológicas.⁸⁻¹⁰

La apoptosis es una vía de muerte celular inducida por un programa intracelular estrechamente regulado, en el cual las células destinadas a morir activan enzimas que degradan el propio DNA de la célula y las proteínas nucleares y citoplasmáticas. La membrana plasmática permanece intacta, pero la estructura está alterada, de tal manera que la célula apoptótica se transforma en un blanco ávido para la fagocitosis. La célula muerta se elimina rápidamente, antes de que su contenido se escape, y, por lo tanto, la muerte celular por esta vía no suscita reacción inflamatoria en el huésped. Así pues, la apoptosis es fundamentalmente diferente a la necrosis, que se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana, digestión enzimática de las células y, frecuentemente, reacción del huésped. Sin embargo, la apoptosis y necrosis coexisten a veces, y pueden compartir algunas características y mecanismos. Las causas de apoptosis pueden ser en situaciones fisiológicas que sirve para eliminar las células que ya no se necesitan, y en situaciones patológicas.^{11,12} La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis depende de una familia de proteasas cisteínicas denominadas caspasas encargadas de la hidrólisis proteica que sufre la célula; las caspasas poseen en un sitio activo una cisteína y rompen un ácido aspártico en su proteína blanco. Muchas caspasas están presentes en las células normales como proen-

zimas inactivas (procaspasas), y necesitan activarse para inducir apoptosis; éstas pueden ser activadas por clivaje de ácido aspártico de otra caspasa. Una vez activada rompe y activa a muchas moléculas de procaspasas, dando origen a una cascada de amplificación proteolítica. Algunas de las caspasas activadas rompen otras proteínas claves en la célula, tales como las que forman la lámina nuclear, y el citoesqueleto; así rompen el armazón nuclear, además activan las DNasas, que degradan DNA nuclear. En el núcleo; las dianas de la activación de las caspasas incluyen proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación del DNA. En particular, la activación de la caspasa-3 convierte a una DNasa citoplasmática en una forma activa, escindiendo un inhibidor de la enzima; esta DNasa induce la característica escisión internucleosomal del DNA. Estos cambios subyacen en las alteraciones estructurales nucleares y citoplasmáticas que ocurren en las células apoptóticas. La cascada no sólo es destructiva y autoamplificada, sino que también es irreversible.^{13,14}

Se han propuesto dos vías para la apoptosis en células de mamíferos, una de ellas es la muerte iniciada en el receptor o extrínseca. Esta vía se inicia por amplificación del receptor de muerte de la superficie celular. Los receptores de muerte son miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (FNT) que contiene un dominio citoplásmico implicado en las interacciones proteína-proteína que se denomina el dominio de muerte, dado su papel esencial en el suministro de señales apoptóticas (algunos miembros de la familia del receptor TNF no contienen dominio citoplásmico de muerte; su papel en el desencadenamiento de la apoptosis está mucho menos establecido). Los receptores de muerte mejor conocidos son el receptor de TNF de tipo I (TNFR1) y una proteína denominada Fas (CD95), pero se han descrito otros diversos. El mecanismo de apoptosis inducido por estos receptores de muerte se ilustra bien con Fas.

Cuando Fas se une cruzadamente por medio de su ligando Fas unido a la membrana (FasL), tres o más moléculas de Fas se juntan y sus dominios de muerte citoplasmáticos forman un sitio de unión para una proteína adaptadora que contiene también un dominio de muerte denominado FADD (*Fas-Associated Death Domain*). El FADD que se une a los receptores de muerte se une, a su vez, a una forma inactiva de la caspasa-8 y -10, las cuales rompen y activan a otras procaspasas para inducir la apoptosis.^{15,16} Esta vía de apoptosis puede inhibirse por una proteína denominada FLIP, que se une a la pro-caspasa-8, pero no puede escindir y activar la enzima porque le falta la actividad enzimática.¹⁷ El antígeno Fas (APO-1/CD95) es una proteína transmembranal que se encuentra expresada en muchas células normales y neoplásicas, incluyendo varias líneas celulares hematopoyéticas; células de linfoma y linfocitos T y B normales activados.^{18,19} Se ha estudiado la expresión de Fas en células plasmáticas CD38 alto CD45 neg-int de pacientes con MM y MGUS, la cual es aproximadamente 50% para ambas entidades. En el mismo trabajo se evaluó la capacidad de esta expresión de Fas para inducir apoptosis en las mismas células plasmáticas, para esto hicieron estudios morfológicos donde las células Fas (+) de pacientes con MM provenientes de cultivos de células mononucleares (MNC) de médula ósea (MO), fueron resistentes a la apoptosis mediada por Fas. Por el contrario sensibles a antiFas y experimentaron apoptosis. Esto sugiere la presencia de un factor protector para apoptosis en los cultivos de MNC.²⁰ Hiroyuki y colaboradores demostraron que las CP de pacientes con mielomas agresivos con DHL alta en suero, expresan el antígeno Fas y experimentan apoptosis mediada por Fas o independiente de Fas.²¹ Spets y colaboradores trabajaron con tres líneas celulares de MM de crecimiento independiente de IL-6 y dependiente de la misma y demostraron que los INF- α e INF- γ inducen apoptosis mediada por Fas.²²

La otra vía propuesta para apoptosis llamada intrínseca (mitocondrial) es inducida como respuesta a daño celular, estrés o daño del DNA. Es resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y liberación de moléculas proapoptóticas al citoplasma, sin intervención de los receptores de muerte. Los factores de crecimiento y otras señales de supervivencia estimulan la producción de miembros antiapoptóticos de la familia de las proteínas Bcl-2.²³ Esta familia se denomina a partir del Bcl-2, que se identificó como un oncogen en linfomas de células B y es homólogo a la proteína Ced-9 de *C. elegans*. Existen más de 20 proteínas en esta familia, todas las cuales funcionan regulando la apoptosis; las dos antiapoptóticas principales son Bcl-2 y Bcl-x. Las cuales ayudan a regular la activación de procaspasas, y residen en las membranas mitocondriales y en el citoplasma. Cuando las células no reciben señales de supervivencia o están sujetas a estrés, la membrana mitocondrial pierde Bcl-2 y/o Bcl-x que se sustituyen por miembros proapoptóticos de la familia, tales como Bak, Bax y Bim. Cuando disminuyen los niveles de Bcl-2/Bcl-x, la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta, y se escapan varias proteínas que pueden activar la cascada de la caspasa. Una de esas proteínas es el citocromo C; en el citosol se une a una proteína denominada Apaf-1 (apoptosis activating factor-1, homólogo a Ced-4 de *C. elegans*), y el complejo activa a la caspasa-9.²⁴ (Bcl-2 y Bcl-x pueden, asimismo, inhibir directamente la activación de Apaf-1, y su pérdida por las células puede permitir la activación de Apaf-1). Otras proteínas mitocondriales, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF), penetran en el citoplasma donde se unen y neutralizan a diversos inhibidores de la apoptosis, cuya función normal es bloquear la activación de caspasas.²⁵ Así pues, la esencia de esta vía intrínseca es un equilibrio entre moléculas proapoptóticas y protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial y la liberación de inductores de muerte que están normalmente secues-

trados dentro de la mitocondria. Existe una considerable evidencia de que la vía intrínseca de la apoptosis puede desencadenarse sin que intervengan las mitocondrias.²⁶ La apoptosis puede iniciarse mediante la activación de caspasa previa a la mitocondria, y el subsiguiente en la permeabilidad mitocondrial y la liberación de moléculas proapoptóticas amplifican la señal de muerte. La fase final de la apoptosis está mediada por una cascada proteolítica, hacia la cual convergen los diversos mecanismos de iniciación. La familia caspasa, que incluye actualmente más de diez miembros, puede dividirse funcionalmente en dos grupos básicos –iniciador y ejecutor– dependiendo el orden en que se activan durante la apoptosis. Las caspasas iniciadoras, incluyen caspasa -8 y caspasa -9; la caspasa -3 y la caspasa -6, sirven como ejecutoras. Jourdan y colaboradores identificaron las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas de la familia Bcl-2 que estaban reguladas en las células de mieloma por tres factores de supervivencia: IL-6, INF- α y IGF-I, ellos utilizaron para el estudio líneas celulares de mieloma, cuya supervivencia y proliferación es dependiente de la adición de los factores de crecimiento exógenos. La apoptosis se midió por unión de anexina V (-) por citometría de flujo, luego comprobaron las células apoptóticas con tinción del DNA con yoduro de propidio; las células anexina V (-) mostraron un perfil de DNA correspondiente con células viables, diferenciándose de las células anexina V (+). En todas las líneas celulares la adición de los factores IL-6, INF- α o IGF-I redujo significativamente la apoptosis. Se investigaron aquellas proteínas de la familia Bcl-2 que se expresaron durante el crecimiento en fase exponencial de 11 líneas celulares de mieloma. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1 se detectaron en todas las líneas celulares, así como Bag-1. Las proteínas proapoptóticas Bak y Bax se expresaron variablemente en todas las líneas celulares. Bad no fue detectada en ninguna línea celular debido a su expresión baja en células de mieloma. También se estudiaron las fluc-

tuaciones de las concentraciones de estas proteínas en cuatro líneas celulares, induciendo a apoptosis cuando se removieron del cultivo los factores de crecimiento y cuando las células fueron rescatadas de la apoptosis, esto al adicionar tres diferentes factores de supervivencia. Mcl-1 fue la única proteína antiapoptótica cuya expresión se redujo significativamente cuando las células fueron privadas de IL-6. En general, la remoción de citocinas no afectó reproduciblemente la expresión de otras proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL, Bcl-2 y Bag-1. Tampoco se afectó la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax, Bad o Bid. La adición de IL-6 ó INF- α sobre Mcl-1 no afectó la expresión de otros miembros pro o antiapoptóticos.²⁷ Los marcadores de apoptosis, así como la expresión de determinados antígenos como CD20 e IgS (asociados a célula inmadura), CD11a y CD44 (asociados a diseminación extramedular) y CD28 (asociado a proliferación celular) se correlaciona con un pronóstico independiente, por lo que el inmunofenotipo hasta ahora no se le consideraba un parámetro fundamental.^{28,29} La citogenética, que al igual que ocurre en otras hemopatías, se considera hoy en día como uno de los principales factores pronósticos.³⁰ Se encontró relación entre los niveles altos de RANKL soluble (sRANKL) en suero, con el grado de lesión osteolítica en los huesos.^{31,32} En diversos estudios sobre la presentación clínica del MM en pacientes que presentan la t(11;14)(q13;q32), comparada con la de los pacientes que poseen la amplificación del gen de CCND1, se relaciona con buen pronóstico.^{33,34} Mientras que la amplificación del gen de la ciclina D1 se asocia con un pronóstico desfavorable.^{35,36}

Se ha propuesto el marcador CD200 como factor pronóstico en pacientes con MM. Tomando en cuenta que CD200 es una glicoproteína transmembranal de tipo I altamente conservada que está expresada en muchas estirpes celulares como timocitos, células B, células T activadas, neuronas, células endoteliales y células dendríti-

cas.^{37,38} Rosenblum y colaboradores correlacionaron la expresión de CD200 en células dendríticas CD11c (+) de bazo de ratón y en células leucémicas humanas C1498 con la apoptosis de estas células. Demostraron que los niveles de expresión de CD200 en la superficie celular se incrementan durante la apoptosis. También asocian que CD200 facilita la inducción de la tolerancia inmune a autoantígenos, asociada con la apoptosis.³⁹ Moreaux J y asociados han propuesto al marcador CD200 como un factor pronóstico independiente en los pacientes con MM, después de analizar la expresión de CD200 en 112 pacientes con MM de reciente diagnóstico y la compararon con la expresión de CD200 en células plasmáticas normales, encontrando expresión de CD200 en 78% de los pacientes con MM en comparación con las demás células, 22% de los pacientes estudiados no presentaban expresión de CD200. En los pacientes mayores de 65 años, la expresión de CD200 fue altamente significativa.⁴⁰

Material y métodos

Estudio transversal, prospectivo realizado en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional «La Raza». Fueron estudiados 22 pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple «de novo» que ingresaron al Servicio de Hematología Adulto, en el periodo comprendido de mayo a octubre del 2008.

Primeramente se realizó el AMO, y frotis. Posteriormente el diagnóstico morfológico de mieloma mediante técnica de Wright; se cubrían los extendidos de médula ósea (MO) con colorante de Wright y se agrega el amortiguador de fosfatos pH 6.4 durante 40 minutos, se lavarán posteriormente con agua y se dejarán secar. Se observó al microscopio, primeramente con el objetivo de 10X, para valorar la celularidad en la muestra, la cantidad de grasa y se cuantificó el número de megacariocitos por campo. Luego

se pasó al objetivo de 100X; se contaron 200 células totales y se cuantificó el porcentaje de células plasmáticas, también se determinó la relación mielo-eritroide. Se realizó técnica de fosfatasa ácida: se fijan los extendidos de MO durante cuatro minutos en cámara con solución fijadora; para la tinción se mezclan las soluciones A y B en un vaso de Coplin y se llevan a incubación a 37 °C durante 2.5 horas, luego se lavan y se procede a la contratinción con hematoxilina de Mayer por 20 minutos, se lavan y se dejan secar. Se contó un total de 100 células plasmáticas y se determinó el porcentaje de células positivas a la tinción, el cual debían ser mayor de 20% para considerarse como positivo.

Realizado el diagnóstico morfológico e inmunofenotipo para mieloma, se procedió a estadificar, utilizando la valoración de Durie-Salmon (cuadro I).

Esta misma se utilizó para establecer presencia de daño renal. Todos los pacientes contaban con resultados de análisis clínicos, los cuales eran: citometría hemática completa, química sanguínea completa, electrolitos séricos, inmunoglobulinas, proteínas de Bence Jones.

Se cuantificaron los marcadores de apoptosis (anexina V, Bcl-2, del caspasa 3, CD95) y CD200 mediante un citómetro de flujo modelo FACSCalibur de Becton Dickinson en el programa de «Cell Quest Pro». Se usaron los siguientes anticuerpos: Control de isotipo IgG1 FITC, CD45 isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD20 PerCP, CD34 PerCP, CD19 PerCP, CD22 FITC, CD38 PE, CD138 APC, CD10 FITC, CD13PE, CD14 perCP, CD56, CD95 PC5 (ficoeritrina-cianina 5.1), CD200 PerCP, antianexina V APC, antiBcl-2 FITC, anticaspasa 3, perlas calibradoras.

Cuadro I. Valoración de la masa tumoral (Durie-Salmon).

1. Masa tumoral alta (estadio III) ($> 1.2 \times 10^{12}/m^2$)*

Debe estar presente una de las siguientes alteraciones:

- a) Hemoglobina < 8.5 g/dL, hematócrito $< 25\%$
- b) Calcio sérico > 12 mg/dL
- c) Tasa de producción de proteína del mieloma sérica o urinaria muy elevada
 - Pico de IgG > 7 g/dL
 - Pico de IgA > 5 g/dL
 - Proteína de Bence Jones > 12 g/24h
- d) > 3 lesiones líticas en el estudio óseo (no es aceptable la gammagrafía ósea)

2. Masa tumoral baja (estadio I) ($< 0.6 \times 10^{12}/m^2$)*

Deben estar presentes todos los siguientes datos:

- a) Hemoglobina > 10.5 g/dL o hematócrito $> 32\%$
- b) Calcio sérico normal
- c) Tasa de producción de proteína del mieloma sérica baja:
 - Pico de IgG < 5 g/dL
 - Pico de IgA < 3 g/dL
 - Proteína de Bence Jones < 4 g/24h
- d) Ausencia de lesiones líticas o de osteoporosis

3. Masa tumoral intermedia (estadio II) ($0.6-1.2 \times 10^{12}/m^2$)*

Se considera que todos los pacientes que no cumplen los criterios de alta o baja masa tumoral tienen masa tumoral intermedia

- a) Sin insuficiencia renal (creatinina ≥ 2 mg/dL)
- b) Con insuficiencia renal (creatinina > 2 mg/dL)

*Número estimado de células plasmáticas neoplásicas

Los reactivos utilizados fueron: Solución para lisar glóbulos rojos I x (Becton Dickinson), amortiguador salino de fosfatos pH 7.35 (FACS flow), paraformaldehído a 1% (sigma), colorante de Wright y amortiguador de fosfato pH 6.4, reactivo para fijar frotis (vapores paraformaldehído), solución permeabilizante BD, solución A: 1.2 mL de nitrato de sodio a 4% y 1.2 mL de pararrosaalinilina a 4%; solución B: disolver 1 vial de naftol AS bifosfato en 2 mL de N dimetilformamida, luego agregar 35.6 mL de buffer de acetatos pH 5.2, y hematoxilina de Mayer.

Las muestras para el análisis se colocan en un tubo Falcon 5.0-10.0X106/L células mononucleares viables en 100 μ L de amortiguador de fosfatos, se adicionan 10 μ L de anticuerpo marcado. Se mezcla e incuba durante 25 minutos a 4 °C en oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se adiciona 1 mL de solución de lisis (1:10) y se mezcla, volvemos a incubar durante 10 minutos a 4 °C en oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se centrifuga a 300 X g durante cinco minutos, se decanta y se adicionan 2 mL de amortiguador de fosfatos, se resuspende, volvemos a centrifugar a 300 X g durante cinco minutos; terminada la centrifugación se elimina el sobrenadante y adicionamos 0.8 mL de amortiguador de fosfatos más 0.2 mL de paraformaldehído a 1%. Se resuspende en Vortex a baja velocidad.

Para la detección de células positivas para los tubos que llevan tanto marcadores de superficie como intracitoplasmáticos, la tinción superficial en las condiciones mencionadas anteriormente, se procede a la permeabilización de las células con solución permeabilizadora por siete minutos, luego se lava con amortiguador de fosfato, se resuspende, se vuelve a centrifugar a 300 x g durante cinco minutos, se elimina el sobrenadante, se resuspende en Vortex a baja velocidad y se adiciona el anticuerpo monoclonal para los marcadores intracitoplasmáticos. Se mezcla e incuba durante 25 minutos a 4 °C en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se centrifuga,

decanta y resuspende en PBS para la adquisición de los datos.

La adquisición de datos se realizó por medio del programa «Cell Quest Pro», analizando entre 20,000-100,000 eventos. Se inicia adquisición de los datos, ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en una gráfica de puntos en 10, tanto para el eje de las abscisas (FITC) como para el eje de las ordenadas (PE), colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 98%. Una vez fijados los marcadores de autofluorescencia, se procede a realizar la adquisición de las suspensiones celulares de los demás tubos que ya contienen células unidas a los anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo, respetándose tanto la región como la localización de los cuadrantes. Para la adquisición de los resultados se selecciona la forma gráfica de puntos «dot plot» con el marcador de autofluorescencia hasta la escala 10 y con el control de isotipo hasta la misma escala. En una gráfica se reportan las poblaciones celulares, tomando en cuenta el tamaño (eje de ordenadas) versus granularidad (eje de abscisas); se selecciona la región de interés para cada tubo. Se obtienen los resultados de dichas regiones en forma de porcentaje.

Se excluyeron los pacientes con sepsis aguda grave, con diálisis o hemodiálisis, con diagnóstico de leucemia de células plasmáticas y las muestras con recuento bajo de células nucleadas.

Los valores de referencias se consideraron de la siguiente manera: para Bcl-2 mayor de 10%, para CD95 con 20% era positivo, caspasa 3 con 40% era positivo, CD138 menor de 5% eran negativos y CD38 mayor de 10% positivos. Annexina V presente o ausente. Estos valores fueron tomados de un estudio previo en población mexicana sana, realizado por el Servicio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional «La Raza».

Resultados

El total de pacientes incluidos con diagnóstico de mieloma múltiple en el estudio fueron 22, 16 (72.7%) hombres y seis (27.3%) mujeres, con edad media de 59.13 años (mediana de 60 años y desviación estándar 10.31). Los frotis revisados presentaron media de 53.82% de células plasmáticas en médula ósea (mediana 57.50%, desviación estándar 22.98%).

La distribución de acuerdo a los estadios de mieloma según clasificación de Durie-Salmon fue la siguiente: dos (9.1%) pacientes en estadio IA, dos (9.1%) en IIA y 12 (54.5%) en etapa III; de los cuales cinco eran estadio A y siete estadio B. En seis (27.3%) casos no se realizó estadificación. La variedad más frecuente de MM encontrado fue IgG 15 (68.2%), IgA tres (13.6%), no secretor dos (9.1%) y de cadenas ligeras dos (9.1%). Al momento del diagnóstico, 15 (68.2%) de los pacientes no presentaban daño renal; los otros siete (31.8%) sí presentaban daño renal. Diez (45.5%) casos eran Bence Jones positivo y 12 (54.5%) fueron negativos. Importante reportar que 11 pacientes presentaron DHL normal en el momento del diagnóstico, se encontraba alta en nueve y baja en dos. Se determinó hemoglobina al diagnóstico en los 22 casos; la media fue 10.83 (mediana 11.05, desviación estándar 2.518); seis pacientes presentaron valores normales de hemoglobina; los 16 restantes tuvieron cifras bajas. Catorce pacientes presentaron plaquetas normales, tres tuvieron trombocitosis y los otros cinco trombocitopenia.

Se realizó la medición de marcadores de apoptosis y CD200 en 15 pacientes, ya que en siete (31.8%) se encontraron coaguladas. El valor promedio de CD200 fue 22.7% (mediana 20.50%, desviación estándar 25.57%), caspasa 3 mostró media de 58.08% (mediana 60.50%). La anexina V tuvo media de 65.63% (mediana 79.70%, desviación estándar 32.45). De las proteínas antiapoptóticas se estudió Bcl-2, la media fue 19.42%

(mediana 18.6%, desviación estándar 19.75). Asimismo, CD95 tuvo media de 63.60% (mediana 70.0%, desviación estándar 27.62); en 15 pacientes, CD38 tuvo media de 69.59% (mediana 77.90%, desviación estándar 29.53), CD138 se determinó en 15 sujetos, la media fue 35.50% (mediana 15.80% y desviación estándar 35.55). En cuanto a los marcadores de apoptosis, se encontró Bcl-2 alto en nueve (59.95%) pacientes y bajo en seis (40.05%); caspasa 3 resultó alta en 12 (80.0%) y normal en tres (20.0%) pacientes; CD38 fue normal en un caso (6.7%), alto en 14 (93.6%); CD138 normal en cinco (33.3%) y alto en 10 (66.7%) individuos; CD95 alto en cuatro (26.63%) y normal en 11 (73.37%) enfermos. Se estableció coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión de CD200 y CD95; se encontró que a mayor expresión de CD200 mayor expresión de CD95 con $p < 0.043$; 10 (66.7%) pacientes fueron doblemente positivos para CD38 y CD138.

También se realizó correlación de Pearson entre la expresión Bcl-2 y CD138; se detectó que a mayor Bcl-2 menor CD138, con $p < 0.048$. El tratamiento fue el siguiente: ocho (46.2%) pacientes fueron tratados con talidomida-dexametasona, siete (31.8%) con tal-dexa-melfalan y cuatro (18.2%) con melfalan-prednisona-tal. En los tres casos (13.6%) restantes no se había iniciado el tratamiento.

La mediana de supervivencia global fue de 3.8 meses, IC95% 3.5 a 4.1.

No se realizó la curva de supervivencia global debido a que el tiempo de seguimiento de nuestros pacientes fue corto. Sólo un paciente falleció en este periodo.

Discusión

En los 15 pacientes con mieloma múltiple a los cuales se les determinaron marcadores de apoptosis, se observó que Bcl2 se encontraba presente con valores altos en nueve (60%) pacientes y

con cifras bajas en seis (40%), lo cual concuerda con estudios publicados sobre diversas patologías oncológicas, debido a que si el Bcl2 aumenta, la permeabilidad de la membrana mitocondrial disminuye, impidiendo la liberación de citocromo C y, en consecuencia, la inhibición de las caspasas.

CD95 se encontró normal en la mayoría de los pacientes estudiados; esto apoya el trabajo de Hiroyuki y colaboradores, los cuales demostraron que no todas las células plasmáticas expresan el antígeno Fas para experimentar apoptosis. Esto deja muy claro que la apoptosis en algunos casos

puede ser independiente de Fas. Anexina V se encontró sobreexpresada en la mayoría de los pacientes, lo cual nos ayudó a corroborar la muerte celular. Es importante comentar que la mayoría de los pacientes expresó CD38 y CD138 como doble positivo, a diferencia de lo reportado en la literatura mundial, donde el fenotipo de las células plasmáticas malignas es: IgS (-), IgC (+), CD38 (+) débil, CD138 (+), (Syndecan-1), CD19 (+), CD56 (-), mientras que el de la célula plasmática normal es CD38 (+) intenso. Sería muy importante conocer si esta expresión es propia de nuestra población, o bien, que la molécula de CD138

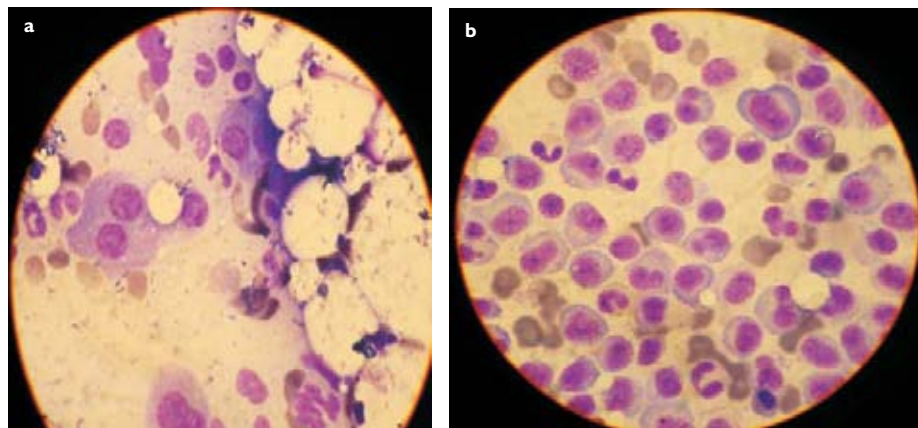


Figura 1. a y b: Frotis de médula ósea donde se observan células plasmáticas con características de binucleación.

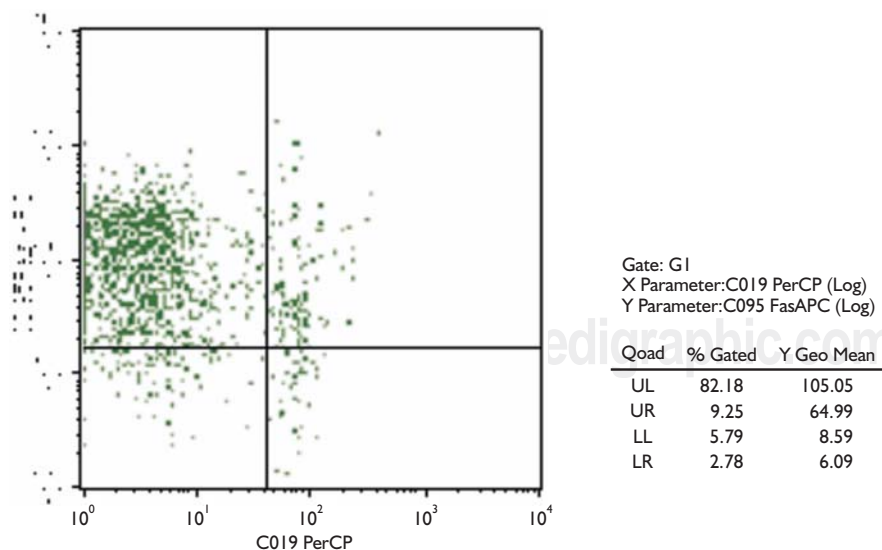


Figura 2. Representación gráfica de la citometría de flujo zona de CP CD19 en el eje de las X.

se encuentre sobreexpresada en la superficie de las células malignas de pacientes con mieloma múltiple durante el proceso de apoptosis.

En cuanto al CD200, lo encontramos presente en la mayoría de los pacientes. La correlación realizada indica que a mayor CD200 mayor CD95 y a mayor CD95 menor Bcl2. Es muy importante recordar que con estos resultados la vía de apoptosis más implicada en estos pacientes es la mitocondrial. Esto apoya a los estudios en los que se asocia a CD200 como un facilitador de la tolerancia inmune a autoantígenos relacionados con la apoptosis.

En este estudio corroboramos algunos hallazgos ya reportados por otros autores referentes a las proteínas apoptóticas en células de MM. Sin embargo, es importante hacer notar la correlación directamente proporcional que encontramos entre las proteínas CD200 y CD95, e inversamente proporcional entre bcl-2 y la expresión de CD138, es decir, que en las células malignas de nuestros pacientes con MM cuando CD200 está aumentado, también lo está CD95, y cuando bcl-2 está incrementado CD138 disminuye. Estos hallazgos demuestran que la población de células de MM no es homogénea; resultaría interesante dar seguimiento a largo plazo a estos pacientes para corroborar la importancia pronóstica de estos marcadores.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones como es el pequeño tamaño de muestra, el corto seguimiento, la falta de valores de referencia para CD200 y definir un valor de corte para determinar supervivencia.

Conclusiones

De las variables analizadas en este estudio, sólo mostró tener correlación estadística importante la relación entre la expresión de CD200 y CD95, encontrando que a mayor expresión de CD200 mayor expresión de CD95. Otro punto importante de recalcar es el que 67% de los pacientes

resultaron doblemente positivos: para CD38 y CD138.

También destaca la correlación entre Bcl2 y CD138, donde vemos que a mayor Bcl2 menor CD138.

Consideramos que las siguientes propuestas pueden ser de utilidad para próximas investigaciones en esta línea: aumentar el tamaño de muestra y el tiempo de seguimiento por lo menos a tres años para poder evaluar la supervivencia y el valor pronóstico de la expresión de los marcadores de apoptosis en relación con el desenlace de la enfermedad. Realizar un estudio de determinación de CD200 y anexina V para obtener valores de referencias en nuestra población mexicana sana. Tratar de analizar otros marcadores de apoptosis como: Caspasa 8, Bcl-x.

Referencias

1. Vela OJ, García REMA. Mieloma múltiple En: Borbolla EJR. Principios de hematología. Bases y clínica. México: Masson Doyma; 2005. p. 222-229.
2. Barlogie B, Shaughnessy J, Munshi N, Epstein J. Plasma cell myeloma. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ. 6th ed. Williams Hematology. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 1279-1299.
3. Davey FR, Hutchinson RF. Hematopoiesis. En: Henry JB. El laboratorio en el diagnóstico clínico. 20a ed. Philadelphia, Pennsylvania: Marban; 2005. p. 521-541.
4. Florensa L, Coll MT, Woessner S. Hematopoiesis. En: Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. 4a ed. Madrid, España: Harcourt; 2001. p. 1-35.
5. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. Blood 2003; 102: 1070-1071.
6. Matsui W, Huff CA, Qiuju Wang, Malehorn MT, Barber J, Tanheco Y et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. Blood 2004; 103: 2332-2336.
7. Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. Blood 1993; 81: 2658-2663.
8. Bladé J. Mieloma múltiple. En: Hematología Clínica. 4a ed. Madrid, España: Harcourt; 2001. p. 574-588.
9. Ruiz RG, Ruiz AA. Padecimientos inmunoproliferativos malignos. En: Fundamentos de hematología. 3a ed. México: Panamericana; 2003. p. 323-341.
10. Mateo G, Orfao A, San Miguel J. La citometría de flujo en el mieloma múltiple. En: Mieloma Múltiple. México: Masson Doyma; 2006. p. 99-108.

11. Madeiros LJ, Yospur LS, Sun NC, McCourty A, Brynes RK. Cyclin D1 protein in multiple myeloma and plasmacytomas: an immunohistochemical study using fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Mod Pathol* 1997; 10: 927-932.
12. Kumar V, Abbas FAK, Fausto N. Apoptosis. En: Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional*. 7a ed. Madrid, España: Elsevier; 2005. p. 26-34.
13. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989; 169: 1747-1756.
14. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzku S, Moller P, Falk W et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305.
15. Owen-Schaub LB, Meterissian S, Ford RJ. Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and nonhematologic origin. *J Immunother* 1993; 14: 234.
16. Falk MH, Trauth BC, Debatin KM, Klas C, Gregory CD, Ricklison AB et al. Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood* 1992; 79: 3300-3306.
17. Moller P, Henne C, Leithausen F, Eichelmann A, Bruderlein S, Rhein J et al. Coregulation of the APO-1 antigen with intracellular adhesion molecule (CD54) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center cells and in follicular center and mediastinal center B-cell lymphomas. *Blood* 1993; 81: 2067-2075.
18. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S et al. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992; 149: 3753-3758.
19. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95) mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994; 152: 5624-5632.
20. Westendorf JJ, Lamnert JM, Jelinek DF. Expression and function of Fas (APO-UCD95) in patient myeloma cells and myeloma cells lines. *Blood* 1995; 85: 3566-3576.
21. Hata H, Matsuzaki H, Takeya M, Yoshida M, Sonoki T, Nagasaki A, Kuribayashi N, Kawano F, Takatsuki K. Expression of Fas/Apo-1 (CD95) and apoptosis in tumor cells from patients with plasma cell disorders. *Blood* 1995; 85: 1939-1945.
22. Spets H, Georgii-Hemming P, Siljason J, Nilsson K, Jerberg-Wiklund H. Fas/APO-1 (CD95)-Mediated apoptosis is activated by interferon- γ and interferon- α in interleukin-6 (IL-6)-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines. *Blood* 1998; 92: 2914-2923.
23. Cory S, Adams JM. The Bcl2-family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 647.
24. Reed JC. Cytochrome c: Can't live with it- can't live without. *Cell* 1998; 91: 559-560.
25. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol cell Biol* 2002; 3: 401-407.
26. Joza N, Kroemer G, Penninger JM. Genetic analysis of mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 2002; 18: 142-144.
27. Jourdan M, De Vos J, Mechti N, Klein B. Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: Interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death and Differentiation* 2002; 7: 1244-1252.
28. Carbone PP, Kellerhouse LE, Gehan EA. Plasmocytic Myeloma: A study of the relationship of survival to various clinical manifestation and anomalous protein type in 112 patients. *Am J Med* 1967; 42: 937-948.
29. San Miguel JF, Garcia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. In: *Best Practice & Research Clinical Haematology. Advances in the Biology and Management of Plasma cell Dyscrasias* 2005; 18: 569-583.
30. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003; 101: 4568-4575.
31. Evangelos T, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meleties J et al. Soluble receptor activator of nuclear factor B ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003; 102: 1064-1069.
32. Soverini S, Cavo M, Cellini C, Terragna C, Zamagni E, Ruggeri D et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 2003; 102: 1588-1594.
33. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Rapp MJ, Bataille R. Oncogenesis or multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185-2191.
34. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hover JD, Lust HA, Hyle RA et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy or undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-1424.
35. Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R et al. 2002. Amplification for Cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol* 109: 30-38.
36. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V, Suvajdzic N, Milic N, Colovic M. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 and P53 in multiple myeloma: relationship to proliferative activity and prognostic significance. *Med Oncol* 2004; 21: 73-80.
37. Barklay A N, Wright GJ, Brooke G, Brown M H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends in immunology* 2002; 23: 285-290.
38. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavac MJ, Bigler M et al. Characterization of the CD200 Receptor Family in Mice and Humans and Their Interactions with CD200. *J Immunol* 2003; 171: 3034-3046.
39. Rosenblum MD, Olasz E, Woodliff JE, Johnson BD, Konkol MC, Gerber KA et al. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood* 2004; 103: 2691-2698.
40. 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: 4194-4197.