



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
MARCADORES DE APOPTOSIS EN PACIENTES
CON MIELOMA MÚLTIPLE DE NOVO**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

PATOLOGIA CLINICA

PRESENTA:

DRA. RITA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

ASESOR

DR. JORGE VELA OJEDA



MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA
DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD
HOSPITAL GENERAL GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

DRA. NOEMI PATRICIA CASTILLO TORRES
TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD EN
PATOLOGÍA CLÍNICA
JEFE DIVISIÓN DE AUXILIARES DIAGNOSTICOS HOSPITAL
DE CARDIOLOGIA CMN SIGLO XXI

DRA. MA. GUADALUPE CARRILLO MONTES
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD EN PATOLOGÍA CLÍNICA
DEL CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
JEFE DE LABORATORIO CLINICO HGO No.

DR. JORGE VELA OJEDA
ASESOR DE TESIS
MEDICO HEMATOLOGO
JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
DR. ANTONIO FRAGA MOURET CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

*Tome interés, yo imploro, en esos sagrados recintos que uno designa
con el expresivo término de laboratorios.
Demande que sean adornados, estos son los templos del futuro,
templos de bienestar y felicidad.
En ellos la humanidad crece más fuerte y mejor.
(Luis Pasteur)*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Profr. Manuel Gutiérrez Robles y Sra. María Hernández Cruz, por todo lo que soy. En especial a ti madre que siempre tienes una palabra dulce de aliento, por tu nobleza interior, luchas hasta el final y logras lo que te propones, eres mi mejor ejemplo a seguir, gracias por todo tu apoyo te amo. A mi abuela María Cruz Morales por todo el amor que me ha regalado durante sus casi 100 años de vida y sus enseñanzas, ¡gracias abuelita!

Por su lealtad incondicional a mis hermanas: Ana, Juanita, y Yasbeck quienes soportaron pacientemente los inconvenientes y separación asociada. Me siento orgullosa de ustedes y deseo que ustedes también lo estén de mí.

A ti hermano Santiago que a pesar de la distancia, siempre te llevo en mi corazón.

A mis sobrinos: Valentina, Victoria, Maximiliano, Diego, Fernando y Carlos Eduardo, me he perdido muchas cosas de su desarrollo, pues justo cuando empezaba a disfrutarlos, inicié esta etapa de superación profesional, pero espero recompensarlos en tiempo y cariño. A María Fernanda por ser mi acompañante los fines de semanas de alguna manera ponías alegrías a mis días.

Igualmente quiero reconocer el apoyo proporcionado a mis familiares: Tío Emiliano, tía Virginia, tío Vicente, tía Esperanza, Martha, Arellí, Carlos, Pati, Jaime, por todo el cariño que me brindan, por todas esas palabras de ánimo para lograr lo que ahora culmina.

Así mismo, me gustaría reconocer y expresar mi gratitud a mis amigos de siempre: Jesús, Marisa, Edi, Blanquita, Leny, Marisela, Roxana, por brindarme su amistad por demostrarme lo mucho que me quieren y aprecian, por estar cuando más los necesito, a mis nuevos amigos y a mis compañeros de residencia: Ricardo, Yola, e Ivette por compartir estos 3 años conmigo. A todo el personal del laboratorio del CMN la Raza por que durante estos años, nos compartieron sus conocimientos, sus experiencias y nos acogieron con cariño.

A la Dra. Rosa María García Escamilla por enseñarme el sentido de responsabilidad, por compartirme sus conocimientos como Patóloga Clínica y por su amistad. ¡Gracias Maestra!

Agradezco la colaboración, asesoría, y paciencia en este proyecto a usted Dr. Jorge Vela Ojeda, por la confianza que deposito en mí para la realización del proyecto. ¡Gracias! por compartir sus conocimientos, lo admiro y respeto. También agradezco a la Dra. Isabel Padilla por el apoyo que me brindo durante la revisión de las médulas óseas, por enseñarme con paciencia, por su amistad y cariño.

A las Dras. Erika Gil y Lupita Rodríguez, por su amistad, confianza y apoyo en los procedimientos.

Y a todas las personas que de alguna manera se sumaron a mi esfuerzo para llevar a cabo este proyecto, estaré en deuda con todos aquellos que he mencionado y a los que no aparecen aquí.

Rita Concepción Gutiérrez Hernández.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIÓN.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	32

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE APOPTOSIS EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE DE NOVO.

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia de células plasmáticas, representa alrededor del 1% de todas las neoplasias y 10% de los tumores hematológicos. En Estados Unidos son diagnosticados anualmente 14,000 casos nuevos. Su incidencia en México es de 0.4 casos nuevos por cada 100,000 habitantes, con una media de 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, alguno de los marcadores se asocian con el comportamiento agresivo de la enfermedad. Es por ello la importancia de determinar los marcadores apoptóticos (Anexina V, Bcl-2, Caspasa 3, CD95) en Médula Ósea de pacientes con MM de Novo mediante la citometría de flujo. El reconocimiento de dichos marcadores al inicio del diagnóstico ayudarían a predecir la evolución de los pacientes y posteriormente establecer líneas de investigación que permitan evaluar la relación de estos marcadores apoptóticos y cómo pueden influir en el resultado de tratamientos o bien valorar la supervivencia global de los paciente.

OBJETIVO: Cuantificar marcadores de Anexina V, Bcl-2, Caspasa 3, CD95, por citometría de flujo en muestras de Médula Ósea (MO) en pacientes con MM de Novo.

MATERIAL Y MÉTODO:

Se realizó estudio transversal, prospectivo. En la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMA) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza. En 22 pacientes con diagnóstico de MM “*de Novo*” que ingresaron al servicio de Hematología de adultos, en el periodo comprendido del 1ro de Mayo a Octubre del 2008. Primeramente se realizaba el AMO, y frotis, posteriormente el Dx. Morfológico de Mieloma. Realizado el diagnóstico morfológico e inmunofenotipo para Mieloma se procedió a estadificar, utilizando la valoración de Durie-Salmon. Se cuantificaron las células malignas y los marcadores de apoptosis (Anexina V, Bcl-2, Caspasa 3, CD95) y CD200 en 15 muestras de pacientes ya que 6 se coagularon. 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, Anti Anexina V APC, Anti Bcl-2 FITC, Anti Caspasa 3, Perlas calibradoras. La adquisición de datos se realizó mediante un Citómetro de flujo modelo FACSCalibur de Becton Dickinson en el programa de “Cell Quest Pro”.

RESULTADOS: El total de pacientes incluidos con Dx. de Mieloma Múltiple fueron 22, la determinación de marcadores de apoptosis se realizó en 15 pacientes ya que 7 muestras estaban coaguladas. La frecuencia en cuanto al sexo fueron 16 (72.7%) del sexo masculino y 6 (27.3%) para el femenino, con una

media para la edad de 59.13 años, mediana de 60 años y desviación estándar de 10.31, los estadios de mieloma según clasificación de Durie-Salmon encontrados 2 (9.1%) pacientes en estadio IA, 2 (9.1%) en estadio IIA, y 12 (54.5%) en estadio III, La variedad más frecuente de MM encontrado fue IgG 15 (68.2%), IgA 3 (13.6%), No secretor 2 (9.1%), y de cadenas ligeras 2 (9.1%), Al diagnóstico 15 (68.2%) de los pacientes no presentaban daño renal, y 7 (31.8%) presentaban daño renal. 10 (45.5%) eran Bence Jones positivo y 12 (54.5%) fueron negativos. En cuanto a la determinación de marcadores de apoptosis se encontró Bcl-2 alto en 9 pacientes (59.95%) y bajo en 6 (40.5%) pacientes, Caspasa 3 alto en 12 (80.0%) y normal en 3 (20.0%) pacientes, CD38 normal en 1 (6.7%) paciente, alto en 14 (93.6%), CD138 Normal en 5 (33.3%) y alto en 10 (66.57) pacientes, CD95 alto en 4 (26.63%) y normal en 11 (73.37%) pacientes. Se estableció coeficiente de correlación de Pearson Entre la expresión de CD200 y CD95 encontrando que a mayor expresión de CD200 mayor expresión de CD95 con una $P < 0.043$, también 10 (45.5%) pacientes fueron doblemente positivos para CD38 y CD138. Se realizó correlación de Pearson entre la expresión Bcl-2 con CD138 encontrando que a mayor Bcl-2 menor CD138, con una $P < 0.048$. Los pacientes fueron tratados con Talidomida-Dexametasona 8(46.2%) pacientes, Tal-Dexametasona-Melfalan 7 (31.8%), Melfalan-Prednisona-Tal 4 (18.2%), y 3 (13.6%) no habían iniciado tratamiento.

DISCUSIÓN: De las variables analizadas en este estudio solo mostró tener una 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 son los pacientes doblemente positivos para CD38 y CD138. Así como 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 3 años para poder valorar supervivencia, y 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 población sana.

Abreviaturas

APC	Aloficocianina
ADN	Acido desoxirribonucleico
AL	Amiloidosis
CCND1	Ciclina D1
CCND3	Ciclina D3
CdK	Cinasa dependiente de ciclina
Cel pl	Células plasmáticas
CMNT	Células mononucleadas totales
CNT	Células nucleadas totales
DHL	Deshidrogenasa Láctica
DS	Desviación Estándar
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte
FGFR3	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
H	Hiperdiploide
IAP	Familia de inhibidores de la apoptosis
Clg	Inmunoglobulina citoplásmica

Ig	Inmunoglobulina
IgH	Cadena pesada de la Inmunoglobulina
INF-γ	Interferon γ
LCP	Leucemia de células plasmáticas
Linfo	Linfocitos
MM	Mieloma múltiple
MMSET	Dominio SET de Mieloma múltiple
MNC	Células Mono Nucleares
MGUS	Gamopatía monoclonal de significado incierto
MO	Médula ósea
SCF	Factor de célula madre
SP	Sangre periférica

INTRODUCCIÓN

El mieloma múltiple es una neoplasia de células plasmáticas representa alrededor del 1% de todas las neoplasias y el 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 la 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 secuenciales 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 (CIg) 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 (SIg- μ +), también contiene antígenos HLA-DR, CD19. En la diferenciación de la célula pre-B influyen proteínas humorales, cambio de isotipo (cambio de IgM/IgD a IgG1 etc.) 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 o CD20 este último marcador se ha asociado con células plasmáticas ^(4,5). El fenotipo de Las célula plasmática maligna es: IgS (-), IgC (+), CD38 (+) débil, CD138 (+), (Sydencan-1), CD19 (+), CD56 (-) a diferencia de las 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 cols; realizaron un estudio comparativo del inmunofenotipo de las células plasmáticas de pacientes con MM, células plasmáticas de donadores sanos y células plasmáticas 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 C138 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 ^(8,9,10)

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 proenzimas inactivas (procaspasas), y necesitan activarse para inducir apoptosis estas 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 solo es destructiva y autoamplificada sino que también es irreversible^(13,14). Se han propuesto dos caminos para la apoptosis en células de mamíferos, uno de ellos es (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 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 dominios 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 1 (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 el 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 de MO (MNC), 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 cols 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 cols trabajaron con 3 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. Y es resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y liberación de moléculas pro-apoptóticas 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 oncogén 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 pro-apoptóticos 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 pro-apoptóticas y protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial y la liberación de inductores de muerte que están normalmente secuestrados 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 pro-apoptóticas 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 caspasa -6, sirven como ejecutoras. Jourdan y cols identificaron las proteínas antiapoptóticas y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 que estaban reguladas en las células de mieloma por 3 factores de supervivencia: IL-6, INF- α y IGF-1, 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 Ioduro 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-1 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-X_L 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 fluctuaciones de las concentraciones de estas proteínas en 4 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 3 diferentes factores de sobrevivencia. 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 pro-apoptóticas Bax, Bad o Bid. La adición de IL-6 o 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 dendríticas ^(37,38). Rosenblum y cols correlacionaron la expresión de CD200 en células dendríticas CD11 c (+) 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 cols 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 el 78% de los pacientes con MM en comparación con las demás células, el 22% de los pacientes estudiados no presentaban expresión de CD 200. En los pacientes mayores de 65 años la expresión de CD200 fue altamente significativa ⁽⁴⁰⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El MM es una neoplasia que representa más del 10% del total de las neoplasias hematológicas, y es la tercera causa de mortalidad por enfermedades hematológicas. La sobrevida 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; apoyándose para su medición en la citometría de flujo. Actualmente se realizan trabajos donde se han propuesto nuevos factores pronósticos en pacientes con MM, entre ellos la expresión de CD200 y su asociación con apoptosis para inducción de la intolerancia inmune, es por ello la importancia de determinar los marcadores apoptóticos en pacientes de Novo. Para establecer líneas de investigación a futuro.

¿Cuál es la expresión de los marcadores de apoptosis en los pacientes con Mieloma Múltiple de reciente diagnóstico que no han recibido tratamiento?

OBJETIVOS

Objetivo general

Cuantificar los marcadores de apoptosis más frecuentemente expresados por citometría de flujo, en las células malignas de pacientes con MM de reciente diagnóstico que no han recibido tratamiento.

Objetivos específicos

- 1.- Cuantificar las células malignas de MM por citometría de flujo, en MO de pacientes con MM de Novo.
- 2.- Realizar Revisión Morfológica en aspirados de MO de los Pacientes con MM de Novo
- 3.- Cuantificar marcadores de Anexina V, Bcl-2, Caspasa 3, CD95, por citometría de flujo en Médula Ósea (MO) en las células de MM de Novo.
- 4.- Establecer correlación de los niveles de expresión de CD200 y los marcadores de apoptosis en las células malignas de los pacientes con MM de Novo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue transversal, prospectivo.

Se llevo acabo en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza. En 22 pacientes con diagnóstico de MM "de Novo" que ingresaron al servicio de Hematología Adulto, en el periodo comprendido del 1ro de Mayo a Octubre del 2008. Primeramente se realizo el AMO, y frotis, posteriormente el Dx. Morfológico de Mieloma esto mediante Técnica de Wright, se cubrían los extendidos de MO con colorante de Wright y se agrega el amortiguador de fosfatos pH 6.4 durante 40 minutos, se lavaran posteriormente con agua y se dejaran secar. Se observo al microscopio primeramente con el objetivo de 10x, para valorar la celularidad en la muestra, la cantidad de grasa y se cuantifico el número de megacariocitos por campo, luego pasamos al objetivo de 100x, se cuentan 200 células totales y se cuantifico el porcentaje de células plasmáticas, también se determina la relación mielo-eritroide. Se realizo también Técnica de Fosfatasa ácida: se fijan los extendidos de MO durante 4 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 37⁰C durante 2:30 h. luego se lavan y se procedió a la contratinción con Hematoxilina de Mayer por 20 minutos, se lavan y se dejan secar. Se cuenta un total de 100 células plasmáticas y se determino el porcentaje de células positivas a la tinción, el cual debían ser mayor del 20% para considerarse como positiva. Realizado el diagnóstico morfológico e inmunofenotipo para Mieloma se procedió a estadificar, utilizando la valoración de Durie-Salmon (**Ver Anexo 1**) esta misma se utilizo 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, Anti Anexina V APC, Anti Bcl-2 FITC, Anti Caspasa 3, Perlas calibradoras.

Los reactivos utilizados fueron: Solución para lisar glóbulos rojos 1 x (Becton Dickinson), Amortiguador salino de fosfatos pH 7.35 (FACS flow), Paraformaldehído al 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 nitrito de sodio al 4% y 1.2 mL de pararrosaalinilina al 4% , Solución B: disolver 1 vial de naftol AS Bifosfato en 2 mL de N dimetilformamida, luego agregar 35.6mL 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 100µL de amortiguador de fosfatos, se adicionan 10µL de anticuerpo marcado. Se mezcla e incuba durante 25 minutos a 4⁰C 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 4⁰C en oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se centrifuga a 300 X g durante 5 minutos, se decanta y se

adicionan 2 mL de amortiguador de fosfatos se resuspende, volvemos a centrifugar a 300 X g durante 5 minutos, terminada la centrifugación se elimina el sobrenadante y adicionamos 0.8mL de amortiguador de fosfatos más 0.2mL de paraformaldehído al 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 7 minutos, luego se lava con amortiguador de fosfato, se resuspende, se vuelve a centrifugar a 300 X g durante 5 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 grados en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se centrifuga, decanta y se resuspende en PBS para la adquisición de los datos.

La adquisición de datos se realiza 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 abcisas (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), vs. 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.

Para los valores de referencias se tomaron de la siguiente manera para Bcl-2 mayor del 10%, para CD95 con el 20% era positivo, Caspasa 3 con el 40% era positivo, CD138 menor del 5% son negativos y CD38 mayor del 10% son positivos. Anexina 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 CMN la Raza.

RESULTADOS

El total de pacientes incluidos con Dx. de Mieloma Múltiple en el estudio fueron 22, la frecuencia en cuanto al sexo fueron 16 (72.7%) del sexo masculino y 6 (27.3%) para el femenino, con una media para la edad de 59.13 años, mediana de 60 años y desviación estándar de 10.31, Los frotis revisados presentaron una media de 53.82% de células plasmáticas en MO y mediana de 57.50% con desviación estándar de 22.98%, en cuanto a los estadios de mieloma según clasificación de Durie-Salmon se encontraron 2 (9.1%) pacientes en estadio IA, 2 (9.1%) en estadio IIA, y 12 (54.5%) en estadio III, de los cuales 5 eran estadio A y 7 estadio B, en 6 (27.3%) pacientes no se realizó estadificación. La variedad más frecuente de MM encontrado fue IgG 15 (68.2%), IgA 3 (13.6%), No secretor 2 (9.1%), y de cadenas ligeras 2 (9.1%), Al diagnóstico 15 (68.2%) de los pacientes no presentaban daño renal, y 7 (31.8%) presentaban daño renal. 10 (45.5%) eran Bence Jones positivo y 12 (54.5%) fueron negativos. Importante reportar que 11 pacientes presentaron DHL normal en el momento del diagnóstico, en 9 se encontraba alta y en 2 pacientes baja. Se determinó Hemoglobina al diagnóstico en los 22 pts. Con una media de 10.83, mediana de 11.05, desviación estándar de 2.518, siendo en 6 pacientes normales y en 16 Hb bajas, 14 pacientes presentaron Plaquetas normales, 3 trombocitosis y 5 trombocitopenia.

Se realizó la medición de marcadores de apoptosis y CD200 en 15 pacientes, ya que en 7 (31.8%) se encontraron coaguladas (**Fig.1**) El valor de CD200 fue de media de 22.7% y una mediana de 20.50% y desviación estándar de 25.57% (**Fig.2**), Caspasa 3 (**Fig.3**) con una media de 58.08% y una mediana de 60.50%. La anexina V con una media de 65.63%,

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

2

mediana de 79.70% y Desviación estándar de 32.45 (**Fig.4**) De las proteínas antiapoptóticas se estudió Bcl-2 con una media de 19.42%, mediana de 18.6%, y desviación estándar de 19.75 (**Fig.5**). Así mismo CD95 (**Fig.6**) con media de 63.60%, mediana de 70.0% y desv. Estandar de 27.62; CD38 en 15 pacientes con media de 69.59%, mediana de 77.90% y desviación estándar de 29.53, para CD138 determinado en 15 pacientes con media de 35.50%, mediana de 15.80% y desv. Estandar de 35.55.

En cuanto a la determinación de los marcadores de apoptosis se encontró Bcl-2 alto en 9 pacientes (59.95%) y bajo en 6 (40.05%) pacientes, Caspasa 3 alto en 12 (80.0%) y normal en 3 (20.0%) pacientes, CD38 normal en 1 (6.7%) paciente, alto en 14 (93.6%), CD138 Normal en 5 (33.3%) y alto en 10 (66.7%) pacientes, CD95 alto en 4 (26.63%) y normal en 11 (73.37%) pacientes. Se estableció coeficiente de correlación de Pearson Entre la expresión de CD200 y CD95 encontrando que a mayor expresión de CD200 mayor expresión de CD95 con una $P < 0.043$ (**Fig.7**), también 10 (66.7%) pacientes fueron doblemente positivos para CD38 y CD138.

También se realizó correlación de Pearson entre la expresión Bcl-2 con CD138 encontrando que a mayor Bcl-2 menor CD138, con una $P < 0.048$ (**Fig.8**). Los pacientes fueron tratados con Talidomida-Dexametasona 8(46.2%) pacientes, Tal-Dexa-Melfalan 7 (31.8%), Melfalan-Prednisona-Tal 4 (18.2%), y 3 (13.6%) no habían iniciado tratamiento.

La mediana de supervivencia global fué de 3.8 meses, IC 95% 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 ya que únicamente un paciente falleció.

DISCUSIÓN

En los 15 pacientes con MM a los cuales se les determinó marcadores de apoptosis, pudimos darnos cuenta que Bcl2 se encontraba presente en valores altos en 9 (60%) pacientes y en 6 (40%) bajo, lo cual concuerda con varios estudios publicados en diversas patologías oncológicas, debido a que si el Bcl2 aumenta, la permeabilidad de la membrana mitocondrial disminuye, impidiendo la liberación de citocromo C y como consecuencia la inhibición de las caspasas.

CD95 se encontró normal en la mayoría de los pacientes estudiados, esto apoya el trabajo de Hiroyuki y cols, 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. 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 (-) a diferencia 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 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 y la correlación realizada nos indica que a mayor CD200 mayor CD95 y a mayor CD95 menor

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

4

Bcl2, es muy importante recordar que con estos resultados la vía de apoptosis más implicada en estos pacientes es la mitocondrial, con esto apoyaríamos los estudios realizados donde asocian a CD200 como un facilitador de la tolerancia inmune a autoantígenos asociado a 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 aumentado, CD138 disminuye. Estos hallazgos demuestran que la población de células de MM no es homogénea y resultaría interesante dar seguimiento a largo plazo a estos pacientes para corroborar la importancia pronóstica de estos marcadores.

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

CONCLUSIÓN

De las variables analizadas en este estudio solo mostro tener una 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 son los pacientes doblemente positivos para CD38 y CD138 corresponden a 67% de los pacientes.

Así como 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 3 años para poder valorar supervivencia, y 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 sana.

Tratar de analizar otros marcadores de apoptosis como: Caspasa8, Bcl-x.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Vela Ojeda J, García Ruiz Esparza MA. Mieloma Múltiple En: Borbolla Escoboza JR dir. PRINCIPIOS DE HEMATOLOGÍA bases y clínica. México, México: Masson Doyma; 2005. P. 222-229.
- 2 Bart Barlogie, John Shaughnessy, Nikhill Munshi, Joshua Epstein. Plasma Cell Myeloma En: Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller, Thomas J. Kipps dir. WILLIAMS HEMATOLOGY. New York: McGraw-Hill companies; Sixth Edition; 2000. P. 1279-1299.
- 3 Federick R. Davey M.D., Robert F. Hutchinson, M.D. Hematopoyesis En: El laboratorio en el diagnóstico clínico John Bernard Henry. Philadelphia, Pennsylvania USA: Marban; 20va Edición; 2005. P. 521-541.
- 4 Florensa L, Coll MT, Woessner S. Hematopoyesis En: Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. Madrid, España: Harcourt; 4ta Edición; 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, Tanhehco Y et al. Characterization of clonogénica 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. Madrid, España: Harcourt; 4ta Edición; 2001. P. 574-588.
- 9 Ruiz Reyes G, Ruiz Argüelles A. Padecimientos Inmunoproliferativos Malignos En: Fundamentos de hematología. México, México: Panamericana; 3ra Edición; 2003. P. 323-341.
- 10 Mateo G, Orfao A, San Miguel J. La Citometría de Flujo en el mieloma múltiple En: Mieloma Múltiple. México, 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 Vinay Kumar MD, Frcpath, Abul K. Abbas MD, Nelson Fausto MD. Apoptosis En: Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional. Madrid, España: Elsevier; 7ma. Edición; 2005. P. 26-34.
- 13 Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated 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, Rieckmann 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, Leithauser F, Eichelmann A, Bruderlein S, Dhein 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. 1995. 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, interferón-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, García-Sanz R. Prognostic Features of multiple myeloma. En: *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. Ocnogenesis 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, Lamerz R, Wick & Seidel D. 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, Puklavec 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.

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

1

ANEXOS

Anexo 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

1)Pico de IgG > 7 g/dL

2)Pico de IgA > 5 g/dL

3)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:

1)Pico de IgG < 5 g/Dl

2)Pico de IgA < 3 g/Dl

3)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

GRÁFICAS.

CD200 y moléculas de apoptosis en mieloma múltiple.

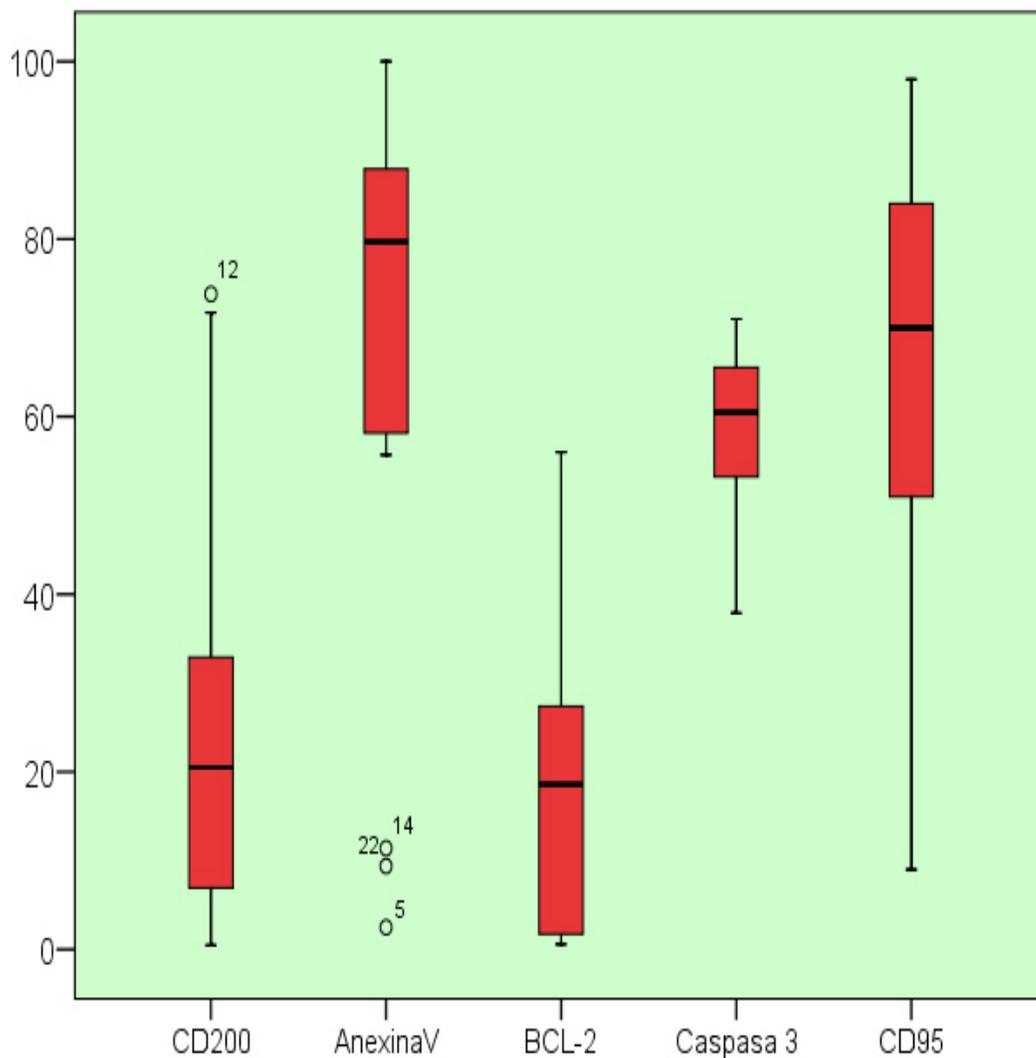


Figura 1. Representación gráfica de la comparación de medias de los marcadores involucrados en la apoptosis de los pacientes con Mieloma Múltiple con CD200.

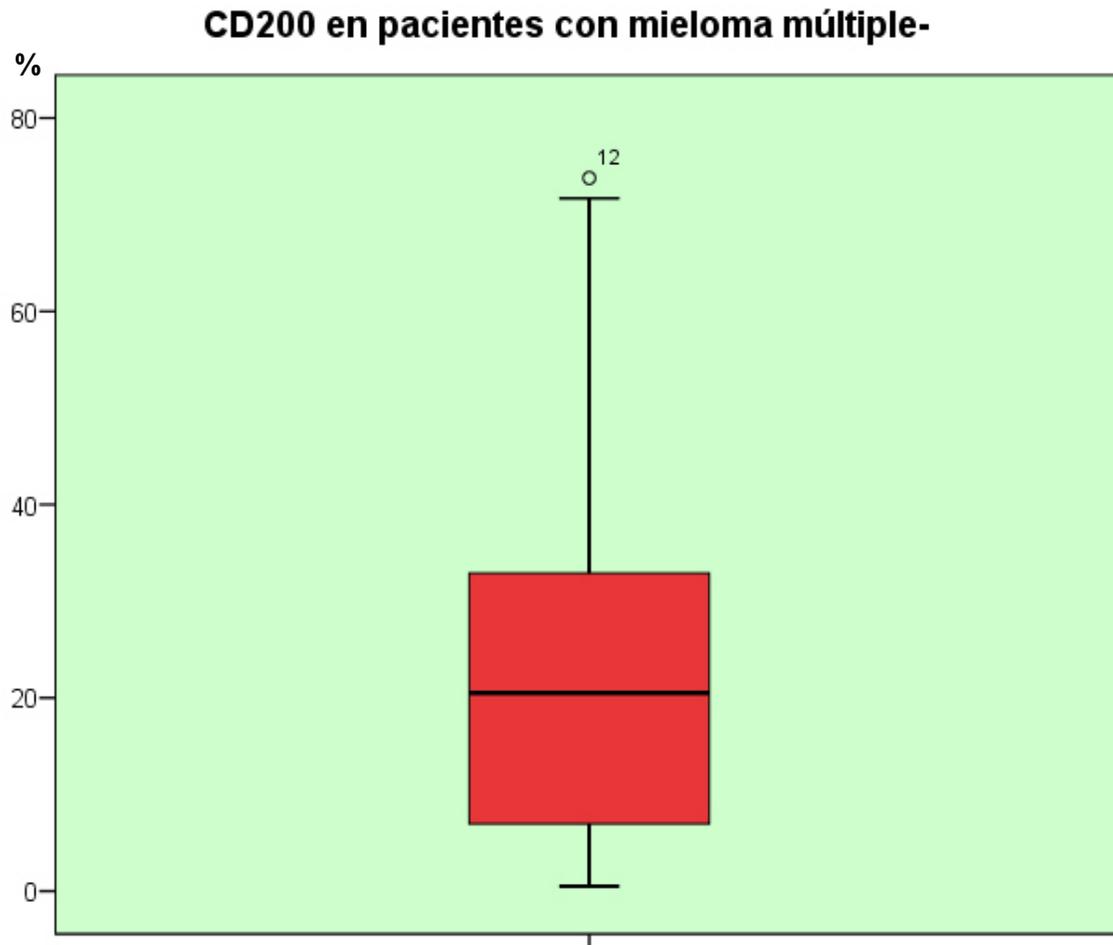


Figura 2. Representación gráfica de CD200, se observa la media obtenida y desviación estándar.

Caspasa 3 en pacientes con mieloma múltiple.

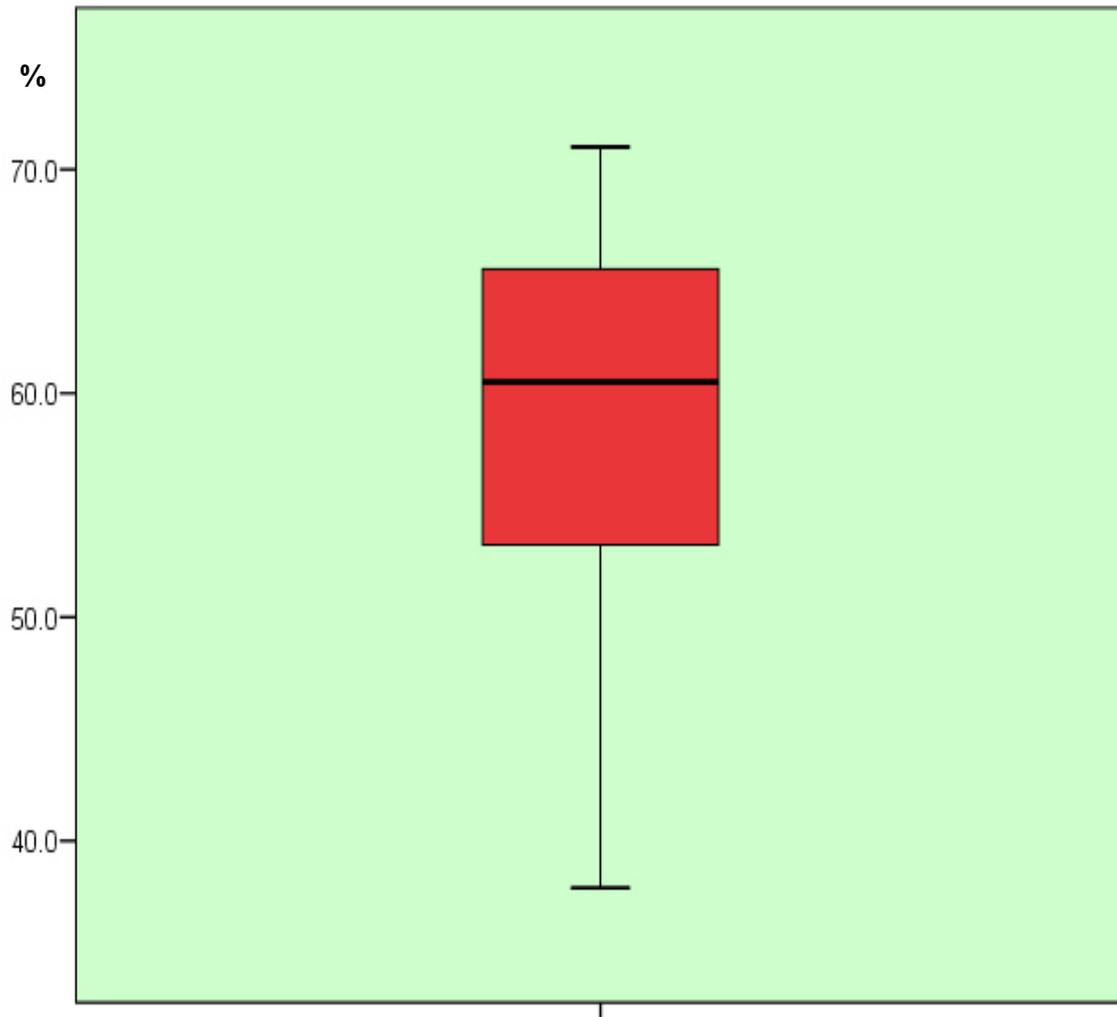


Figura 3. Representación gráfica de caspasa 3, se observa la media obtenida, desviación estándar y rangos.

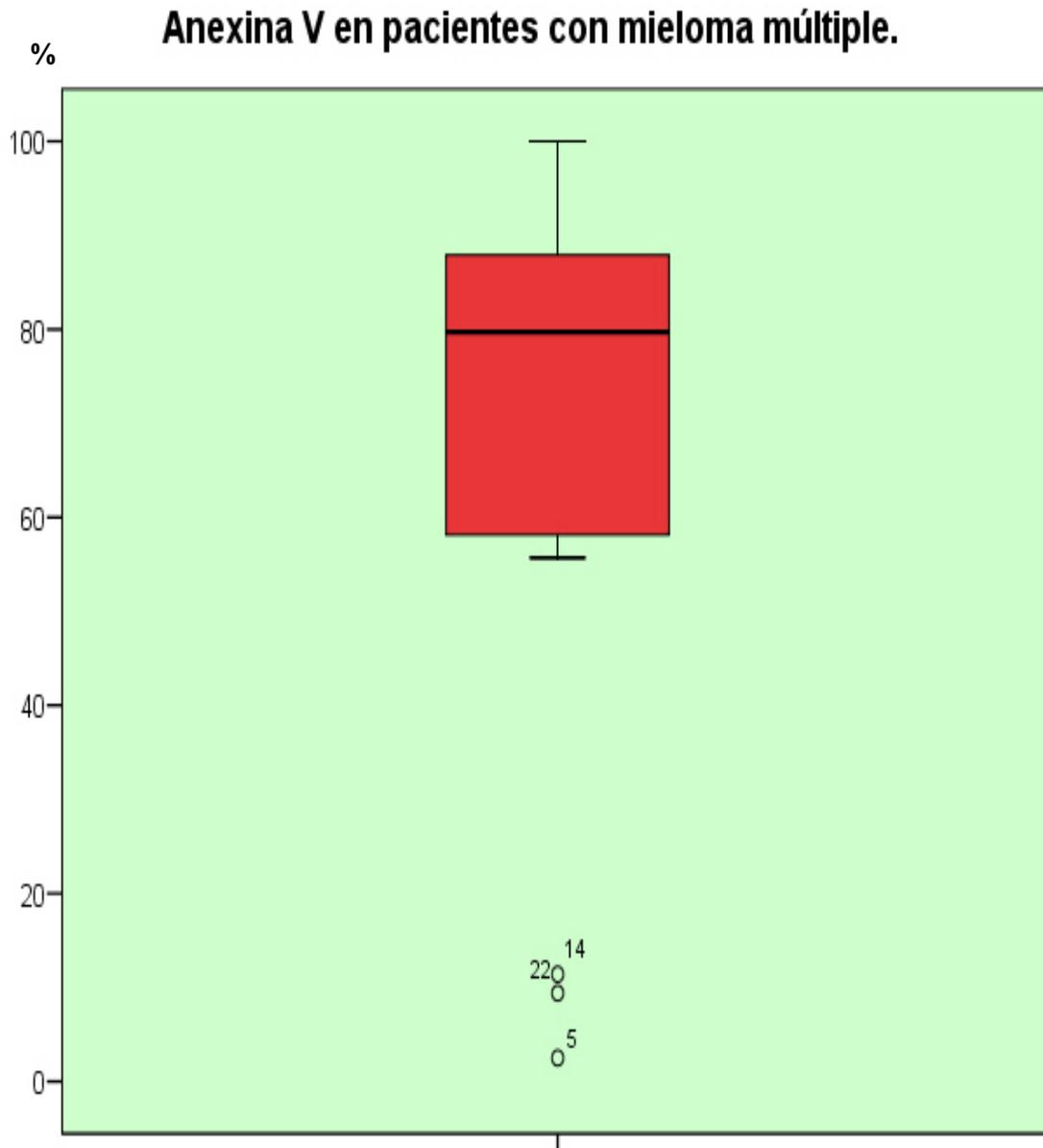


Figura 4. Determinación de anexina V en células de pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico, con representación de la media, desviación estándar y respectivos rangos.

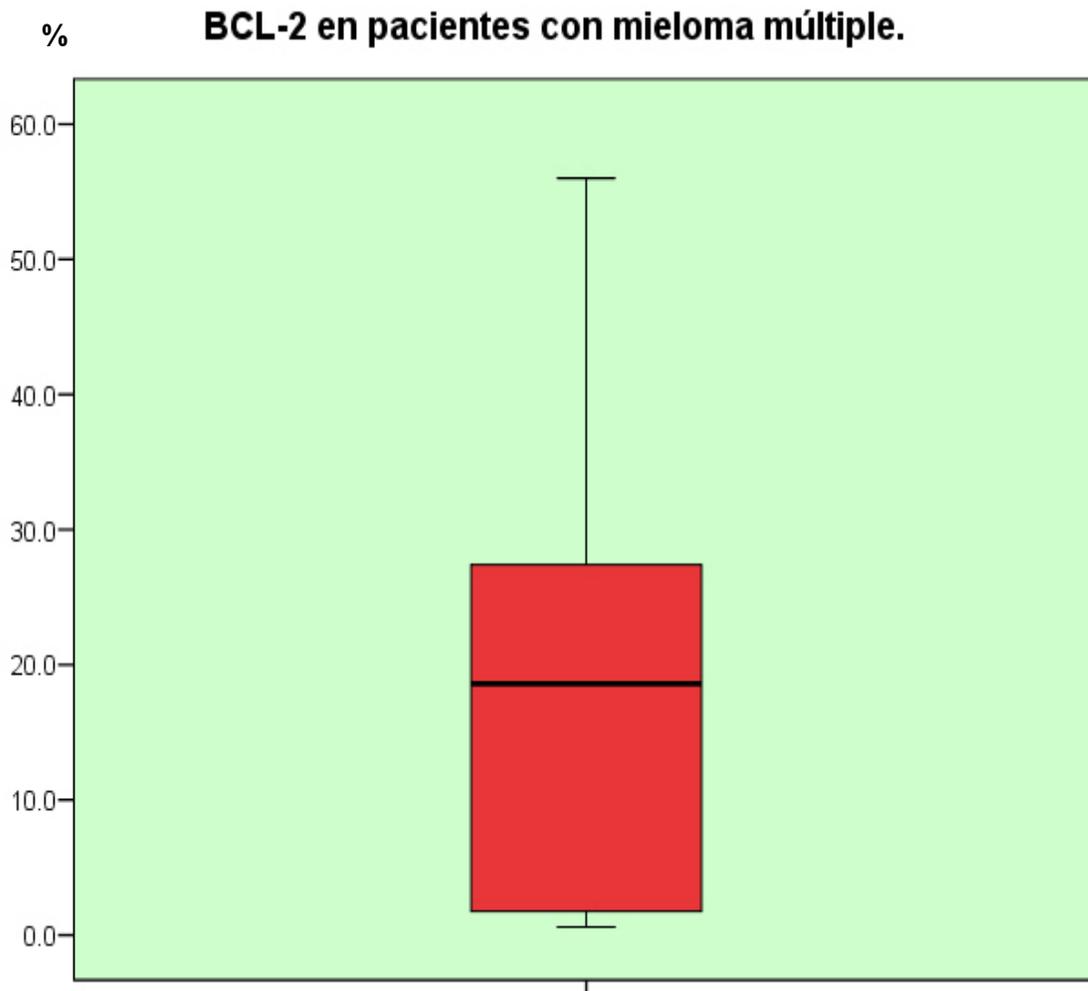


Figura 5. Determinación de Bcl2 en células de pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico, con representación de la media, desviación estándar y rangos.

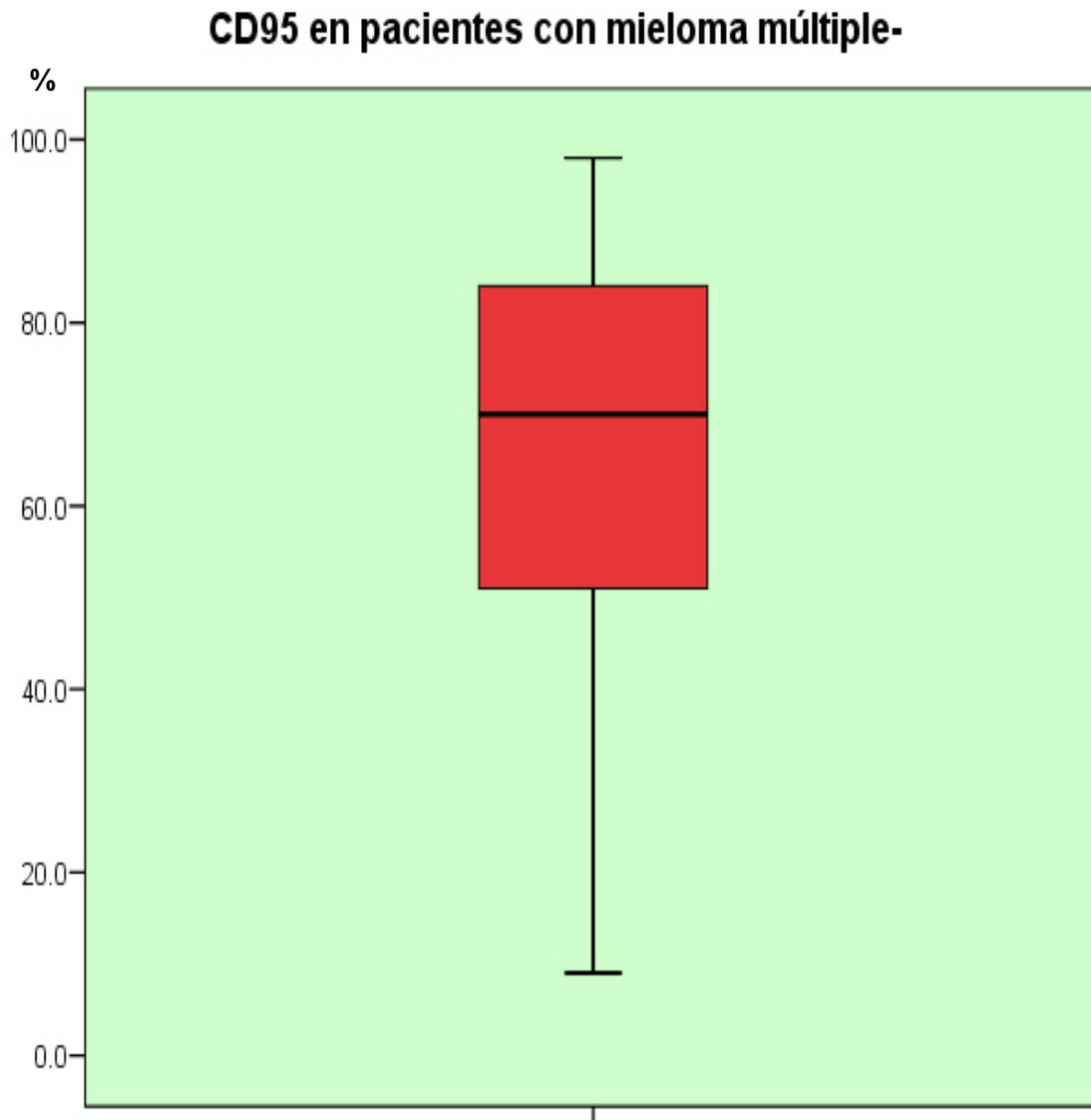


Figura 6. Determinación de CD95 en células de pacientes con mieloma múltiple de reciente diagnóstico, con representación de la media, desviación estándar y rangos.

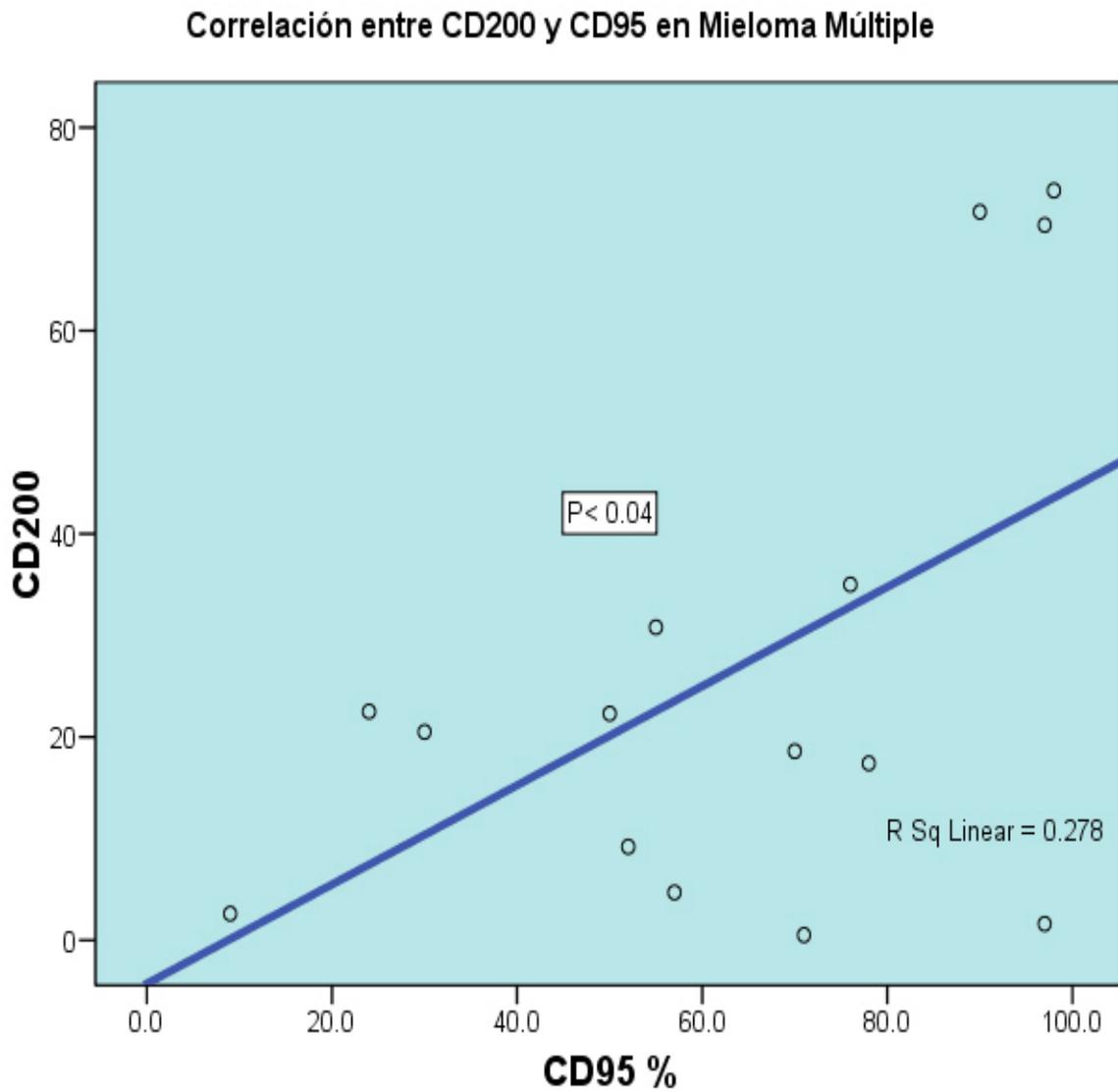


Figura 7. Representación gráfica de la correlación entre CD200 y CD95, podemos observar que a mayor CD200 mayor CD95.

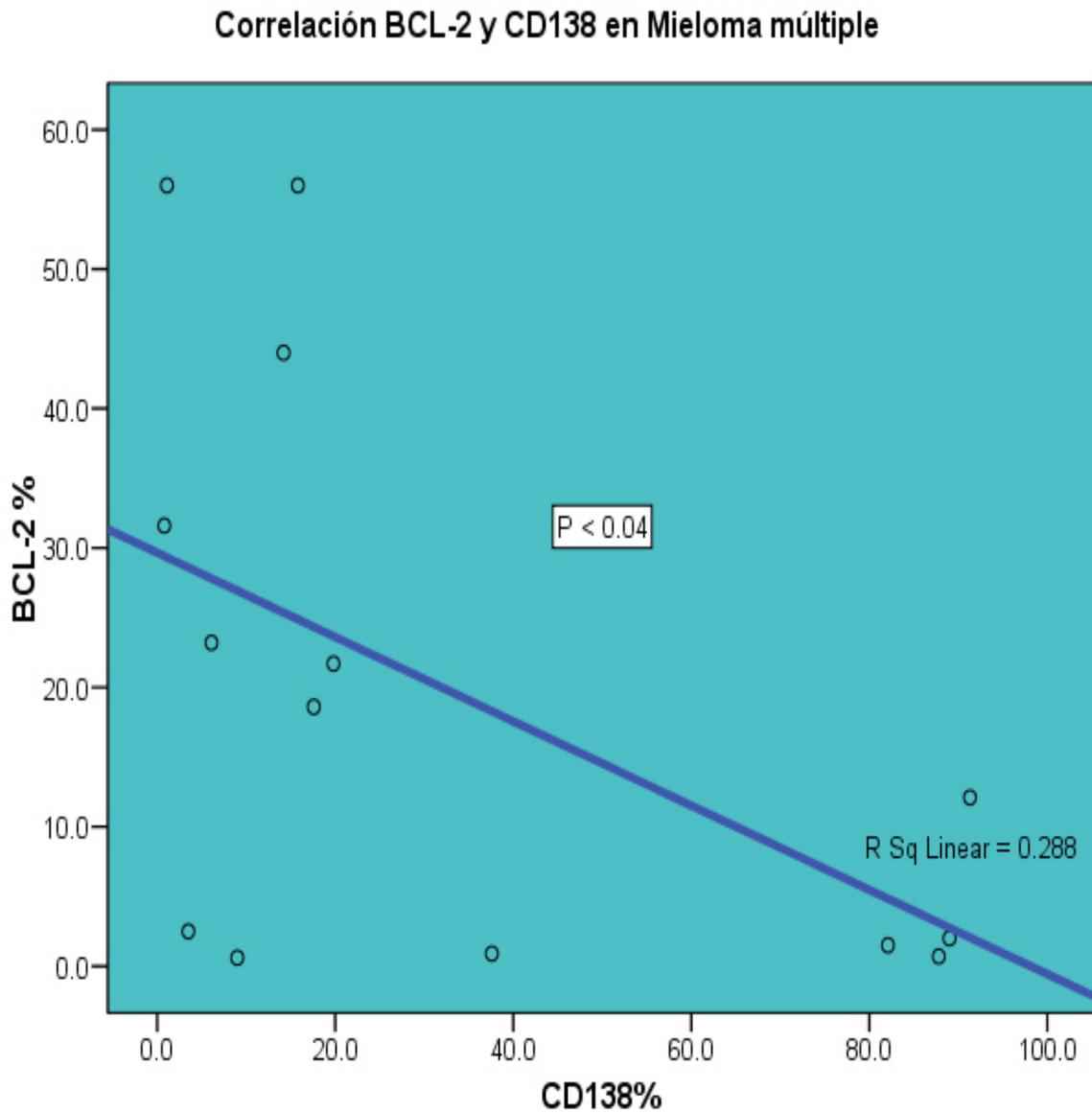
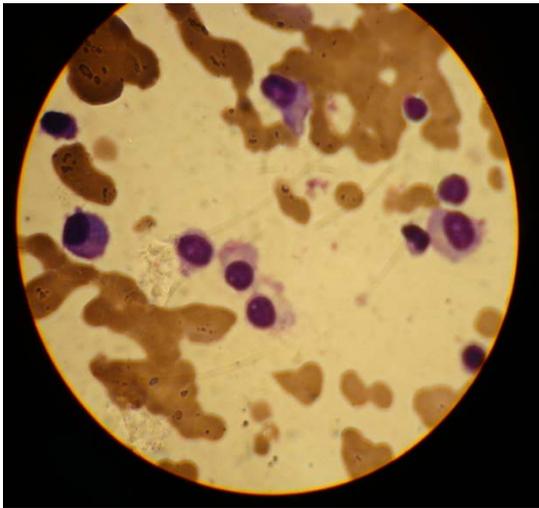
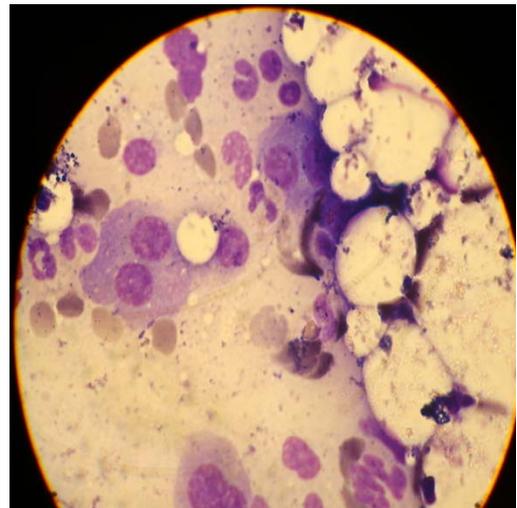


Figura 8. Representación gráfica de la correlación entre Bcl2 y CD 138 Observamos que a mayor Bcl2 menor CD138.

**Imágenes de la revisión microscópicas en Médula Ósea de
nuestros pacientes del estudio.**

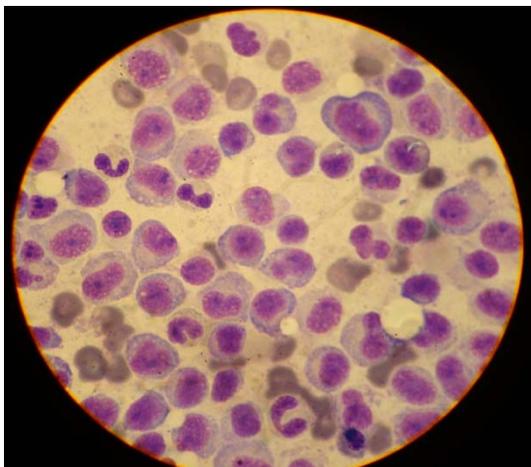


(a)

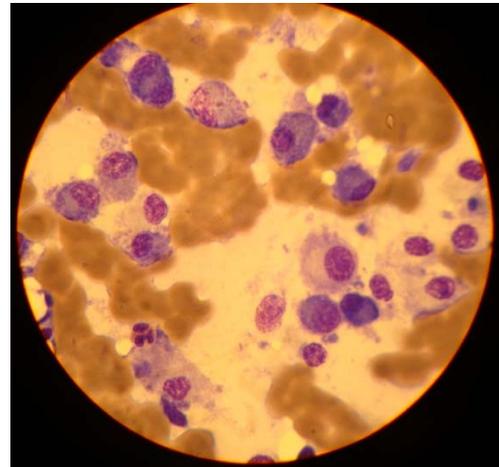


(b)

Figura. 9 a y b Frotis de MO donde se observan células plasmáticas con características de binucleación



c



d

Figura. 10 c y d. Frotis de MO vista microscópica con infiltración importante de células plasmáticas.



Figura. 11 Citómetro de Flujo FACSCalibur.

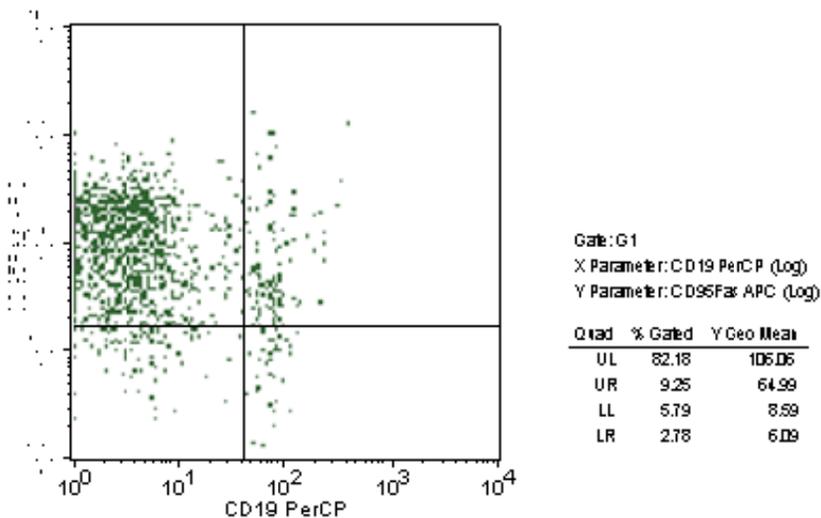


Figura.12 Representación gráfica de la citometría de flujo zona de CP CD19 en el eje de las X.

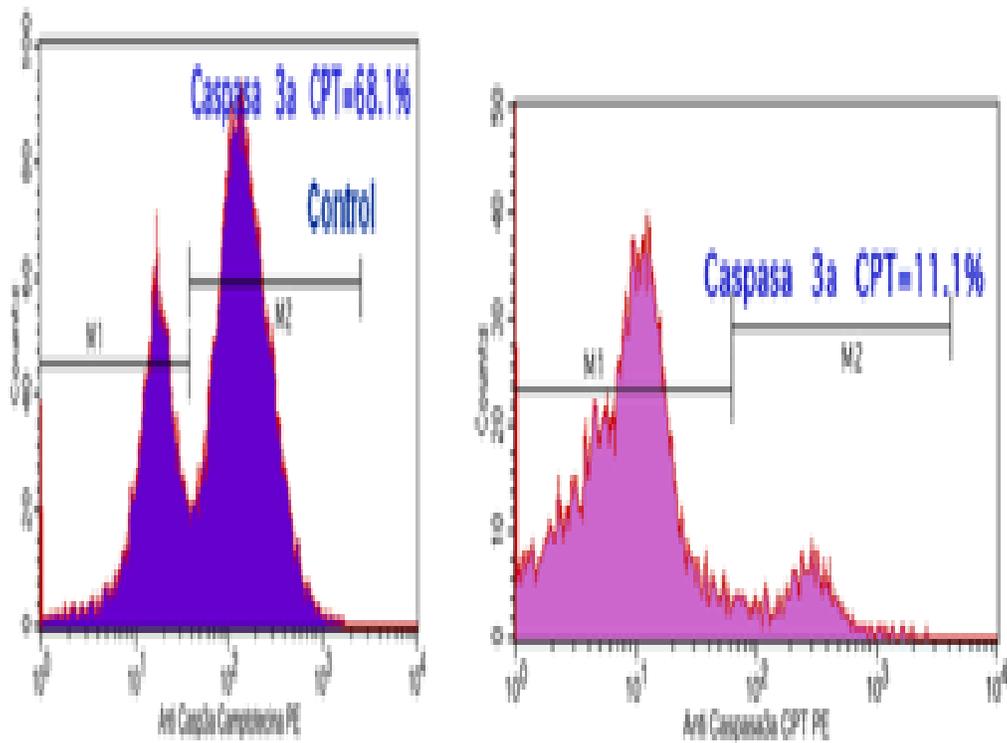


Figura.13 Representación gráfica de la medición de caspasa 3 por citometría de flujo.