

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología



**REGULACIÓN DE LA FORMA ACTIVA DE
CD29 EN CÉLULAS PLASMÁTICAS
NORMALES Y TUMORALES DE MÉDULA
ÓSEA Y SU RELACIÓN CON LA
FISIOPATOLOGÍA DE LAS GAMMAPATÍAS
MONOCLONALES.**

EVA MARTÍNEZ VIÑAMBRES

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

**Regulación de la forma activa de la integrina
CD29 en células plasmáticas normales y
tumoraes de médula ósea y su relación con la
fisiopatología de las gammapatías monoclonales.**

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología

Presentada por la licenciada

Eva Martínez Viñambres

Director:

Dr. Ernesto Roldán Santiago,

Facultativo Especialista de Área, Servicio de Inmunología

Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Tutor:

Dr. Francisco Sanz Rodríguez,

Profesor Titular de Biología de la UAM

Madrid 2011



Hospital Universitario
Ramón y Cajal

Comunidad de Madrid



SERVICIO DE INMUNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

D. Ernesto Roldán Santiago, Doctor en Biología y Biólogo Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal,

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada “**Regulación de la forma activa de la integrina CD29 en células plasmáticas normales y tumorales de médula ósea y su relación con la fisiopatología de las gammopatías monoclonales**”, ha sido realizada en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid y tutelada en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid. Como Director de esta Tesis realizada por D^{ña}. Eva Martínez Viñambres, está de acuerdo tanto con los métodos empleados como con los resultados obtenidos. Por tanto, considera que reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de optar al grado de Doctor.

Fdo. Dr. Ernesto Roldán Santiago

Facultativo Especialista de Área

Servicio de Inmunología

Hospital Universitario Ramón y Cajal

VºBº el Tutor:

Profesor D. Francisco Sanz Rodríguez

Departamento de Biología

Universidad Autónoma de Madrid

ÍNDICE

	Página
<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN</u>	4
<u>INTRODUCCIÓN</u>	
1. La médula ósea y su microambiente.	
1.1 Fisiología de la médula ósea	7
1.2. Componentes de la médula ósea	8
2. Células plasmáticas.	
2.1. Origen y generación de las células plasmáticas	9
2.2. Capacidad migratoria de los plasmoblastos y alojamiento final	11
2.2. Alojamiento de las células plasmáticas en la médula ósea	11
3. Interacciones de las células plasmáticas con el estroma medular.	
3.1. Moléculas de adhesión	13
3.2. Integrinas.	
3.2.1. Estructura de las integrinas	15
3.2.2. Mecanismo de la adhesión mediada por integrinas	17
3.2.3. Unión de VLA-4 (CD49d) a sus ligandos	19
3.2.4. Modificaciones post-traduccionales de las integrinas	20
3.2.5. Alteraciones en la expresión de las integrinas y su relación con la capacidad metastásica de tumores	21
4. Gammapatías monoclonales.	
4.1. Clasificación	22
4.2. Etiopatogenia	25

4.3. Gammapatía monoclonal de significado incierto o MGUS	26
4.4. El mieloma múltiple.	
4.4.1. Clínica	28
4.4.2. Diagnóstico	29
4.4.3. Estadiaje	30
4.4.4. Tipos de mieloma múltiple	32
4.4.5. Tratamiento	33
4.4.6. Detección de células plasmáticas circulantes	34
4.4.7. Fisiopatología del mieloma múltiple.	
4.4.7.1. Interacciones de las células de mieloma múltiple con células del microambiente	35
4.4.7.2. Contribución de las redes de citoquinas, otros factores solubles y sus receptores en el mantenimiento de la célula mielomatosa	36
4.4.7.3. Proliferación de las células plasmáticas malignas	38
4.4.7.4. Apoptosis y supervivencia de las células plasmáticas malignas	39
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	42
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
<u>RESULTADOS</u>	
1. Caracterización de células plasmáticas en médula ósea	58
2. Análisis de la expresión de la forma constitutiva y activada de la integrina CD29 en células plasmáticas de médula ósea. Relación con la expresión de otras moléculas de adhesión: CD44, VLA-4 e integrina β 7	60
3. Análisis de la expresión diferencial de la forma constitutiva y activa de CD29 en pacientes con MGUS	69

4. Regulación de la forma activa de la integrina CD29 por factores solubles contenidos en el plasma medular	71
5. Efecto de la adición exógena de cationes divalentes en la activación de la integrina CD29 en las células plasmáticas de médula ósea	75
6. Efecto de la adición exógena de CD106 soluble recombinante en la activación de la integrina CD29 en las células plasmáticas de médula ósea	77
7. Refractoriedad de las células plasmáticas HUTS21 ⁻ a la activación de CD29 por los factores inductores contenidos en el plasma medular	78
8. Correlación entre la expresión de la forma activa de CD29 en las células plasmáticas de médula ósea y la detección de células plasmáticas circulantes	81
9. Respuesta de las células plasmáticas en plasmocitosis reactivas al efecto de los factores que inducen la activación de CD29	84
10. Correlación entre la unión a fibronectina y los niveles <i>in vivo</i> de la integrina CD29 activada	86
11. Perfil electroforético de CD29 en células plasmáticas normales y tumorales de pacientes HUTS21 ⁺ y HUTS21 ⁻	87
12. Capacidad proliferativa de las células plasmáticas normales y tumorales. Índice proliferativo en MM HUTS21 ⁺ y HUTS21 ⁻	89
13. Expresión de moléculas asociadas a supervivencia y apoptosis en células plasmáticas normales y tumorales	91
14. Células preplasmáticas tumorales en el linfoma de cavidades: un modelo de déficit de adhesión	95
<u>DISCUSIÓN</u>	100
<u>CONCLUSIONES</u>	113
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	116
<u>APÉNDICE</u>	143

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
BCIP	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
BCR	<i>B cell Receptor</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTF	Citometría de Flujo
CP	Célula Plasmática
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	<i>Death Receptor</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
EEM	Error Estándar de la Media
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FN	Fibronectina
FSC	<i>Forward Scatter</i> (equivalente al tamaño celular)
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HHV-8	<i>Human Herpesvirus 8</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
Ig	Inmunoglobulina
IGF-I	<i>Insulin Like-Growth Factor I</i>
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
kD	kilodaltons
LA	Líquido Ascítico
LB	Linfocito B
LCP	Leucemia de Células Plasmáticas
LFA-1	<i>Leukocyte Function-associated Antigen-1</i>
LP	Líquido Pleural
LT	Linfocito T
MAPK	<i>Mytogen Activated Protein Kinase</i>
MC	Medio Completo
MEC	Matriz Extracelular

MGUS	<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>
MIDAS	<i>Metal Ion-Dependent Adhesion Site</i>
MM	Mieloma Múltiple
MO	Médula Ósea
NBT	<i>Nitro-Blue Tetrazolium Chloride</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein (Proteína clorofila-peridina)</i>
PEL	<i>Primary Effusion Lymphoma</i>
rpm	revoluciones por minuto
rsCD106	CD106 soluble recombinante
SDF-1α	<i>Stromal Cell Derived Factor-1α</i>
SP	Sangre Periférica
SSC	<i>Side Scatter</i> (equivalente a la granularidad o complejidad celular)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TA	Temperatura Ambiente
TLR	<i>Toll like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TTBS	<i>Tween-Tris Buffered Saline</i>
u.a.	unidades arbitrarias
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

RESUMEN

Las gammapatías monoclonales son neoplasias hematológicas caracterizadas por la acumulación de células plasmáticas (CP) tumorales en la médula ósea (MO), siendo el mieloma múltiple (MM) el prototipo de este grupo de enfermedades. En la mayoría de los casos, las CP malignas permanecen retenidas en el microambiente medular, sin que se conozcan con precisión las moléculas de adhesión implicadas en este comportamiento ni, en especial, los factores que regulan la expresión o la funcionalidad de tales moléculas. Quizá el ejemplo más claro de este hecho sean el de las integrinas $\beta 1$ (CD29), un grupo de moléculas de adhesión expresadas en las CP de MO que han demostrado tener un papel relevante en la adhesión de estas células al microambiente medular. Aunque están expresadas por la práctica totalidad de las células de MO, no se conocen los motivos por los que ejercen esta función adhesiva en las CP y no en el resto de poblaciones celulares de MO que también expresan CD29.

Nuestros resultados demuestran que las CP de MO de individuos sanos y las CP tumorales de la mayoría de los pacientes con MM (y otras gammapatías monoclonales) expresan la forma activa de la integrina CD29, es decir, la forma que muestra una gran afinidad por sus ligandos. Por el contrario, el resto de poblaciones leucocitarias de MO expresaron esta molécula en su forma inactiva (constitutiva). Además, demostramos que la forma activa de CD29 en las CP está regulada por cationes divalentes (Mn^{2+} y Mg^{2+}) y por CD106 (VCAM-1) soluble, todos ellos contenidos en el plasma medular tanto de pacientes con MM como de individuos sanos. El papel regulador de estos factores adquiere especial relevancia en la minoría de pacientes de MM que no expresan *in vivo* la forma activa de la integrina CD29 en sus CP, pues éstas fueron refractarias, *in vitro*, a la acción activante de estos factores solubles. Entre este grupo minoritario de pacientes se encuentran los pacientes con leucemia de CP (LCP), una variante de la enfermedad caracterizada por la salida masiva de CP a sangre periférica (SP). De hecho, los resultados también han demostrado una manifiesta correlación entre la ausencia de la forma activa de la integrina CD29 en las CP y una salida favorecida de las mismas a SP. Estas células circulantes, además, manifiestan una capacidad proliferativa mayor que las CP normales y tumorales acantonadas en MO. Estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia de esta molécula en el comportamiento biológico de las CP malignas (y normales) y su papel en la progresión del MM.

INTRODUCCIÓN

1. LA MÉDULA ÓSEA Y SU MICROAMBIENTE

1.1 Fisiología de la médula ósea.

La médula ósea (MO) es un tejido blando y con consistencia gelatinosa que rellena las cavidades óseas. Constituye alrededor del 4% del peso corporal total en adultos y su función principal es mantener en la sangre periférica (SP) un nivel constante de las distintas poblaciones celulares maduras de naturaleza hematopoyética. Existen dos tipos de MO: la MO roja y la MO amarilla. Las células maduras circulantes tienen su origen en un componente celular de la MO roja, que se corresponde con un conjunto de células madre hematopoyéticas con un alto grado de indiferenciación (“stem cells”). La MO amarilla contiene fundamentalmente tejido graso.

La MO se encuentra ampliamente irrigada por arterias que, por una parte, le aportan nutrientes y, por otra, le permiten el intercambio de factores de crecimiento con la SP (citoquinas, hormonas y distintas sales de calcio, magnesio y manganeso). Además, la MO está regulada tanto por factores humorales (eritropoyetina, citoquinas y factores de crecimiento) como celulares (migración continua de células a la sangre), así como por inervación nerviosa (1).

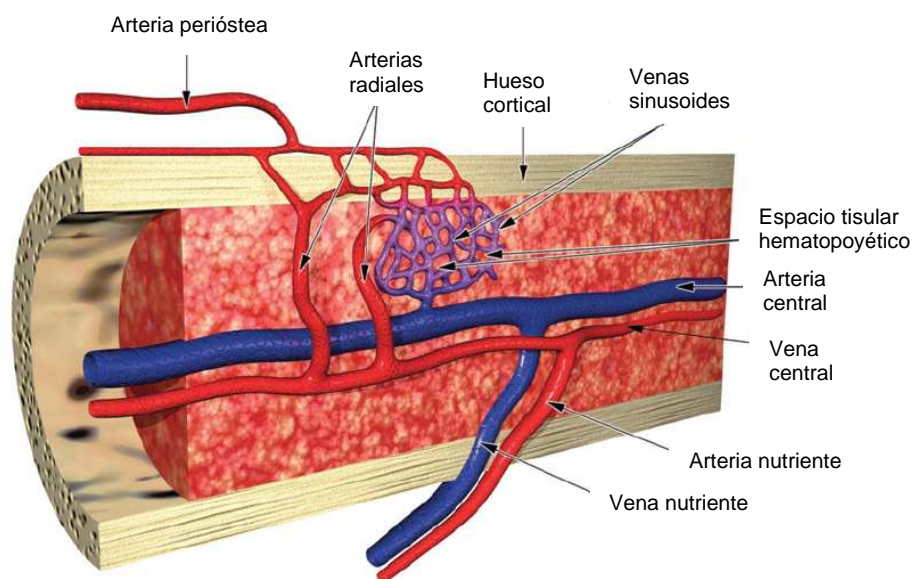


Figura 1. Estructura de la MO y aporte vascular. Adaptado de Travlos et al (ref.1)

1.2. Componentes de la médula ósea.

La MO roja está compuesta fundamentalmente por:

a) células del sistema hematopoyético. Está constituido por las células madre pluripotenciales que, bajo la influencia de diferentes factores solubles e interacciones celulares, se diferencian en los diferentes tipos de células progenitoras, células precursoras y células ya maduras y funcionales que, sólo entonces, se exportarán a la SP. Este es el motivo por el que podemos encontrar todos los estadios madurativos de las distintas series (eritroide, linfoide y mieloide), desde las formas blásticas (eritroblastos, mieloblastos, monoblastos, linfoblastos y megacarioblastos) hasta células totalmente maduras (eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos) (2);

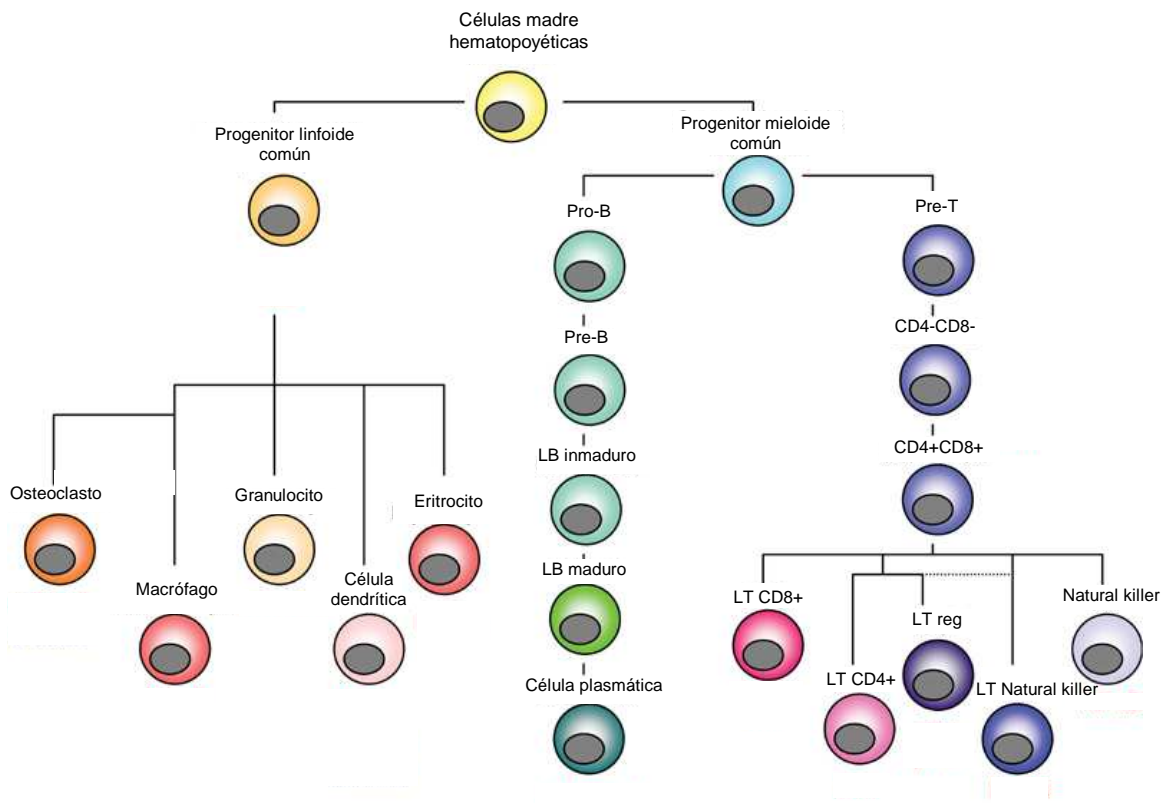


Figura 2. Diagrama esquemático de los componentes celulares del sistema inmunitario. Adaptada de Bottero et al (ref. 3).

b) el estroma, el tejido que soporta la estructura de la MO. El estroma está constituido por las células del estroma y por la matriz extracelular (MEC) que ellas mismas sintetizan (4). En la MO se han detectado al menos cuatro tipos diferentes de células estromales: células mesenquimales (también denominadas células reticulares), células endoteliales, osteoblastos y adipocitos. Estas células producen y secretan al medio tanto glicoproteínas de elevado peso molecular que forman una red o matriz como citoquinas que sustentan la hematopoyesis. La MEC está constituida por una mezcla de proteoglicanos y glicoproteínas como el colágeno, siendo los de tipo I y III los que más abundan en el compartimento hematopoyético. Los proteoglicanos son moléculas con un núcleo proteico al que se adhieren una o más cadenas laterales de glucosaminoglicanos, como el condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico (5). Las glicoproteínas contienen distintos dominios funcionalmente activos que interactúan con proteínas de la superficie de la célula así como con otras moléculas de la matriz. Estas glicoproteínas adhesivas incluyen la fibronectina, vitronectina, laminina, trombospondina y el factor de von Willebrand, conteniendo muchas de ellas algunos dominios en común, como el dominio arginina-glicina-aspartato o dominio RGD, que media adhesión celular a través de receptores de membrana de la familia de las integrinas (6). La fibronectina está presente tanto en una forma insoluble en la matriz extracelular y la membrana basal del endotelio como en forma soluble en el plasma, y es un importante sustrato tanto para la adhesión celular en la linfopoyesis como, por ejemplo, en el proceso de metástasis de las células tumorales.

2. CÉLULAS PLASMÁTICAS

2.1. Origen y generación de las células plasmáticas.

La generación de las células plasmáticas (CP) es dependiente de varios factores que incluyen productos microbianos (tal como ADN), citoquinas y moléculas de membrana generalmente expresadas en linfocitos T (LT) o en células dendríticas. Estos estímulos difieren en relación a su capacidad para activar con mayor o menor eficiencia a diferentes poblaciones de células B y también para generar o no CP de vida media larga. A su vez, la activación de los linfocitos B (LB) puede darse en territorios muy diversos, tales como órganos linfoides periféricos, asociados a mucosas, en la sangre o en la cavidad peritoneal. Por ejemplo, la combinación de interleuquinas como IL-2, IL-

10 y fragmentos de ADN bacteriano diferencian a los LB de memoria en CP, asistido por la expresión del receptor de tipo *toll* 9 (TLR-9) (7). Las células B vírgenes, sin embargo, necesitan que a estos tres estímulos se añada la estimulación de su receptor (receptor de la célula B -BCR- específico para el antígeno) para generar células secretoras de anticuerpos (8).

Otra vía de generación de CP es dependiente de la colaboración de las células dendríticas plasmocitoides, que tras ser estimuladas a través del TLR-9 secretan grandes cantidades de interferones tipo I, induciendo tanto a las células B vírgenes como a las de memoria a diferenciarse a CP por la vía del TLR-7, sin necesidad de una estimulación previa mediada por el BCR ni de la ayuda de los linfocitos T (9). También los LT tienen un papel importante en la producción de CP mediante la secreción de IL-21, actuando en sinergia con la interacción de las moléculas CD40-CD154 y con la señalización mediada por el BCR (10,11).

Una vez que las células B (vírgenes o de memoria) son activadas por cualquiera de estas vías en los órganos linfoides periféricos, migran a zonas extrafolículos o a los folículos linfoides, donde darán lugar a los centros germinales (12). En las zonas extrafolículos se diferencian a plasmoblastos y seguidamente a CP, la mayoría de ellas, aunque no todas, con una vida media muy corta.

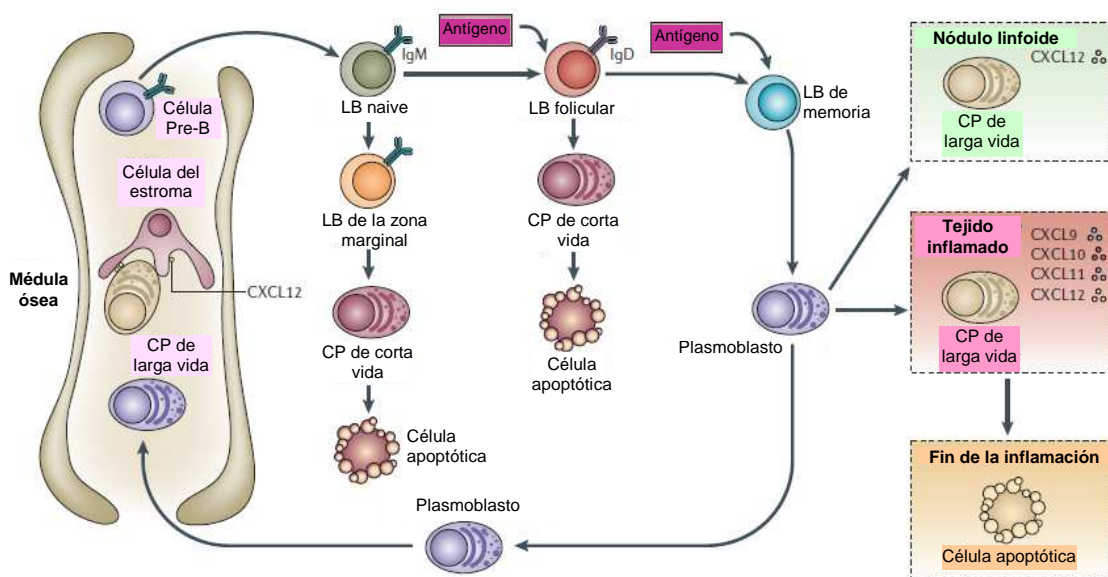


Figura 3. Ontogenia y migración de las CP maduras. Adaptada de Radbruch et al (ref. 13).

En los centros germinales de los folículos y dependiendo de las señales recibidas, pueden dar lugar a células de memoria o a CP de vida media larga.

2.2. Capacidad migratoria de los plasmoblastos y alojamiento final.

La activación de los LB T-independiente en zonas extrafoliculares conduce a la producción local de anticuerpos en el bazo y en los nódulos linfoides. Sin embargo, en la activación T-dependiente se generan CP tanto en zonas extrafoliculares como en los centros germinales, permaneciendo en los nódulos linfoides durante periodos de tiempo muy variables. A su vez, se generan plasmoblastos que pueden detectarse en sangre periférica (por ejemplo, tras la inmunización) y que se alojarán en diferentes territorios dependiendo de la expresión de diferentes moléculas de adhesión y la expresión de receptores para quimioquinas que determinarán la respuesta a estos factores solubles (14). Es muy revelador que el destino de estos plasmoblastos coincide en la gran mayoría de las ocasiones con el lugar en que las células B fueron inicialmente activadas (es decir, su alojamiento en tejidos inflamados, mucosos o periféricos). Por ejemplo, cuando las células B de las placas de Peyer o de los nódulos linfoides mesentéricos son activadas, realizan el cambio de isotipo de la inmunoglobulina (Ig) hasta células IgA+ y, a su vez, expresan los receptores de quimioquinas CCR9 y CCR10. Estas células se diferencian hasta plasmoblastos y terminan alojándose en el intestino delgado o en la lamina propia (15). De la misma manera, la producción de IFN- γ en tejidos inflamados induce la expresión de CXCR3 en las células B, de manera que los plasmoblastos generados son guiados de nuevo al mismo territorio del que partieron (16).

Sin embargo hay una notable excepción a esta regla: los plasmoblastos IgG+ generados en los centros germinales se acumulan y persisten por largos periodos de tiempo en MO como CP de larga vida (17).

2.3. Alojamiento de las células plasmáticas en la médula ósea.

El destino final de una fracción de las células que se han diferenciado en el centro germinal de un ganglio hasta células que contienen en su citoplasma IgG (citoIgG+), pero que aún se mantienen en un estadio madurativo previo al de CP madura, no es, como acaba de subrayarse, el propio nódulo linfoide u otro territorio

cercano, sino la MO. Los plasmoblastos circulantes expresan en su membrana tanto CXCR4 como CXCR5 (18), y responden de forma muy activa a la señal quimioatrayente de CXCL12 (SDF-1), una quimioquina sintetizada y secretada por una fracción de células mesenquimales de la MO (19). De esta manera, los plasmoblastos se alojan en un nicho especializado de la MO constituido por células de estroma CXCL12+ (20). De hecho, se ha demostrado recientemente que aproximadamente el 90% de las células CD138+/citoIgG+ de MO de ratón se encuentran en contacto con células de estroma CXCL12+ (21). En la transición que transforma el plasmoblasto en CP madura, se pierde la capacidad proliferativa y la capacidad de respuesta migratoria a CXCL12, aunque se desconocen las señales que regulan esta transición.

El alojamiento de las CP citoIgA+ en MO (que representan por término medio el 40% de las CP totales en MO) sigue una vía diferente al de las células citoIgG+. De hecho, un estudio reciente sugiere fuertemente que, en humanos, la mayoría de las CP citoIgA+ de MO expresan en su membrana CCR10 y la integrina $\beta 7$, sugiriendo una importante contribución de las CP de mucosas al *pool* de CP de vida media larga en la MO (22).

En general, las CP alojadas en amígdalas y mucosas son células proliferantes, mientras que las alojadas en MO no lo son (23). Esta dependencia o no de síntesis de ADN de las CP de diferentes territorios probablemente tenga que ver con la diferente velocidad de síntesis de la Ig que exhiben en su membrana, así como con su vida media (24).

No se conoce con certeza qué determina que una CP sobreviva durante periodos de tiempo muy variables en los diferentes territorios, pero algunos estudios apuntan que los niveles de ciertos factores de transcripción como Pax5 y Blimp-1 y la independencia de las señales de IL-6 juegan un papel importante en el desarrollo de uno u otro tipo de CP (25).

3. INTERACCIONES DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS CON EL ESTROMA MEDULAR

3.1. Moléculas de adhesión.

Las CP de MO son consideradas células sésiles debido a su fuerte anclaje a diferentes componentes del estroma medular. Las moléculas de adhesión son el nexo fundamental que las mantienen ancladas a su nicho medular. Entre las más conocidas y estudiadas se encuentra CD44; constituye el receptor mayoritario para ácido hialurónico, así como en menor medida para condroitin sulfato, colágeno y fibronectina (a través del dominio de unión a heparina), glucoproteínas todas ellas presentes en la MEC de la MO. Además de su relación con distintos tipos de tumores y diversas enfermedades inflamatorias, está ampliamente documentado su vínculo con las CP, de manera que su sobreexpresión está relacionada con un mal pronóstico de los pacientes con mieloma múltiple (MM), jugando por tanto un papel importante en la migración y la adhesión de las células tumorales (26). Se han descrito diversas isoformas, siendo estas específicas de cada tejido, y cuya diferencia principal radica su distinto nivel de glicosilación. Así, la forma CD44s es la única encontrada en eritrocitos (27), siendo la CD44v la sobreexpresada en el MM extramedular (28).

Otra molécula de adhesión imprescindible en la adhesión de las CP a la matriz medular es CD54 (ICAM-1; *Intercellular Adhesion Molecule-1*). Se expresa en la mayoría de las CP de MO y es el ligando de CD11a (LFA-1), integrina que se encuentra mayoritariamente expresada en la membrana de las células endoteliales y responsable del paso del endotelio hacia el foco de inflamación. Al igual que CD44, CD54 se encuentra altamente glicosilado en su porción extracelular, siendo de gran importancia por la gran flexibilidad que aporta en la unión a sus distintos ligandos, ya que, además de CD11a puede unirse a fibrinógeno y a CD11b (Mac-1), presentes en la MEC y la superficie de los macrófagos, respectivamente (29).

Dentro de las moléculas de adhesión más estudiadas en las CP se encuentran la familia de las integrinas, grupo que puntualizaremos con detalle a continuación.

3.2. Integrinas.

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas de membrana que median tanto la adhesión célula-célula como la adhesión celular a diferentes constituyentes de la MEC, y son consideradas en la mayor parte de las estirpes celulares como el mayor y más importante grupo de receptores para proteínas extracelulares (30). Además, son responsables de proveer el nexo funcional entre el ambiente extracelular y el citoesqueleto. Por otro lado, conectan con enzimas que desencadenan diferentes vías de señalización, algunas de ellas necesarias para la propia función adhesiva (31). Sus ligandos son principalmente proteínas del estroma medular como la fibronectina, laminina, colágeno, tenascina, vitronectina, osteopontina, fibrinógeno, heparina y plasmina, entre otras, y también otros receptores expresados en las células estromales de los diferentes microambientes, tales como cadherinas, selectinas o CD106 (VCAM-1; *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (32).

En las interacciones célula-célula y atendiendo al tipo de proteína al que se une la integrina, la unión puede ser homofílica (si la unión se realiza entre dos proteínas idénticas) o heterofílica (si el ligando y el receptor son proteínas distintas). Así mismo, dependiendo de los tipos celulares que interactúan, la unión puede ser homotípica (si se unen células idénticas) o heterotípicas (si se unen células diferentes).

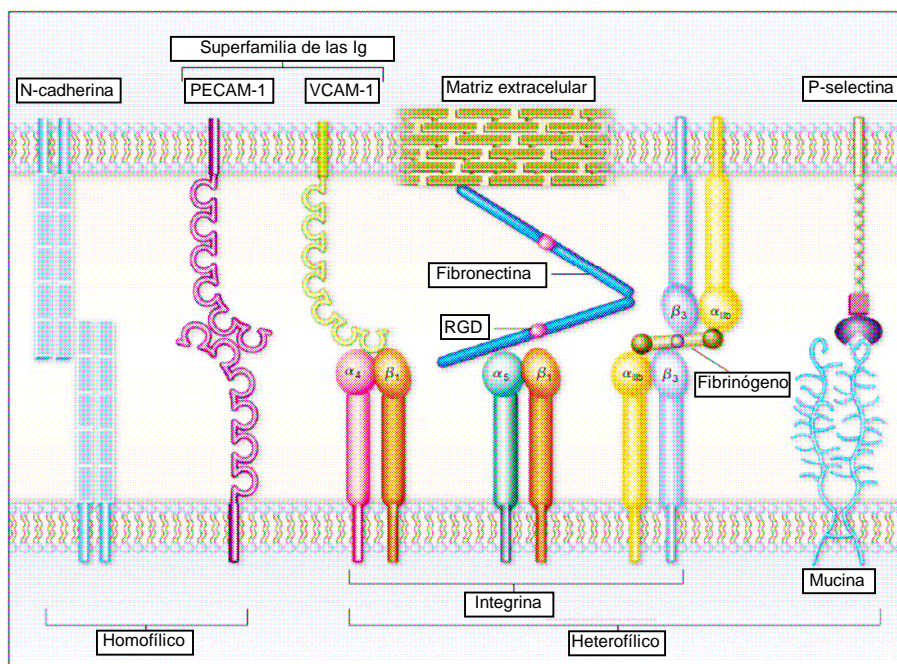


Figura 4. Tipos de uniones y familias de receptores celulares. Adaptada de Frenette et al (ref. 33)

Las integrinas no son sólo elementos de anclaje de la célula a la MEC o a otra célula, sino que también proporcionan a la célula señales implicadas en procesos tales como proliferación o supervivencia celular (34).

3.2.1. Estructura de las integrinas.

Las integrinas constan de dos subunidades, una alfa y una beta, unidas de forma no covalente formando un heterodímero. Se han identificado 18 subunidades alfa (α) y 8 beta (β) que se combinan hasta formar 24 integrinas completas, ya que no todas las combinaciones α/β son posibles. Se agrupan por familias dependiendo de la cadena β que posean. Así, la familia de las integrinas β_1 tiene como cadena β común la proteína β_1 , también llamada CD29. La subunidad CD29 forma heterodímeros con 12 subunidades α distintas, siendo esta cadena α la que determina la especificidad de la integrina por los distintos ligandos (35).

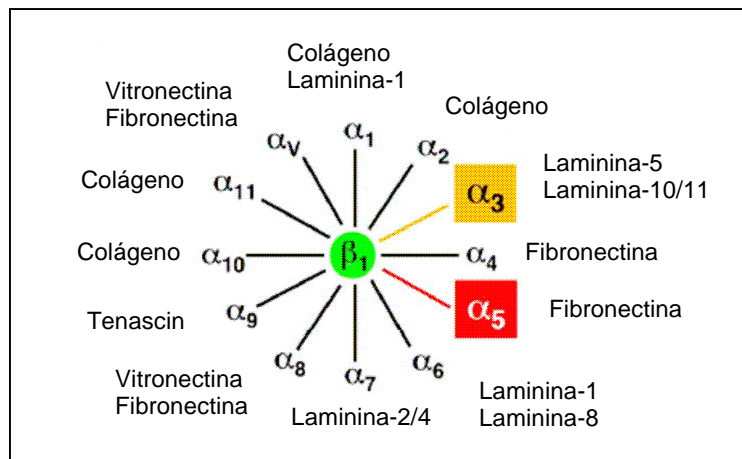


Figura 5. Afinidad a proteínas de la MEC de las integrinas con cadena común β_1 (CD29) según su asociación con distintas cadenas α . Adaptada de Gu et al (ref. 36).

La mayor parte de la proteína se encuentra expuesta en el medio extracelular, con una porción transmembrana y un pequeño dominio citoplásmico, que por sí mismo es incapaz de transmitir señales intracelulares, pero al que se acopla toda la maquinaria de transmisión de señales que traspasan esa información al interior celular.

Se han obtenido imágenes de la integrina $\alpha V\beta 3$ que definen los dominios de cada subunidad, donde se observa que la estructura tanto de la subunidad α como de la β es muy similar (37). Cada subunidad cuenta con una porción extracelular formada por múltiples dominios donde se localizan los sitios de unión de los ligandos y de cofactores, como los cationes divalentes; esta región es donde se produce el mayor contacto entre las dos subunidades (38). En la región globular más distal de la cadena β es donde se encuentra el lugar de unión al ligando (*I-like domain*, por la similitud con el *I-domain* de la subunidad α y el dominio MIDAS (*metal-ion-dependent adhesive site*), al cual se unen los cationes divalentes para aumentar la afinidad de la integrina por el ligando. A continuación se encuentran distintos dominios que están implicados en el movimiento de la integrina para su activación (*PSI-domain* y *EGF-like repeats*) y algunos dominios adicionales para la unión de cationes divalentes (magnesio y calcio). Seguidamente se encuentra la zona transmembrana, que está implicada en la dimerización de la integrina (39). Por último, la porción citoplásmica está formada por unos 40-70 aa en casi todas las integrinas (excepto en la $\beta 4$), y es el dominio al que se unen las proteínas puente que asocian la integrina con el citoesqueleto.

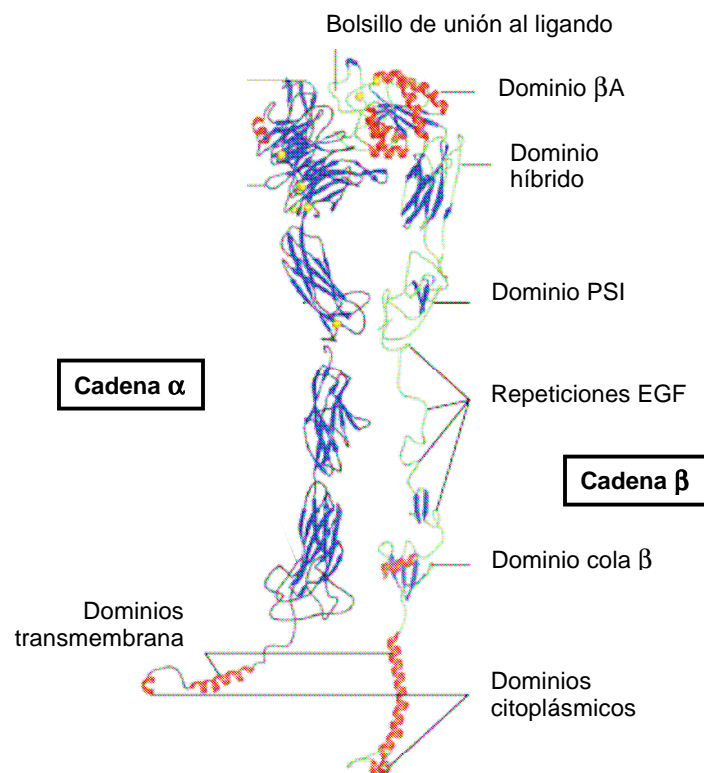


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la integrina $\alpha V\beta 3$. Adaptada de Humphries et al (ref. 37).

Estudios posteriores han constatado que la estructura tridimensional de la integrina CD49d/CD29 ($\alpha4\beta1$) es similar a la obtenida en los primeros modelos de $\alphaV\beta3$. Además, en integrinas con la cadena común CD29 se han detectado 4 tipos distintos de porciones citoplásmicas procedentes de *splicings* alternativos: $\beta1A$, $\beta1B$, $\beta1C$ y $\beta1D$ (40). Cada una ellas parece expresarse en diferentes tejidos (41,42).

3.2.2. Mecanismo de la adhesión mediada por integrinas.

El mecanismo de adhesión se establece mediante la formación de complejos de adhesión celulares que incluyen a las propias integrinas y a una gran variedad de proteínas citoplásmicas tales como talina, vinculina, paxilina and alfa-actinina (43). Estas proteínas actúan regulando kinasas como FAK (*Focal adhesion kinase*) y miembros de la familia de Src, que fosforilan sustratos como CAS y reclutan proteínas adaptadoras como Crk (44). Estos complejos de adhesión se unen al citoesqueleto de filamentos de actina. Así, las integrinas sirven para conectar dos sistemas separados por la membrana plasmática: el medio extracelular y el citoesqueleto de actina.

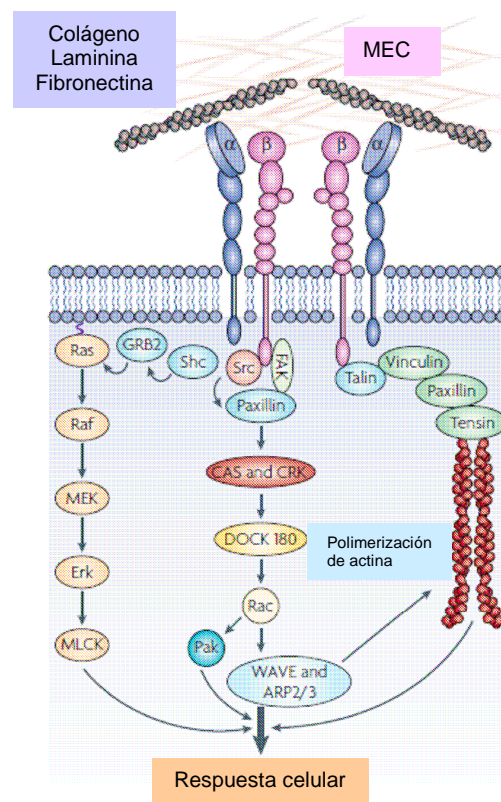


Figura 7. Cascada de señalización intracelular originada a partir de contactos célula-matriz mediados por integrinas. Adaptada de Avraamides et al (ref. 45).

La mayoría de las integrinas se encuentran en un estado de baja afinidad por sus ligandos, por lo que necesitan ser activadas para ejercer su función. Hasta el momento, se aceptan dos modelos que explican los diferentes grados de activación que puede presentar una integrina (46):

a) modelo *inside-to-outside* (abreviadamente *inside-out*): la señal de activación de la integrina proviene de señales que se han generado en el interior de la célula. Estas señales activadoras promueven la unión de la talina a la porción citoplásmica de la subunidad β , promoviendo su separación de la cola citoplásmica de la subunidad α y propiciando un cambio conformacional en los dominios extracelulares, resultando en un aumento en la disponibilidad del lugar de unión al ligando. De esta forma se aumenta la afinidad de la integrina por sus ligandos (47).

b) modelo *outside-to-inside* (abreviadamente *outside-in*): modelo en el que la señal que activa la integrina procede del medio extracelular. Este modelo indica que tras la unión a los ligandos contenidos en el microambiente, las integrinas multimerizan y reclutan moléculas de señalización y complejos del citoesqueleto, que desencadenarán cascadas de señalización que culminarán en el control de la adhesión (48).

Por lo tanto, la afinidad de las integrinas por sus ligandos varía y depende principalmente del estado conformacional del heterodímero y de la densidad y localización de las integrinas en la membrana. Los cambios en la distribución de integrinas en la membrana celular parecen estar causados por modificaciones del citoesqueleto como consecuencia de las señales intracelulares generadas durante la activación celular.

Uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la interacción con el ligando es dependiente de la presencia de iones metálicos. De hecho, las integrinas poseen motivos EF-HAND y MIDAS que pueden modular positiva o negativamente la adhesión a los ligandos. Por ejemplo, la presencia en el medio de manganeso aumenta la afinidad del receptor por su ligando (49). Por el contrario, otro catión divalente como el calcio estabiliza conformaciones de baja afinidad (50). En ambos casos, parece establecerse una estructura ternaria estable entre el ligando y el sitio de coordinación de la integrina con el metal (utilizando los denominados residuos de coordinación) (51). En el caso del manganeso, posiblemente el ion altera la conformación de la integrina para así generar un sitio accesible para la unión del ligando. Está ampliamente descrita la

relación entre afinidad por el sustrato y actividad de la integrina, de manera que a mayor afinidad por el ligando, mayor activación de la integrina (52).

Otro mecanismo de regulación de la capacidad de adhesión de la integrina a sus ligandos viene dada por los fenómenos de *clustering* o agrupamiento de receptores, aumentando la avidéz por el ligando (53). Este proceso conduce a una adhesión celular eficiente en ausencia de receptores con alta afinidad por el ligando. Los ligandos multivalentes o la asociación de receptores con el citoesqueleto pueden limitar la difusión de las moléculas por la membrana incrementando de esta manera la fuerza adhesiva de la interacción. La asociación lateral de integrinas en *clusters* en la membrana plasmática aumenta la avidéz de unión al ligando al proporcionar múltiples sitios de contacto. Se ha encontrado que la integrina CD49d/CD29 está asociada a *rafts* lipídicos, que son muy resistentes a la acción de los detergentes (*DRM: detergent-resistant domains*) (54).

Hay distintas hipótesis sobre el mecanismo que conduce a la activación de las integrinas. La teoría más sencilla es la que considera que la integrina tiene una conformación inactiva cuando no está unida al ligando, y que mediante un giro conformacional propiciado por cationes divalentes dejaría accesible el sitio de unión al ligando, transformándose en una conformación activa (55). Otras teorías afirman que existen tres conformaciones de la integrina: inactiva o cerrada, activa o abierta y de unión a ligando. Según esta teoría, la activación de la integrina se dividiría en dos fases: además del cambio conformacional para la activación de la integrina, se produciría otro cambios conformacional adicional para permitir la unión del ligando (56). Estudios de cristalización de proteínas apoyan esta última teoría, aunque son necesarios más estudios para su validación.

3.2.3. Unión de VLA-4 (CD49d) a sus ligandos.

Los dos ligandos principales de la integrina CD49d (también denominada VLA-4 o cadena $\alpha 4$) son la proteína de la MEC fibronectina y la molécula de adhesión CD106, una proteína expresada en la membrana de diferentes poblaciones celulares de MO (57,58).

La unión de CD49d a la fibronectina se establece entre el motivo RGD de la cadena CD49d y el dominio CS1 de la fibronectina, en la región HepII de esta proteína (59). Para que se produzca esta unión, se necesita de la activación previa de la integrina (60).

CD106 es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Además, se ha identificado en cultivos de células endoteliales una variante de CD106 soluble (61). Aunque la capacidad de unión de esta forma soluble a CD49d no está aún bien determinada (62), se ha visto que el dominio de CD49d que interacciona con la proteína CD106 transmembrana es diferente al que establece la unión con la fibronectina de la MEC (63). Sin duda, este es uno de los motivos por los que la activación de CD49d con diferentes estímulos (anticuerpos monoclonales -AcMo- activantes anti-CD49d o cationes divalentes) afectan de forma distinta la unión a fibronectina o a CD106 (64).

3.2.4. Modificaciones post-traduccionales de las integrinas.

Se ha descrito en numerosas ocasiones que las células expresan variaciones en su estado de glicosilación cuando experimentan cambios fenotípicos significativos (65). De hecho, estas variaciones son muy comunes en procesos tales como la activación linfocitaria o la maduración de los timocitos. Estas transiciones promueven cambios a largo plazo en la adhesividad de las células y en su motilidad y, por ello, los cambios en glicosilación son funcionalmente importantes (66).

La enzima implicada en la N-glicosilación es la ST6Gal I que cataliza la sialilación α 2-6 característica de las integrinas β 1 (67). Está descrito que la glicosilación de las integrinas es necesaria tanto para una adhesión eficiente como para la dimerización de la integrina (68). La N-glicosilación influye en la conformación de la proteína ya que restringe la fluctuación dinámica en la membrana, de forma que una glicosilación alterada puede afectar a la conformación de la integrina.

Estudios llevados a cabo demuestran que la hiposialilación de la cadena CD29 conduce a un aumento en la capacidad de unión a fibronectina. Por el contrario, un

aumento en su sialilación disminuye la adhesividad y un aumento en el potencial metastático (69).

Una manipulación directa de la glicosilación de CD29 claramente altera la conformación de la integrina y la afinidad por su ligando. Por ejemplo, un aumento en la glicosilación β 1-6 de CD29 se asocia a una reducción en el *clustering* de la integrina CD49e/CD29 (α 5 β 1) (70). De forma similar, la activación de CD49d/CD29 y la consecuente unión a CD106 puede bloquearse completamente si se sobreexpresa de forma constitutiva ST6Gal I, ya que esto previene la síntesis de una forma hiposialilada de CD29. Cabe suponer que una glicosilación alterada afecta a las interacciones entre los oligosacáridos del *I-like domain* y cambian la accesibilidad del bolsillo de unión al ligando. Además, una alteración en la glicosilación causa cambios conformacionales significativos en la mayoría de las regiones claves para la unión del ligando, como son los residuos críticos para su unión y el dominio MIDAS (71). Por lo tanto, la sialilación α 2-6 es un mecanismo común para la regulación de las integrinas con CD29 como cadena común, modulando la accesibilidad del bolsillo de unión del ligando, y causa movimientos de las hélices 1 y 7 importantes en la activación de la integrina.

3.2.5. Alteraciones en la expresión de las integrinas y su relación con la capacidad metastásica de tumores.

Una de las funciones más importantes de las integrinas es su papel en la migración celular.

Diversos trabajos experimentales han demostrado que la alteración en la expresión de las integrinas se asocia a procesos tumorales. En particular, la integrina α V β 3 ha sido identificada como marcador de progresión tumoral en el melanoma (72). Un aumento en su expresión se correlaciona con una conversión en el crecimiento del melanoma de radial a vertical o metastásico. También, la expresión de CD29 en melanomas primarios parece una condición necesaria para que las células tumorales colonicen los nódulos linfoides cercanos a la zona del tumor (73).

Alteraciones en la glicosilación de las integrinas CD29 son comunes en células tumorales y se asocian a un aumento en la invasividad y en la capacidad de metástasis, de modo que un perfil de glicosilación alterado en la superficie de las células está generalmente aceptado como un huella de transformación maligna (74). De esta forma, un perfil de glicosilación aberrante está asociado con ciertos comportamientos anómalos en las células tumorales, incluyendo adhesividad alterada a ligandos de la MEC, aumento en la motilidad e invasividad y anclaje independiente de crecimiento (75).

4. GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Bajo el termino gammapatía monoclonal se agrupa un conjunto de trastornos caracterizados por una proliferación clonal de CP que, en la mayoría de los casos, son capaces de secretar una Ig monoclonal (componente M o paraproteína) detectable en suero y/o en orina.

4.1. Clasificación.

La definición de los distintos tipos de gammapatías monoclonales procede del *International Myeloma Working Group* (IMWG) (76). Aunque el mieloma múltiple (MM) es considerada la neoplasia prototípica en este grupo de enfermedades, la gammapatía monoclonal de significado incierto (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*- MGUS) es la más frecuente de todas (77). Según este grupo de expertos, los pacientes con MGUS se caracterizan por una cantidad de componente M sérico de 10 g/L y menos de un 10% de CP en el aspirado de médula ósea según la citología. Por el contrario, la Ig monoclonal en los pacientes con MM supera los 30 g/L, el porcentaje de CP es superior al 10% de la celularidad total medular y las manifestaciones clínicas son muy frecuentes (anemia, hipercalcemia, lesiones osteolíticas, insuficiencia renal).

La clasificación se detalla en la tabla siguiente (tabla I).

Tabla I: Clasificación de las discrasias de células plasmáticas.	
I. Gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS)	
A. Benigno	
B. Asociada a neoplasmas en ausencia de proteína monoclonal	
C. Gammapatías biclonales y triclonales	
D. Proteinuria idiopática de Bence Jones	
II. Gammapatías monoclonales malignas	
A. Mieloma múltiple (MM)	
1. Mieloma Múltiple asintomático	
2. Mieloma Múltiple quiescente	
3. Leucemia de células plasmáticas (LCP)	
4. Mieloma no secretor	
5. Mieloma Múltiple IgD	
6. Síndrome de POEMS	
7. Plasmocitoma solitario	
8. Plasmocitoma extramedular	
B. Desórdenes linfoproliferativos malignos	
1. Macroglobulinemia de Wäldestrom	
2. Linfoma	
3. Leucemia linfocítica crónica	
III. Enfermedad de cadenas pesadas	
A. γ HCD	
B. α HCD	
C. μ HCD	
IV. Crioglobulinemia	
V. Amiloidosis primaria	

Tabla I. Tipos de gammapatías monoclonales y otras neoplasias de CP. Adaptada de Kyle et al (ref. 78)

Aunque no incluido en la clasificación, el linfoma de efusión primaria (*Primary Effusion Lymphoma*- PEL) comparte numerosas características con las discrasias de CP. El PEL es un tipo de linfoma de cavidades caracterizado por el crecimiento en fase líquida de las células tumorales, un tipo de crecimiento que conduce a efusiones recurrentes en las cavidades abdominal, peritoneal o pericárdica en ausencia de tumor sólido (79). La característica que lo diferencia de otros tipos de linfomas de cavidades es la infección por el herpesvirus tipo 8 (HHV-8) (80,81). Generalmente presenta

coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de Epstein-Barr (82), aunque recientemente se han descrito varios casos de pacientes varones VIH negativos que desarrollan este tipo de linfomas (83,84). Las similitudes del PEL con el MM comienzan con su perfil antigénico: la población tumoral de los PEL se caracteriza por expresar marcadores celulares típicos de células plasmáticas: CD138+, CD38+/+++, CD45+/-, CD19- e Ig intracitoplásmica con restricción clonal (85). Pese a este perfil antigénico, la adscripción de dicha población a la categoría de CP es controvertida, en especial debido a sus características morfológicas (células anaplásicas con núcleos grandes y citoplasma basófilo) que describe un tipo celular no completamente diferenciado. Este es el motivo por el cual estas células linfomatosas son consideradas como precursoras de CP o células pre-plasmáticas (86,87). No obstante, algunos estudios que comparan el perfil antigénico de las CP tumorales de las gammapatías monoclonales con el de las células del PEL, demuestran que son dos tipos celulares con más semejanzas que diferencias (88). Aunque el origen de la población tumoral residente en la cavidad es desconocido, se ha descrito recientemente que las células tumorales de los PEL proceden de los centros germinales o post-germinales de los ganglios (89). Otros autores sugieren que el origen de estas células podría estar en los centros pre-germinales (90).

Aunque se ha documentado recientemente que las células tumorales del PEL muestran una expresión disminuida de genes relacionados con la adhesión celular (91) y una sobreexpresión de los genes implicados en invasividad que ayudarían a explicar la movilidad de estas células y su alojamiento en cavidades corporales, apenas hay datos de la expresión y afinidad de diferentes moléculas de adhesión claves para entender el peculiar comportamiento biológico mostrado por este tipo de tumor. Igualmente, apenas ha sido explorada la capacidad proliferativa y la susceptibilidad o resistencia a la apoptosis en estas células (dos funciones celulares interrelacionadas entre sí y con la capacidad adhesiva).

Como ya se ha citado, el PEL se asocia a la infección con HHV-8, otra similitud con el MM, pues recientemente se ha descrito la asociación entre el MM y la infección por HHV-8 : mediante técnicas de PCR se ha demostrado la infección por este virus en células dendríticas de pacientes con MM, e incluso existen estudios relacionando una posible asociación entre dicha infección y la progresión de la enfermedad (92). Además,

está documentado que el HHV-8 codifica una proteína viral homologa a la IL-6 humana, corroborándose en estudios *in vitro* el crecimiento dependiente de esta IL-6 viral de una línea celular de MM humana (IND-6).

Dadas las evidentes semejanzas exhibidas entre las células malignas del PEL y las CP tumorales en pacientes con MM, el linfoma de efusión primaria podría aprovecharse como modelo de estudio de las características invasivas de las CP.

4.2. Etiopatogenia.

No se conocen con certeza las causas asociadas al origen y el desarrollo de las gammopatías monoclonales. Sin embargo, el hecho de que su incidencia aumente claramente con la edad y que entre el 25% y el 50% de los trasplantados de riñón o de MO, respectivamente, desarrollen una gammopatía monoclonal transitoria, apoyan la hipótesis de que sean consecuencia de un trastorno en la regulación del sistema inmune asociado a la edad.

Aunque es controvertido el origen de la célula precursora del clon maligno en el MM, los hallazgos experimentales que sugerían fuertemente que la célula precursora se originaba en la propia MO y que mostraba características fenotípicas compatibles con células en diferentes estadios de diferenciación (incluyendo precursores inmaduros CD19+CD10+ y células B *naive*) (93) no cuentan hoy con gran predicamento. Por el contrario, el hecho de que los genes de la Ig clonal en pacientes con MM muestren hipermutación somática y hayan realizado el cambio del gen de la cadena pesada de la Ig responsable del cambio de isotipo en esta cadena, conceden un gran peso a la hipótesis que considera que una célula B transformada en el centro germinal es el probable precursor del clon maligno (94).

Por otro lado, estudios recientes postulan que el MM se origina como consecuencia de una acumulación de mutaciones puntuales espaciadas en el tiempo (95). Los estudios de citogenética molecular han demostrado que casi todos los MM presentan alteraciones genéticas, y que muestran una marcada inestabilidad cariotípica (96). El desarrollo de metodologías tales como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la hibridación genómica comparada y más recientemente la tecnología de

microarrays, han ayudado a desvelar el significado de algunas de estas alteraciones (97). Así, el 40% de los MM presentan traslocaciones que afectan al gen de la cadena pesada de la Ig (cromosoma 14) y a uno de estos 4 loci: ciclina D1 t(11;14), c-maf t(4;14) y MMSET/EGFR3 t(14;16) (98).

Las translocaciones primarias suceden de forma temprana durante la patogénesis del tumor, mientras que las traslocaciones secundarias ocurren como consecuencia de la acumulación de mutaciones durante la progresión de la enfermedad. Son consideradas traslocaciones primarias las que se derivan de la traslocación del gen de la cadena pesada de la Ig, siendo traslocaciones secundarias las alteraciones en c-myc, delección del cromosoma 13, activación de ras y mutación en p53 por pérdida del cromosoma 17, entre otras (99).

Aunque casi todas las aberraciones genéticas identificadas en el MM se encuentran presentes en el MGUS, se requieren cambios neoplásicos adicionales para convertir el clon tumoral estable del MGUS en una expansión tumoral progresiva con características malignas como el MM.

4.3. Gammapatía monoclonal de significado incierto o MGUS.

La gammapatía monoclonal de significado incierto o MGUS es un proceso pretumoral que progresa, en un número limitado de casos, hasta MM. Con diferencia, representa la gammapatía monoclonal más frecuente: afecta a cerca del 3% de la población mayor de 50 años y su prevalencia se incrementa con la edad (superior al 8% a los 80 años), siendo más frecuente entre varones que en mujeres (100).

Es un proceso caracterizado por un componente monoclonal <3gr/dL, un porcentaje de CP en el estudio citológico <10% y ausencia de lesiones osteolíticas, anemia o fallo renal. Desde un punto de vista biológico, una característica destacable es la coexistencia de CP normales y clonales en la MO de cada paciente. En la práctica totalidad de los casos, el perfil antigénico de ambas poblaciones está claramente diferenciado (101). El porcentaje de CP totales se encuentra sólo discretamente aumentado con respecto a los valores de normalidad e incluso, en algunos casos, no difiere significativamente del porcentaje detectado en MO normales. Dada la ausencia

de manifestaciones clínicas relevantes, estos pacientes no requieren de ningún tratamiento, si bien están establecidas pautas consensuadas para vigilar su posible progresión a MM (102).

Aproximadamente el 50% de los pacientes con MGUS muestran translocaciones primarias en el gen de la cadena pesada de la Ig que afectan y desregulan otros genes, tales como la ciclina D1, ciclina D3 o c-maf. La patogénesis de este proceso en el 40-50% de casos restantes sin translocación del gen IgH no es bien conocida. A su vez, la delección del cromosoma 13, un factor pronóstico importante en el MM, afecta al 50% de los pacientes con MGUS, siendo ésta una característica que, obviamente, no diferencia genéticamente ambos procesos (103). De hecho, todos los estudios realizados hasta la fecha confirman la existencia de las mismas translocaciones génicas en las CP clonales de los pacientes con MGUS o MM (104), por lo que, hasta el momento, no es posible identificar una “huella” genética que permita distinguir ambas patologías mediante estudios cariotípicos o de *microarrays* (105).

Aunque el inicio de un proceso angiogénico parece predecir la transición desde MGUS hasta MM (106), los factores que llevan a la progresión MGUS/MM son en gran medida desconocidos. En este sentido y dado que solo un 1% de los pacientes con MGUS progresan cada año a MM (107), una enfermedad considerada aún como incurable en la casi totalidad de los casos, sería de gran interés encontrar un marcador que pudiera anticipar con cierta fiabilidad dicha progresión para, eventualmente, tomar medidas que la pudieran retrasar o incluso evitar.

4.4. El mieloma múltiple.

El MM es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación en la MO de CP clonales capaces de producir, en la gran mayoría de los casos, una Ig monoclonal detectable en el suero y, en algunas ocasiones, en orina. El MM puede aparecer de novo o evolucionar desde un MGUS.

En cuanto a datos de epidemiología, el MM representa el 1% de todas las neoplasias y aproximadamente el 10% de las hemopatías malignas. La edad media de presentación de la enfermedad es de 65 años, siendo muy poco común en menores de 45

años. Es más común en varones que en mujeres y en afroamericanos con respecto a caucásicos. La media de supervivencia es de 30 meses, oscilando desde pocos meses a 6 años, dependiendo de los factores de riesgo del paciente y la tolerancia a la quimioterapia.

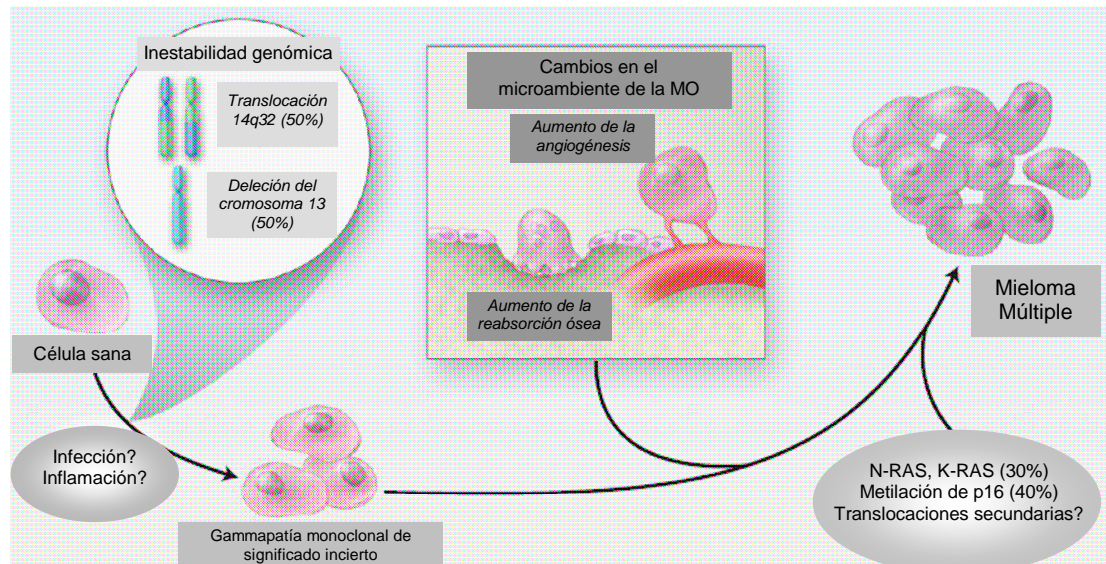


Figura 8. Mecanismos de progresión de la enfermedad en gammopatías monoclonales. Adaptada de Kyle et al (ref. 108).

4.4.1. Clínica.

La manifestación clínica inicial más frecuente es el dolor óseo (70% de los casos) (109). El 80-90% de los pacientes muestran alteraciones radiológicas compatibles con osteoporosis, lesiones osteolíticas o fracturas patológicas. Cerca de un tercio de los pacientes presentan una cifra de hemoglobina inferior a 9 g/dL. Las infecciones suelen ser frecuentes, en especial las urinarias y pulmonares. La insuficiencia renal afecta al 20% de los pacientes, generalmente ocasionada por la hipercalcemia o por el depósito de cilindros de cadenas ligeras de Ig en los túbulos renales, siendo uno de los factores de riesgo con mayor porcentaje de mortalidad (110). Mientras que la hepatomegalia no es infrecuente (25% de los casos), la esplenomegalia solo afecta a un 5% de los casos.

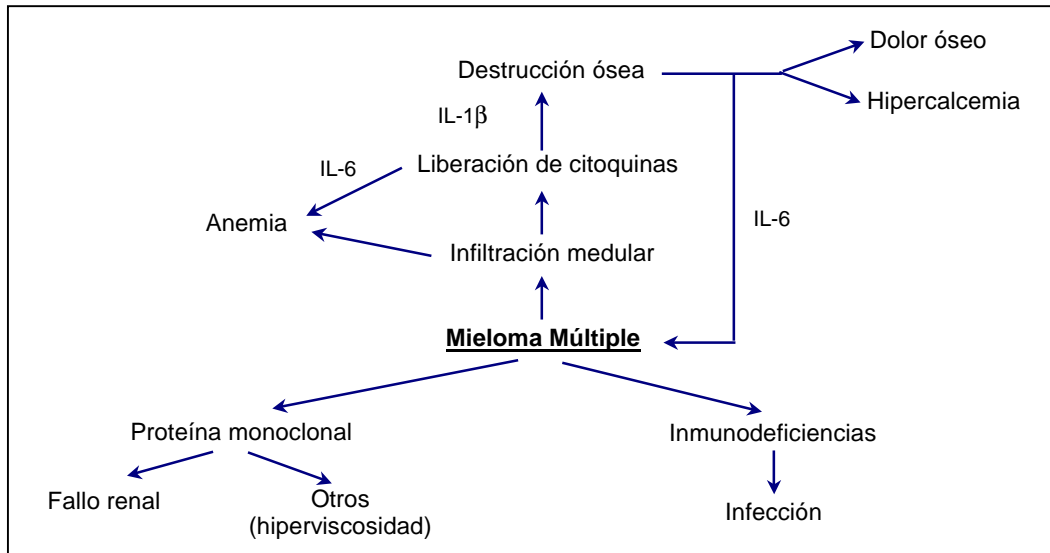


Figura 9. Principales hallazgos clínicos y de laboratorio en el mieloma múltiple.

4.4.2. Diagnóstico.

Los pacientes con MM presentan un proteinograma electroforético en el que se detecta una banda homogénea en el 85% de los casos (excepto en los casos de MM no secretor, MM IgD+ y mieloma de cadenas ligeras), y en casi la mitad de los casos se detecta proteinuria de cadenas ligeras. La naturaleza monoclonal de la Ig ha de ser confirmada mediante inmunofijación, técnica que a su vez identifica la clase de Ig producida por el clon tumoral: IgG (45-60% de los casos), IgA (20-30%), cadenas ligeras (Bence Jones) (15%), no secretor (3%) e IgD (2%). Los MM secretores de IgM o IgE son excepcionalmente poco frecuentes (111).

Aunque la detección en suero de una Ig monoclonal, junto con alguno o varios de los síntomas asociados a la enfermedad, sugiere fuertemente el diagnóstico de MM, este ha de establecerse en muestras de aspirado medular y/o cilindro óseo obtenidos habitualmente de cresta ilíaca o de esternón. El diagnóstico citológico se realiza en extensiones del aspirado sobre portas teñidos con hematoxilina-eosina y se establece como MM cuando el porcentaje de CP supera el 10% de la celularidad medular, habitualmente con la detección de plasmoblastos y/o diferentes tipos de atipias en la morfología de estas células (112). En las décadas de los 80-90 del pasado siglo, el estudio citológico se vio complementado por el diagnóstico inmunofenotípico mediante citometría de flujo (CTF). La CTF es capaz de detectar la población tumoral de CP tras

constatar la expresión anómala de uno o varios antígenos en dicha población con respecto a la población de CP normales de MO. Entre los antígenos que de forma habitual diferencian a las CP tumorales de las policlonales, destacan los citados a continuación: CD56 (113), CD28 (114), CD19 (115), CD27 (116), CD117 (117) y CD45 (118). Además, la CTF es capaz de determinar con gran precisión la clonalidad de estas células mediante el estudio de la cadena ligera de la Ig (*kappa o lambda*) contenida en el citoplasma de las CP (119). Incluso en casos de pacientes con MGUS en que el estudio citológico es incapaz de determinar la naturaleza maligna de estas células, la CTF es capaz de determinar la clonalidad de las células tumorales y el carácter policlonal de las CP normales con las que coexisten.

Contrariamente a lo que sucede con otros tumores que se originan o metastatizan en MO, en los el porcentaje de células tumorales detectado por técnicas microscópicas o citométricas es muy similar, en pacientes con MM el porcentaje de células tumorales observado por una u otra técnica suele diferir de forma muy significativa (120). Un estudio reciente considera que esta discrepancia es debida, el menos en parte, a la fuerte asociación de las CP a las espículas óseas. Estas espículas se perderían durante la preparación de la muestra para el estudio por CTF (121). Este hallazgo no descarta otras explicaciones en las que, muy probablemente, las capacidades adhesivas de las CP puedan jugar un papel relevante. Así, y tomando en cuenta únicamente parámetros inmunofenotípicos, se considera que el porcentaje de CP en una MO normal oscila entre 0.1 y 0.8% de la celularidad total medular (122). En plasmocitosis reactivas este porcentaje suele ser superior al 1,5%. En el MM, el porcentaje de CP en MO suele ser mayor del 3%. En el caso del MGUS puede detectarse un porcentaje de CP totales dentro del rango de la normalidad o solo discretamente aumentado, pero en el que al menos el 3% de las CP detectadas son policlonales. El diagnóstico de leucemia de células plasmáticas (LCP) se establece cuando el porcentaje de CP circulantes sobrepasa el 10% de las células nucleadas de SP.

4.4.3. Estadía

Existen dos modelos de clasificación de MM basados en el grado de severidad alcanzado por la enfermedad (123).

La primera se estableció en el año 1975 por Durie y Salmon (124), que catalogaron los distintos estadios del MM en función de parámetros como la concentración de la paraproteína, cantidad de hemoglobina y afectación ósea y renal (Tabla IIa). A raíz de la aparición de los tratamientos modernos, se ha establecido una nueva clasificación (*International Staging System* o ISS) que toma en cuenta parámetros tales como la edad, la deleción del cromosoma 13 y los niveles de diversas proteínas como la β 2-microglobulina y la proteína C reactiva, entre otros (Tabla IIb) (125).

Tabla. IIa: Sistema de estadiaje de Durie y Salmon (ref. 124)	
Estadio I (masa tumoral baja)	<i>Si cumple todos los siguientes criterios:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina <10g/dL • Calcio en suero normal o > 10.5 mg/dL • Serie ósea normal (escala 0) o plasmocitoma solitario único • Bajo componente M: IgG> 5g/dL; IgA> 3g/dL • Cadenas ligeras en orina > 4g/24h
Estadio II (masa tumoral intermedia)	<i>No cumple los criterios del estadio I ni del estadio III</i>
Estadio III (masa tumoral elevada)	<i>Si cumple uno o más de los siguientes criterios:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobina <8.5g/dL • Calcio en suero normal o >12mg/dL • Lesiones óseas líticas avanzadas (escala 3) • Elevado componente M: IgG>7g/dL; IgA>5g/dL • Proteinuria de Vence Jones>12g/24h
Subclasificación (A o B)	A: Función renal normal (creatinina en suero<2mg/dL) B: Función renal alterada (creatinina en suero>2mg/dL)

Tabla. IIb: Sistema de estadiaje internacional (ISS) (ref. 125)	
Estadio I	β 2-microglobulina<3.5 Albumina>>3.5
Estadio II	β 2-microglobulina<3.5 y Albumina>>3.5 o β 2-microglobulina 3.5-5.5
Estadio III	β 2-microglobulina<5.5

Tablas IIa y IIb. Distintos sistemas de estadiaje del MM, según Durie y Samon o el ISS.

Un tercer tipo de clasificación divide al MM en varios subgrupos atendiendo al tipo de alteraciones genéticas presentes y su relación con su comportamiento clínico. Esta clasificación necesita todavía de una amplia validación.

4.4.4. Tipos de mieloma múltiple.

En el MM sintomático, tanto la ocupación y el daño que infligen las CP clonales al microambiente medular, incluido el componente óseo, como la secreción de grandes cantidades de Ig monoclonal, son las principales causas responsables de la patofisiología de esta enfermedad: anemia, lesiones osteolíticas, hipercalcemia o insuficiencia renal. Sin embargo, esta enfermedad muestra en ocasiones un comportamiento biológico distinto. Así, el MM no secretor, que supone el 3% de los MM diagnosticados de novo, se caracteriza por la incapacidad de las CP clonales para secretar Ig al medio, con la consiguiente ausencia de este componente tanto en el suero como en diferentes órganos (126).

El MM asintomático o quiescente representa el 15-30% de todos los MM y cumple los criterios diagnósticos de un MM, pero no presenta síntomas como los citados con anterioridad (lesiones osteolíticas, anemia, etc). No precisan tratamiento y presentan un riesgo de progresión a MM sintomático del 10% por año (127).

El plasmocitoma se caracteriza por la expansión de una población de CP neoplásicas que forman una masa localizada en un área limitada de diferentes tipos de tejidos. Atendiendo a la localización, el plasmocitoma se clasifica en dos tipos: plasmocitoma óseo solitario, situado principalmente en vértebras lumbares, sacras o cervicales, y plasmocitoma extramedular, que crece en tejidos blandos y se localiza en la gran mayoría de los casos en cabeza y cuello. En ambos casos, las CP clonales no superan el 5% de las células nucleadas totales (según criterios citológicos o histológicos). Además, no se detectan lesiones osteolíticas, insuficiencia renal o hipercalcemia. Asimismo, en la gran mayoría de los casos, los niveles séricos de la Ig monoclonal son bajos o incluso indetectables, aunque en raras ocasiones se han descrito en el suero cantidades elevadas del componente M.

Por último, la enfermedad de cadenas pesadas se caracteriza por presentar un componente monoclonal constituido exclusivamente por un fragmento de la cadena pesada de Ig sin cadena ligera acompañante (128). Suele tener una afectación digestiva, causando diarreas y otros problemas intestinales, una manifestación infrecuente en el resto de gammapatías monoclonales.

4.4.5. Tratamiento.

A pesar de los avances en el conocimiento de la patogenia del MM y de la aplicación de fármacos que interfieren en mecanismos moleculares implicados en la proliferación y supervivencia de las CP tumorales, el MM sigue considerándose una neoplasia incurable. De ahí que todos los esfuerzos destinados a comprender la génesis y el desarrollo de esta enfermedad puedan redundar en el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos que consigan cambiar la historia natural del MM.

Desde la introducción de la quimioterapia tradicional, el tratamiento del MM permaneció inalterado durante décadas. Sin embargo, en estos últimos años nuevos descubrimientos en los procesos biológicos y moleculares han conducido al desarrollo de nuevas terapias, ocasionando un aumento en la vida media de estos pacientes así como una mejora en su calidad de vida. Estos nuevos tratamientos combinan agentes alquilantes (melfalán y ciclofosfamida), corticoides (prednisona o dexametasona) u otros compuestos como la vincristina o la doxorubicina con fármacos desarrollados a partir de los nuevos conocimientos de la biología celular de las CP: la talidomida y sus derivados y el bortezomib (129).

Actualmente se siguen desarrollando fármacos basados en la biología molecular y celular del MM: inhibidores de chaperonas, de histonas deacetilasas y de receptores de membrana, entre otros (130). Como tratamiento intensificador y en aquellos casos en que sea posible, se utiliza quimioterapia a dosis elevadas seguida de rescate con progenitores hematopoyéticos. Con el trasplante autólogo a partir de precursores obtenidos de SP se consiguen tasas de respuesta de hasta un 80% (131), si bien la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global no parece ser superior a la del tratamiento convencional (132).

4.4.6. Detección de células plasmáticas circulantes.

El MM se caracteriza por la retención de las células tumorales en MO, por lo que la colonización de otros órganos no es frecuente (133). En este aspecto fundamental, el MM difiere de los procesos linfoproliferativos B y de una buena parte de los linfomas no Hodgkin B (LNH-B), en los que la presencia masiva, o al menos

fácilmente cuantificable, de células tumorales circulantes es la regla y no la excepción. Sólo la LCP, una forma poco frecuente y muy agresiva de gammapatía monoclonal consecuencia de la progresión de un MM preexistente, se caracteriza por la presencia masiva de CP en SP (134). En los últimos años, sin embargo, se ha demostrado que en el 60-70% de pacientes con MM (135), y en menor medida en pacientes con MGUS (136), puede detectarse por CTF una población circulante de CP clonales. El porcentaje de esta población con respecto a los leucocitos totales de SP es muy bajo, lo que justifica que haya pasado desapercibida durante años en técnicas tales como la cuantificación de poblaciones por microscopía.

4.4.7. Fisiopatología del mieloma múltiple.

Como se ha descrito anteriormente, el microambiente medular juega un papel de enorme relevancia en el mantenimiento y diferenciación de los diferentes linajes celulares de la estirpe hematopoyética. En muchos tipos de neoplasias, incluyendo los tumores sólidos, las interacciones entre las células malignas y el microambiente en el que habitan adquieren una gran trascendencia en la biología de estos procesos (137). En este sentido y dado el evidente osteotropismo que las CP manifiestan en el MM, esta enfermedad se considera como un modelo prototípico de estas interacciones. En este contexto, es evidente que el microambiente medular se comporta como un elemento protector para las células tumorales de estos pacientes. Los elementos del entorno que influyen en la fisiopatología del MM son tanto las células del estroma medular como las proteínas de la MEC y los factores solubles liberados por aquellas. Sus efectos sobre la proliferación, apoptosis y resistencia a fármacos se resumen a continuación.

4.4.7.1. Interacciones de las células de MM con células del microambiente.

Las células del estroma (células mesenquimales cuya morfología es equivalente a la de los fibroblastos) son una población accesoria fundamental para las células mielomatosas. Es concebible, y así lo demuestran numerosos datos experimentales, que las células de MM utilicen similares moléculas para adherirse o respondan a los mismos factores solubles de las células estromales que los descritos para otros tipos celulares y, en especial, para sus contrapartidas celulares normales. Sin embargo, las diferencias en el efecto son manifiestas: las células hematopoyéticas normales responden progresando

en su proceso de diferenciación, mientras que las células estromales, por el contrario, mantienen, o incluso aumentan, el potencial maligno de las CP tumorales (138). Un ejemplo evidente son los factores secretados por este tipo celular: la IL-6 producida por el estroma conduce a una mayor secreción de Ig por parte de las CP normales de MO, y por lo tanto está relacionado con un proceso de diferenciación celular (139). Por el contrario, la IL-6 promueve la proliferación y la resistencia a drogas en el caso de las células de MM (140).

La MO, además de ser el soporte físico donde se asientan las CP, se considera también una fuente de factores solubles imprescindible para la supervivencia y proliferación de las CP tanto normales como tumorales. Así como la MO proporciona apoyo a la hematopoyesis normal, en el MM las células del estroma medular también proporcionan soporte a las células tumorales tanto en términos de proliferación como de supervivencia o de resistencia a drogas. Mientras los progenitores hematopoyéticos normales residentes en la MO utilizan su adhesión a las células del estroma y las citoquinas producidas por ellas para diferenciarse en células maduras, las células de MM monopolizan los mismos estímulos, no con el propósito de promover la diferenciación celular, sino para aumentar o al menos mantener su proliferación y para inducir resistencia a las señales inductoras de apoptosis. Así, la adhesión de las CP a las células del estroma utilizando moléculas de adhesión tales como CD49d o CD54 (ICAM-1), aumentan la proliferación y viabilidad de las células de MM, pues es la propia adhesión celular la que pone en marcha rutas de señalización intracelular en células de MM y el aumento en la secreción tanto paracrina (por parte de las células del estroma) como autocrina (por parte de las células de MM) de citoquinas y factores de crecimiento en el microambiente medular (141). Está documentado que la sobreexpresión de CD54 y otras citoquinas está relacionada con mal pronóstico de numerosas enfermedades (142), demostrando que una desregulación en la síntesis de algunas moléculas de adhesión en una célula tumoral está relacionada con una más rápida progresión en los pacientes estudiados.

4.4.7.2. Contribución de las redes de citoquinas, otros factores solubles y sus receptores en el mantenimiento de la célula mielomatososa.

IL-6 es una citoquina esencial que promueve la diferenciación de los LB activados hasta el estadio de CP. Esta acción es complementada por otras citoquinas como la IL-2 o la IL-10 (143). Además, la IL-6 estimula la activación de las vías de señalización de PI3K/Akt, MAPK y Jak/Stat3, siendo el factor de supervivencia y crecimiento más importante para las células de MM (144). La IL-6 tiene un efecto tanto paracrino como autocrino sobre las células de MM, ya que estas células son capaces de producir y responder a este factor tanto *in vivo* como *in vitro*. En realidad, la mayor cantidad de IL-6 detectada en el microambiente medular en pacientes de MM es debido a la mayor producción de la misma por las células del estroma medular, ya que la secreción por parte de estas células aumenta tras el contacto con las células tumorales (145). Por lo tanto, el contacto directo entre las células del estroma y las células mielomatosas es indispensable para el aumento en la secreción de IL-6. Tal contacto, como se ha descrito, se establece mediante la unión de la integrina CD49d/CD29 expresada en las CP tumorales a la proteína CD106 expresada en las células fibroblastoides y las células endoteliales. Dicha unión aumenta la secreción de IL-6 por parte de las células del estroma, induciendo proliferación y bloqueando la apoptosis en las CP tumorales.

Asimismo, existen algunos estudios que asocian la detección de elevadas cantidades de IL-6 en suero con un alto índice proliferativo de las células tumorales y una rápida progresión de la enfermedad (146). En estadios muy avanzados de la enfermedad, las CP tumorales se vuelven independientes de la mayoría de los factores externos para proliferar, necesitando exclusivamente la señalización por IL-6 para la proliferación y el crecimiento.

Al mismo tiempo, IL-6 protege de la muerte por apoptosis en el tratamiento con dexametasona y drogas clásicas, aumentando la síntesis de moléculas antiapoptóticas como Bcl-xL y c-Myc (147). No obstante, los últimos estudios indican que las nuevas terapias parecen superar este tipo de resistencias. Además, es un potente estimulador de osteoclastogénesis, conectando la expansión de la población de células de MM con la reabsorción ósea.

Otro de los factores más importante en la supervivencia de la CP es el IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*) (148). Es un factor endocrino implicado en el control metabólico, pero también ejerce una función anti-apoptótica en la MO. Además de ser un factor de supervivencia, estimula la proliferación tanto de las células de MM dependientes como independientes de IL-6.

El VEGF (*Vascular Epidermal Growth Factor*) es un regulador de la angiogénesis que estimula la permeabilidad vascular, además de ser un mitógeno específico de las células endoteliales. La secreción de VEGF por parte de las células de MM se encuentra regulada por IGF-1. Además, la expresión de IGF-1R en las células de MM está regulada positivamente por el contacto con el endotelio medular. El VEGF puede actuar como factor autocrino en la migración y proliferación de las células de MM.

Otros factores importantes que juegan un papel en la patogénesis del MM son el TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), implicado en la destrucción ósea característica en el MM; CXCL12 o SDF-1 α (*Stromal Derived Factor*), quimioquina esencial que guía las CP hacia su nicho específico; y la IL-1 β , que estimula la producción de IL-6 en las células tumorales (149).

Estudios realizados examinando diferencias entre el microambiente de la MO en pacientes con MM e individuos sanos muestran alteraciones en la composición de la MEC. Así, en pacientes con MM hay menos deposición de fibronectina y colágeno I, con una organización más simple de las proteínas de la matriz, indicando el papel potencial de la MO en el control de la proliferación local y diferenciación de las células tumorales (150).

Las células estromales son el constituyente celular de la MO responsable de la producción de los elementos que constituyen la matriz y la producción de las citoquinas que promueven y sustentan la hematopoyesis. Este heterogéneo grupo de células incluyen fibroblastos, macrófagos, osteoclastos y adipocitos.

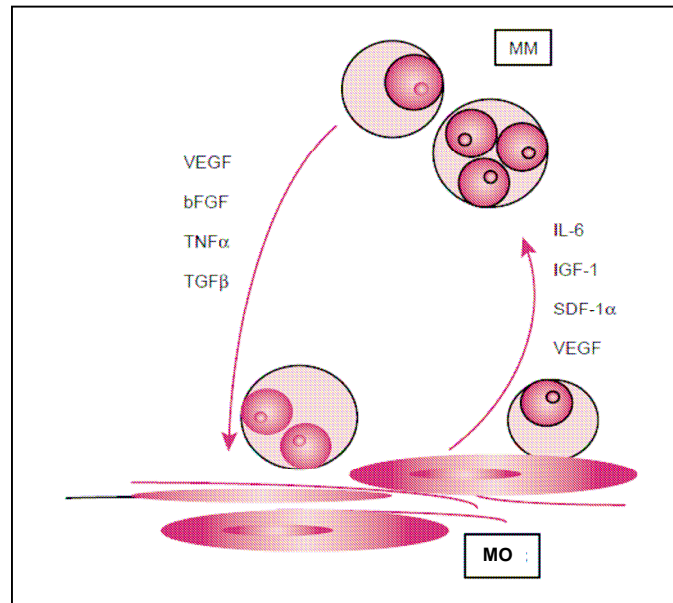


Figura 10. Posible circuito de citoquinas del microambiente medular en el MM. Las citoquinas secretadas tanto por las CP como por las células del estroma estimulan la secreción de citoquinas por ambas partes (adaptada de ref. 149)

En pacientes con MM la población de células adherentes de la MO produce activamente IL-6 *in vitro*, y mantiene el crecimiento de células B clonales provenientes de la SP. Está ampliamente descrito que las CP expresan grandes cantidades de CD49d en su superficie, sugiriendo que CD49d es la integrina principal en la adhesión de las CP al motivo RGD de la fibronectina (151). Estudios con AcMo bloqueantes muestran que al inhibir esta unión hay un impedimento en la interacción CP-estroma medular, y un descenso en la secreción de IL-6 por parte de las células del estroma. *In vitro*, la señalización anti-apoptótica estimulada por adhesión precede a la secreción de citoquinas, pero los efectos de adhesión en último término actúan en concordancia con la señalización generada por las citoquinas.

4.4.7.3. Proliferación de las células plasmáticas malignas.

Al igual que el resto de células maduras de la MO, las CP son células poco proliferantes debido a su parada en la fase G1 del ciclo celular (152).

En el MM, la proliferación de las CP está mediada por diversas citoquinas producidas y secretadas por las células del microambiente medular entre las que

destaca, una vez más, la IL-6 (144). Por otro lado, en la mayoría de los casos la capacidad proliferativa de las CP de MO es baja, como cabía esperar en un proceso tumoral crónico. Algunos estudios, además, relacionan los índices de proliferación y apoptosis con el estadio en el que se encuentra la enfermedad, indicando el valor de dichos índices como factores pronósticos (153).

Se han descrito diferentes metodologías para determinar los índices de proliferación de las CP, entre los cuales destacan los métodos basados en la CTF y métodos más tradicionales, tanto inmunohistoquímicos como citológicos. En concreto, la precisión de los métodos citométricos ha permitido establecer una clara correlación entre un mayor índice proliferativo de las CP y las traslocaciones en el gen de la ciclina D1 (154) o con el nivel de metilación del gen p16 (155).

4.4.7.4. Apoptosis y supervivencia de las células plasmáticas malignas.

Como se ha reseñado, el MM es un tumor en el que las células malignas no se caracterizan por proliferar en exceso, sino por eludir las vías que conducen a la apoptosis y que sí están operativas en sus contrapartidas celulares normales.

La supervivencia de las CP del MM está regulada en parte por factores sintetizados en el microambiente medular. Por un lado, la unión de la célula mielomatososa a fibronectina protege a las células malignas del proceso apoptótico (156). De forma paralela o quizá sinérgica con el efecto antiapoptótico mediado por la unión de la fibronectina a la integrina CD49d/CD29 de la membrana de las CP, diversos factores solubles sintetizados por las células del microambiente medular también ejercen un efecto anti-apoptótico. Entre ellos, IL-6 o IGF-I, que suprimen la expresión de la proteína proapoptótica Bim (157). De la misma forma, se ha demostrado que las células del estroma confieren resistencia a la apoptosis de las células de MM induciendo la expresión en estas células de la proteína anti-apoptótica c-FLIP (158).

La apoptosis celular puede ser ejecutada desde dos vías de señalización diferentes que convergen en la activación de las caspasas citoplásmicas: la vía intrínseca o mitocondrial, que afecta inicialmente a proteínas de la familia del Bcl-2; y la vía extrínseca, mediada por receptores de membrana (159).

La apoptosis inducida por la vía intrínseca está regulada fundamentalmente por miembros de la familia de Bcl-2, siendo esta familia de proteínas pro- y anti-apoptóticas reguladoras del potencial de membrana y también de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Entre los miembros de esta familia de proteínas, la proteína anti-apoptótica Bcl-2 ejerce su función bloqueando la salida del citocromo c, impidiendo de este modo el inicio de las vías de señalización intracelulares que culminan con la activación de las caspasas efectoras. En el MM, la proteína Bcl-2 se encuentra regulada por IL-6, IFN- α e IGF-1 (160), poniendo de manifiesto la estrecha relación entre la supervivencia celular y la propia fisiopatología de la enfermedad. Al mismo tiempo, las vías de señalización mediadas por la unión de las integrinas a la MEC inducen la transcripción de Bcl-2. Al mismo tiempo, Bcl-2 está relacionada con las cascadas de señalización que parten de las uniones de las integrinas con la MEC, induciéndose la transcripción de Bcl-2 en respuesta a las uniones extracelulares, y dominado así el fenómeno de *anoikis*, proceso de muerte celular al que es conducido una célula tras la pérdida de sus interacciones con la MEC (161).

La expresión aumentada de moléculas antiapoptóticas de la familia del Bcl-2 también se correlaciona con la mayor supervivencia de las células mielomatosas (162), previniendo la apoptosis y aumentando las posibilidades de adquirir defectos genéticos adicionales a lo largo del tiempo. Además, las radiaciones ionizantes y muchos quimioterápicos ejercen su actividad anti-apoptótica por esta vía. De hecho, la sobreexpresión de Bcl-2 en las células de MM está asociada a resistencia a distintos fármacos tales como la dexametasona y el paclitaxol (163)

En lo que se refiere a la vía extrínseca, el agente inductor de apoptosis mejor definido es el TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), también llamado Apo2L, que es un miembro de la familia del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) similar al ligando de Fas. La sensibilidad al efecto pro-apoptótico de TRAIL depende de que las células de MM expresen en su membrana suficiente cantidad de los receptores que unen TRAIL (receptores DR4 y DR5), y/o de una suficiente cantidad de la caspasa 8 citosólica (164). Esta es probablemente la causa de que la susceptibilidad *in vitro* a TRAIL sea muy variable en distintos pacientes. El bortezomib, un inhibidor del proteosoma que se utiliza con resultados prometedores en un porcentaje de pacientes con MM resistentes a otros fármacos, parece que ejerce su acción, al menos en parte,

restaurando la inducción de la apoptosis al aumentar los niveles de expresión de los receptores DR4 y DR5 en las células malignas, eliminando el efecto protector del estroma medular (165). Dado el efecto que TRAIL puede tener en la apoptosis de las células de MM, es interesante recalcar que algunos estudios han demostrado que TRAIL puede ser inducido por IFN- α , mediando la apoptosis por la vía de Stat1 (166).

En algunos tipos celulares, otra vía de apoptosis importante es la mediada por el receptor de membrana Fas (CD95). Al igual que DR4 o DR5, Fas es un miembro de la familia del TNF, que induce apoptosis por la vía extrínseca y que está implicada en la recuperación de la homeostasis del sistema inmune (167). De una manera similar a TRAIL, el ligando de Fas, denominado Fas-L (o CD95L), dispara el proceso apoptótico tras unirse a su receptor. Sin embargo, la contribución de la vía Fas/FasL en el caso de las células de MM es muy controvertida. De hecho, aunque la mayoría de líneas celulares de MM expresan niveles significativos de Fas, hecho que se correlacionaba con un aumento en la tasa de apoptosis espontánea en cultivo de estas células (168), en la mayoría de ellas no se conseguía inducir apoptosis añadiendo al medio anticuerpos inductores como el clon CH11 (169). Esta resistencia a la inducción de apoptosis parece relacionarse con la existencia de mutaciones en Fas que conducen a la pérdida de función del receptor o, en ocasiones, a una expresión reducida del mismo en la superficie celular (170). En cualquier caso, apenas hay datos en la literatura con respecto a la expresión de Fas en células CP malignas primarias, tanto de MM como de MGUS, ni tampoco de su funcionalidad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I: HIPÓTESIS

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que, *in vivo*, las CP de MO de individuos sanos y de la mayoría de los pacientes con gammapatías monoclonales expresan la forma activa de la integrina CD29, contrariamente a lo que sucede con otras poblaciones celulares de MO, que expresan CD29 en su estado inactivo. Por otro lado, en diferentes modelos celulares se han descrito varios factores solubles que regulan el paso de la forma inactiva hasta la forma activa de la integrina.

Atendiendo a estos antecedentes, nuestra hipótesis es que la expresión de la forma activa de CD29 en las CP normales y tumorales de MO es dependiente de factores contenidos en el plasma medular, y que bien cambios en los niveles de dichos factores o cambios en la estructura de la proteína justificarían la pérdida parcial o total de la expresión de la forma activa en una minoría de pacientes con gammapatías monoclonales o con otros procesos, permitiendo así la presencia de CP en territorios distintos a la MO.

II: OBJETIVOS

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se trazaron los siguientes objetivos:

1. Determinar los niveles de expresión *in vivo* de la forma constitutiva y activada de la integrina CD29 en CP de MO y SP, tanto de individuos sanos como de pacientes con distintos tipos de gammopatías monoclonales: MGUS, MM o LCP.
2. Estudio de la expresión de otras moléculas de adhesión: CD44, cadena $\alpha 4$ acompañante de CD29 (CD49d), cadena $\beta 7$ (integrina $\beta 7$).
3. Identificación de los factores reguladores contenidos en el plasma medular que regulan la expresión de la forma activa de CD29 en las CP normales y tumorales de MO.
4. Determinar la correlación entre la refractariedad al efecto activante de estos factores y la progresión de la enfermedad.
5. Estudio de la posible conexión entre los niveles de expresión de la forma activa de la integrina CD29 y la salida de las CP malignas desde la MO a la SP, así como con su capacidad proliferativa.
6. Analizar la contribución de la función adhesiva de las CP en la expansión policlonal de estas células en las plasmocitosis reactivas.
7. Caracterización y estudio de las células malignas que componen los PEL como un posible modelo de déficit total de adhesión a sustrato.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes y tipos de muestras.

Para el estudio de las poblaciones de CP, tanto normales como tumorales, se analizaron muestras de MO y/o de SP de pacientes con diferentes tipos de gammapatías monoclonales: MGUS, MM tanto al diagnóstico como tras tratamiento con quimioterapia y/o trasplante alogénico y/o autólogo, y LCP. También se utilizaron muestras de MO de individuos sanos (donantes para trasplante alogénico) o de pacientes con discretas citopenias que no mostraron alteraciones significativas ni en el estudio citológico, ni en el histológico, ni en el inmunofenotípico. Por último, se analizaron muestras de MO de pacientes con plasmocitosis reactivas, habitualmente pacientes con patologías autoinmunes o infectados con VIH, caracterizados por una discreta o moderada expansión de CP policlonales en MO.

Las muestras de MO fueron obtenidas con fines diagnósticos mediante punción de la cresta ilíaca o el esternón, y fueron recogidos en tubos estériles de 5 ml con heparina de litio como agente anticoagulante. Las células del aspirado se disgregaron mediante aspiraciones y expulsiones sucesivas con jeringa de 1 ml y aguja de diámetro inferior a 0,5 μm . Las muestras de SP se extrajeron en tubos de idénticas características a las referidas para los aspirados de MO. Todas las muestras fueron procesadas entre 2 y 18 horas después de su extracción.

En el caso de los pacientes con PEL, se analizaron muestras de líquido ascítico o pleural.

Se estudiaron las muestras de MO y SP de 20 controles sanos, 89 pacientes con MGUS, 93 pacientes con MM, 4 pacientes con LCP y 15 pacientes con plasmocitosis reactivas. En el caso de pacientes con PEL, se estudiaron 2 pacientes, en un caso una muestra de líquido ascítico y en otro caso una muestra de líquido pleural. El diagnóstico de cada una de estas patologías se estableció con el estudio inmunofenotípico de cada muestra, y los resultados se contrastaron con los hallazgos citológicos del Servicio de Hematología del Hospital Ramón y Cajal.

2. Anticuerpos monoclonales y policlonales.

Los AcMo utilizados en el estudio de las CP en la mayoría de los pacientes fueron los siguientes: anti-CD27, anti-CD28, anti-CD29 (clones MAR4, HUTS21 y 9EG7), anti-CD38, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD49d (clon 9F10), anti-CD95 y anti- β 7 fueron obtenidos de BD Biosciences (San José, CA). El AcMo anti-Bcl-2 y los anticuerpos policlonales anti-Kappa y anti-Lambda se obtuvieron de Dakopatts A/S (Glostrup, Denmark).

Tabla III. Descripción de los AcMo utilizados en la detección de CD29, CD49d y β7.				
Especificidad	Clon	Fluorocromo conjugado	Procedencia	Descripción
CD29 (integrina β 1)	MAR4	PE	BD Biosciences,	Reconoce la forma constitutiva de la integrina CD29
	P5D2	PE	Abcam	Reconoce la forma constitutiva de la integrina CD29
	K20	FITC	Beckman Coulter	Reconoce la forma constitutiva de la integrina CD29
	JB1A	PE	Millipore	Reconoce la forma constitutiva de la integrina CD29
	4B4	PE y no conjugado	Beckman Coulter	Reconoce la forma constitutiva de la integrina CD29 Ac. bloqueante
	HUTS21	PE	BD Biosciences	Reconoce un epítipo expuesto tras la activación de CD29
	9EG7	No conjugado	BD Biosciences	Reconoce un epítipo expuesto tras la activación de CD29
CD49d (VLA-4)	9F10	PE	BD Biosciences	Reconoce CD49d
	HP2/1	No conjugado	Beckman Coulter	Ac. bloqueante de la unión de CD49d a sus ligandos.
Integrina β 7	FIB504	PE	BD Biosciences	Reconoce la integrina β 7

Los AcMo anti-CD3, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD29 (clones 4B4 y K20) y anti-CD49d (clon HP2/1) y anti-CD138 se obtuvieron de Beckman-Coulter (Hialeah,

FL). Los AcMo anti-CD29, clones P5D2 y JB1A, fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA) y Millipore (Billerica, MA), respectivamente. Cada uno de estos AcMo estuvieron conjugados con los siguientes fluorocromos: FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCP (complejo de proteína clorofila-peridina), PE-Cy5 (ficoeritrina-cianina 5) y APC (aloficocianina).

Los AcMo utilizados en los ensayos *in vitro* de adhesión (clones HP2/1 y 4B4) fueron AcMo puros (no conjugados). Para la detección de la proteína CD29 por *western-blot* se utilizó un anticuerpo policlonal biotilado (R&D Systems; MN).

3. Citometría de flujo: marcaje de antígenos y protocolo experimental para el estudio del perfil antigénico y la expresión de moléculas de adhesión en las CP.

3.1. Marcaje de antígenos de membrana

Para la detección de los antígenos de membrana expresados por las CP, se dispensaron 30-50 μ L de MO o SP en tubos de 5 mL y a continuación se añadieron cantidades óptimas de los diferentes AcMo conjugados con los fluorocromos antes referidos. Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA), y a continuación se añadieron 3 mL de una solución de lisis comercial (FACS lysing, BD Biosciences) para eliminar los eritrocitos presentes tanto en la MO como en la SP total. Tras la incubación de las muestras con esta solución (10 minutos a TA) las células se centrifugaron dos veces a 1400 revoluciones por minuto (rpm) con 3 mL de suero salino durante 7 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 μ L de suero salino para su posterior análisis por CTF.

La detección de antígenos de superficie en células previamente separadas con gradientes de densidad y/o partículas inmunomagnéticas, se realizó utilizando el mismo protocolo previamente descrito, aunque sin la necesidad de añadir una solución de lisis y con una incubación de los AcMo que se realizó durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras dos lavados con PBS/BSA 1%, las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS y de inmediato analizadas en el CTF.

3.2. Detección de antígenos citoplásmicos.

Para la detección de antígenos citoplásmicos, se utilizó el kit comercial *Fix & Perm* (Caltag), constituido por una solución fijadora y una solución permeabilizadora que permiten el acceso de los AcMo al interior celular. Inicialmente se añadieron los AcMo para detectar los antígenos de superficie. Sin lavar la muestra, se añadieron 100µL de la solución A (fijadora) durante 20 minutos a TA. Pasado ese tiempo, se centrifugó 7 minutos a 1400 rpm con 3mL de suero salino y se añadieron 100µL de la solución B (permeabilizadora) y 10µL de un AcMo capaz de detectar un antígeno expresado en el citoplasma de la célula. Tras incubar durante 20 minutos en oscuridad, las células se lavaron con suero salino dos veces se resuspendieron en 300µL de suero salino previo al análisis por CTF.

3.3. Protocolo experimental

La adquisición de las células se efectuó en los citómetros de flujo FACScan, FACSCalibur o FACSCanto (Becton Dickinson) equipados con los softwares informáticos CellQuest o FACSDiva y capacitados para el análisis exhaustivo de las distintas poblaciones celulares. Las CP se identificaron como células con características intermedias de granularidad o SSC y una elevada expresión del antígeno CD38. En aquellos casos en que coexistieron CP normales y tumorales (enfermos con MGUS o enfermos con MM tratados con quimioterapia), su detección se realizó atendiendo a la expresión diferencial de diferentes antígenos de membrana: la población policlonal expresó en la práctica totalidad de los casos el siguiente perfil antigénico: CD38++CD138+CD19+CD56-. Por el contrario, las CP tumorales expresaron el perfil CD38++CD138+CD19-CD56+ en la mayoría de las ocasiones. En aquellos casos en que el antígeno CD56 no fue expresado por las CP tumorales, la ausencia o baja intensidad del antígeno CD27 y/o la expresión del antígeno CD28 fueron dos de las características que diferenciaron con precisión a esta población de la población no tumoral. Además, y en la práctica totalidad de los casos, una mayor granularidad y una menor intensidad del antígeno CD38 en las CP tumorales con respecto a las CP normales sirvieron para discriminar correctamente ambas poblaciones.

4. Análisis de la forma activa de la integrina CD29.

4.1 Regulación de la forma activa de la integrina por el plasma medular: obtención del plasma y utilización de quelantes.

Para evaluar la regulación fisiológica de la forma activa de la integrina CD29 en CP de muestras de MO se eliminó el plasma medular con el fin de suprimir el posible efecto de los factores solubles contenidos en dicho plasma.

Con este fin, la muestra de MO total se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm con el objeto de separar la fracción celular del plasma. Una vez el plasma fue retirado y guardado a 4°C, la fracción celular de la MO fue resuspendida en PBS frío y centrifugada a 1400 rpm durante 7 minutos (se realizan de 3 a 5 de estos lavados). A continuación, 40µL de las células fueron dispensadas en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano y resuspendidas en: i) PBS, ii) el propio plasma autólogo, iii) en plasma alogénico, iv) en estos mismos plasmas incubados previamente durante 1 hora con los quelantes de cationes divalentes EDTA, EGTA (5 mM). La cantidad de plasma reañadida a las células guardó una proporción idéntica o muy similar a la relación existente en condiciones fisiológicas (40 µL de células lavadas + 40 µL de plasma). Tras 1 hora de incubación a TA, las células se recogieron de los pocillos y se pasaron a tubos de 5 mL, y fueron marcadas con los AcMo CD38-FITC, CD29-PE (clon HUTS21) y CD45-PerCP durante 20 minutos, a 4°C y en oscuridad y, tras dos lavados con PBS, la expresión de la forma activa de la integrina fue determinada por CTF.

4.2 Análisis de la activación de CD29 por cationes divalentes.

Para los ensayos de reactivación de la forma activa de la integrina CD29 con cationes divalentes añadidos exógenamente, las CP de muestras de MO o SP fueron lavadas 5 veces con PBS con el fin de eliminar todo vestigio de plasma medular. A continuación, 40 µL de la fracción celular fueron dispensados en pocillos de placas de 96 de fondo plano y resuspendidas en 40 µL de tampón HEPES conteniendo uno de los siguientes cationes divalentes: Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} utilizados en un amplio rango de concentraciones (desde 0.005 mM hasta 5 mM). La incubación de las células

se realizó durante 1 hora a TA. Como control positivo se utilizaron células incubadas con un plasma alogénico perteneciente a una muestra de MO de un individuo sano, y control negativo se emplearon células incubadas en tampón HEPES sin cationes. Pasado el tiempo de incubación y sin lavados previos, las células procedentes de los pocillos fueron marcadas con los AcMo CD38-FITC, CD29-PE (clon HUTS21) y CD45-PerCP. Tras dos lavados con PBS, la expresión de la forma activa de la integrina CD29 en la membrana de las CP fue determinada por CTF.

4.3. Ensayos de activación de la integrina CD29 por sus ligandos CD106 y fibronectina y por la quimioquina SDF-1 α .

Se realizaron experimentos para estudiar el papel jugado por los ligandos de la integrina CD29 (CD106 y fibronectina -FN-) y por otros factores solubles contenidos en el plasma medular en la regulación de la forma activa de la integrina CD29 en las CP. Una vez que se eliminó todo vestigio de plasma medular como se ha explicado en apartados anteriores del Material y Métodos, las células fueron incubadas con un amplio rango de concentraciones de CD106 soluble recombinante -rsCD106- (0.1 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN), de FN (0.2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma) o de SDF-1 α (0.01 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.4. Neutralización de factores solubles contenidos en el plasma medular.

El plasma medular se incubó en placa de 96 pocillos de fondo plano (50 μL de plasma por pocillo) en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos policlonales o monoclonales anti-CD106, anti-FN o anti-SDF-1 α (todos obtenidos de R&D Systems) o con cantidades equivalentes de un anticuerpo sin ningún tipo de especificidad (control isotípico). La incubación se realizó durante 18 horas a 4°C en un agitador (Platform Shaker STR6K; Stuart Scientific) a 40 rpm. Transcurrido este tiempo, se añadió muestra del aspirado de MO hasta alcanzar un volumen final de 100 μL por pocillo.

5. Purificación de células plasmáticas.

La purificación de las células plasmáticas de las muestras biológicas detalladas anteriormente se realizó en dos pasos. El primer paso consistió en la separación de la fracción de células mononucleares, donde se sitúan las CP, del resto de poblaciones mediante un gradiente de densidad para, a continuación, realizar una selección positiva de las CP mediante partículas inmunomagnéticas (Becton Dickinson).

5.1 Aislamiento de células mononucleares

Las células mononucleares se aislaron mediante un gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis-Shield). En primer lugar, la muestra se diluyó en suero salino (a $\frac{1}{2}$ en el caso de la SP y a $\frac{1}{3}$ en el caso de la MO) y se depositó suavemente sobre la solución del gradiente de densidad. Tras una centrifugación a 1800 rpm durante 30 minutos a TA, las células mononucleares se recogieron en la interfase del gradiente. El recuento del número absoluto de células obtenidas con este método se determinó en una cámara de Neubauer. La viabilidad se calculó mediante una tinción con azul de tripán, siendo superior al 90-95% en todos los casos.

5.2 Separación de células plasmáticas mediante partículas inmunomagnéticas.

Para la separación de las CP del resto de células mononucleares, se utilizaron partículas inmunomagnéticas unidas a un AcMo específico frente al fluorocromo ficoeritrina (Anti- R-Phycoerythrin Magnetic Particles – DM; BD Biosciences).

Las células mononucleares se incubaron en agitación a 4°C y durante 30 minutos con el AcMo anti-CD138-PE, a razón de 10-20µL de AcMo por cada 1×10^6 de CP. Pasado este tiempo, se realizaron 2 lavados a 1400 rpm con el tampón del kit (*BD IMag™ Buffer*, Becton Dickinson) durante 7 minutos. Tras el último lavado se añadió un volumen de partículas magnéticas a razón de 5µL por cada 1×10^6 de CP, y se incubó a 4°C en agitación durante 30 minutos. A continuación, se enrasó el volumen del tubo a 1mL y el tubo contenedor de las células se posicionó en un imán (*Cell Separation Magnet*, Becton Dickinson) durante 15 minutos. Pasado este tiempo y sin que el tubo

fuera separado en ningún momento del imán, se eliminó el sobrenadante sin tocar la pared del tubo más próxima al imán, constituyendo tal volumen la fracción negativa de la selección. Posteriormente, se separó el tubo del imán y se añadió 1mL de tampón con el objeto de arrastrar la totalidad de las partículas inmunomagnéticas hasta el fondo del tubo. El pellet, constituido por las partículas unidas a las células, se resuspendió energicamente y el tubo se volvió a posicionar en el imán, repitiéndose el último paso con el fin de descartar la segunda fracción negativa. Por último, se añadió 1mL de medio completo para arrastrar las partículas unidas a las células presentes en la pared del tubo (fracción positiva). La fracción positiva se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos y se volvió a resuspender en 1mL de medio completo. A continuación se procedió al recuento de células tanto de la fracción positiva como de la fracción negativa.

La pureza de las CP en la fracción positiva fue superior al 90% en todos los casos (superior al 95% si la muestra de MO contenía más de un 10% de CP).

6. Ensayos de adhesión.

La adhesión de CP a FN se realizó mediante el procedimiento descrito por Goodwin y Pauli (171).

En primer lugar, placas de 96 pocillos de fondo plano se incubaron a 4°C durante toda la noche con 2µg / pocillo de FN. Posteriormente, los pocillos fueron bloqueados a TA durante 2 horas con 2% BSA en PBS con el fin de reducir la unión no específica. Las CP purificadas de muestras de MO o SP fueron previamente biotiniladas a TA durante 20 minutos con NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) en un tampón HEPES/NaCl conteniendo 1mM de Mg²⁺ y 1mM de Ca²⁺. Tras dos lavados, las CP fueron resuspendidas en tampón HEPES conteniendo 1 mM de Mn²⁺, y añadidas (10⁵ células / 100 µL) a los pocillos para que sedimentaran durante 10 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, la placa se llevó a un incubador de CO₂ durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron muy lentamente 200µl de un medio de flotación de Percoll (densidad 1.10 g/mL) a cada pocillo y poco después 50µl de fijador (glutaraldehído al 1.4% de concentración final). Las células no unidas se eliminaron tras tres lavados con

PBS. En aquellos casos en que se realizaron ensayos de bloqueo de adhesión, las CP biotiniladas fueron tratadas previamente con los AcMo anti- CD49d (clon HP2/1), anti-CD29 (clon 4B4) o con un AcMo irrelevante IgG de ratón. En la última etapa de este procedimiento, se añadieron secuencialmente primero estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pierce) y OPD (*o-phenylenediamine-dihydrochloride*). La adhesión celular se determinó espectrofotométricamente utilizando un lector de ELISA equipado con un filtro de 492nm.

7. Inmunodetección de la molécula CD29 mediante Western-blot.

Se utilizaron los kits de electroforesis y Western Blot de Hoefer y BioRad.

En primer lugar, las CP purificadas, o células mononucleares de SP o MO, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Tras descartar el sobrenadante, los pellets celulares se congelaron en seco a -70°C, en alícuotas de 1×10^6 células por vial.

Llegado el momento de su utilización, se añadieron a los pellets congelados 25µL de Laemmli 2x y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. A continuación, las muestras se cargaron en geles de 0.75 mm de poliacrilamida (7% gel separador, 4% gel concentrador). Se utilizó un tampón de electroforesis compuesto por Tris base, glicina y SDS, y las muestras se corrieron a 130V durante 130 minutos (voltaje constante). La transferencia se realizó en un tampón de transferencia compuesto por Tris base, glicina, SDS y metanol, durante 60 minutos a 110V (voltaje constante). Tras un lavado con solución de bloqueo -TTBS- (Tris-base con 0.05% Tween 20, 20mM pH 8), las membranas se bloquearon con 2% leche disuelta en TTBS durante 30 minutos, incubadas en agitación y a TA. Tras dos lavados de 10 minutos con TTBS, la detección de la integrina CD29 se realizó con un anticuerpo policlonal de cabra conjugado con biotina, utilizado a una dilución 1/400 en 0.2% leche disuelta en TTBS, incubando durante toda la noche a TA y en agitación. Pasado este tiempo, se lavó la membrana dos veces con TTBS y se incubó con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, utilizado a una dilución 1/1000 con 0.2% leche disuelta en TTBS, durante 1 hora y a TA en agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua destilada. La fosfatasa alcalina conjugada con el anticuerpo secundario se reveló en medio ácido con el kit

BCIP (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) y NBT (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*), en proporción 200µL de BCIP, 200µL de NBT, 2mL de Tris-HCl pH 9.7 y 17.8 mL de H₂O (volumen final: 20mL). El sustrato se incubó con la membrana en agitación durante un tiempo variable, hasta consumir la reacción.

Como control de carga se determinaron los niveles de la proteína gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Esta proteína se detectó utilizando como anticuerpo primario el AcMo de ratón anti-GAPDH, clon 6C5 (Millipore) y un Ac secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina.

8. Determinación del índice de proliferación de las células plasmáticas.

El índice proliferativo de las CP tanto de MO como circulantes, y tanto de pacientes con gammopatías monoclonales, con plasmocitosis reactivas o de individuos sanos, se determinó como células capaces de incorporar bromodeoxiuridina (BrdU) utilizando un kit comercial (BrdU Flow kit, BD) según las instrucciones del fabricante aunque con ligeras modificaciones.

Se dispensaron 125 µL de muestra (MO o SP) en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano, a los que se añadió 125 µL de MC y 15µL de la solución de trabajo de BrdU a cada pocillo (concentración final de BrdU: 55 µM), excepto al control. Las células se incubaron durante 18 horas a 37°C. Pasado este tiempo, las células se pasaron a tubos de 5 mL y se incubaron durante 30 minutos a TA con diferentes combinaciones de AcMo capaces de identificar las CP de las demás poblaciones celulares de MO o SP, además de su naturaleza normal o tumoral: CD56-PE / CD45-PerCP / CD38-APC (o CD138-APC). Tras varios lavados con las soluciones fijadoras y permeabilizadoras indicadas en el kit, las células se incubaron con un AcMo anti-BrdU-FITC y con una concentración óptima de DNAsa, que permite la desnaturalización del DNA para la incorporación del anticuerpo (30 µg de DNAsa por tubo). Tras dos posteriores lavados con los tampones facilitados por el kit, el porcentaje de células BrdU⁺ en la población de CP (y de otras poblaciones medulares o circulantes) se determinó por CTF.

9. Análisis estadístico.

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa estadístico *GraphPad Prism* para Windows (Microsoft, San Diego, CA).

Salvo que se indique de forma específica, los datos se representaron como media \pm error estándar de la media (EEM), considerándose como significativos los valores de p inferiores a 0.05.

Los tests estadísticos utilizados para comparar entre sí los distintos grupos de estudio fueron elegidos según los siguientes criterios:

- datos pareados (dependientes) ajustables a una distribución normal: *test de la t de Student pareada*.
- datos no pareados (independientes) no ajustables a una distribución normal y dos grupos de estudio: *test de la U de Mann-Whitney*.
- datos no pareados no ajustables a una distribución normal y más de dos grupos de estudio: *test de Kruskal-Wallis*.

Los datos de los ensayos dosis-respuesta se ajustaron a dos tipos de curvas (hipérbolas y sigmoides), siendo en todos los casos el valor del coeficiente de correlación (R^2) mayor de 0.90. La comparación de dos curvas se realizó mediante el *test de Fisher*.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PLASMÁTICAS DE MÉDULA ÓSEA.

La detección de las CP de MO por CTF se realizó atendiendo tanto a su perfil antigénico como a su granularidad (SSC) y tamaño (FSC). Tal como se ha descrito en la literatura (76), en la mayoría de los casos las CP se caracterizaron por ser células con una elevada expresión del antígeno CD38 en su membrana (células CD38++) y por poseer una granularidad intermedia (figura 11a). Además, en la práctica totalidad de los casos analizados la población celular CD38++ también expresó la molécula CD138 con intensidad intermedia/alta (figura 11b), un antígeno que al ser en gran medida específico de las CP, facilitó su detección con respecto al resto de poblaciones medulares, así como su adscripción inequívoca al estadio celular de CP.

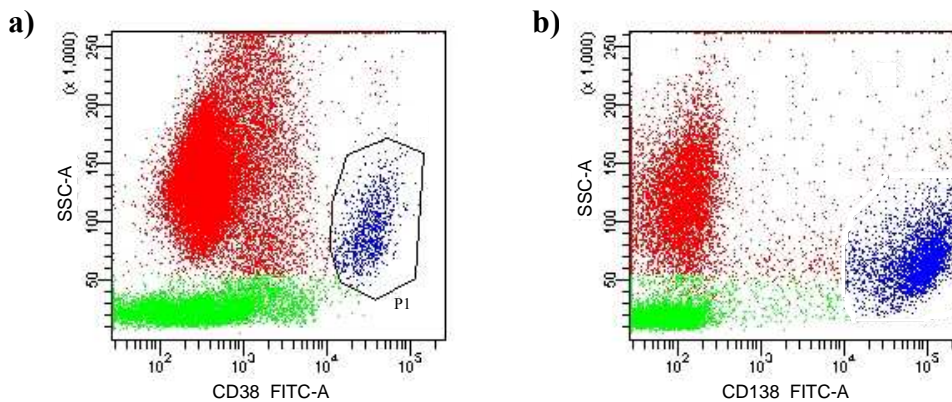


Figura 11. Caracterización por CTF de las CP de MO. Las CP (eventos de color azul, ventana P1) se distinguieron del resto de poblaciones celulares de MO (serie linfóide y eritroide -eventos de color verde- y serie mielóide -eventos de color rojo-) atendiendo a **(a)** su granularidad intermedia y su alta expresión del antígeno CD38 y **(b)** a la expresión específica del antígeno CD138. La ventana para el estudio de la expresión de diferentes antígenos en la membrana de las CP, en especial las moléculas de adhesión, se realizó sobre las células que cumplían estas características. Las imágenes muestran un caso representativo de un paciente con MM con un 26% de CP malignas con respecto a la celularidad medular total.

La detección de CP normales y tumorales en los pacientes con MGUS (y en ocasiones también en pacientes con MM tras tratamiento) se realizó atendiendo a la distinta granularidad de ambas poblaciones y a la expresión diferencial de distintos antígenos tales como CD38, CD19, CD56 o CD28. En la mayoría de los casos, estas características diferenciales pudieron resumirse en: i) una granularidad superior y una

intensidad de CD38 ligeramente inferior de las CP tumorales con respecto al mostrado por las CP normales (figura 12a); ii) pérdida de expresión del antígeno CD19 en la práctica totalidad de las CP clonales, siendo las CP normales positivas en su gran mayoría para este antígeno (figura 12b); iii) en general (en el 75% de los MM en nuestra serie; datos no mostrados) las CP tumorales presentaron una elevada expresión del antígeno CD56 en comparación con la falta de expresión, o la expresión muy débil, de este antígeno en las CP normales (figura 12c); iv) la expresión del antígeno CD28 resultó útil para diferenciar CP tumorales y normales en un pequeño porcentaje de pacientes, expresando este antígeno con intensidad baja/intermedia un 25% de las CP tumorales de los pacientes con gammopatías monoclonales (figura 12d), mientras que nunca se expresó en las CP normales.

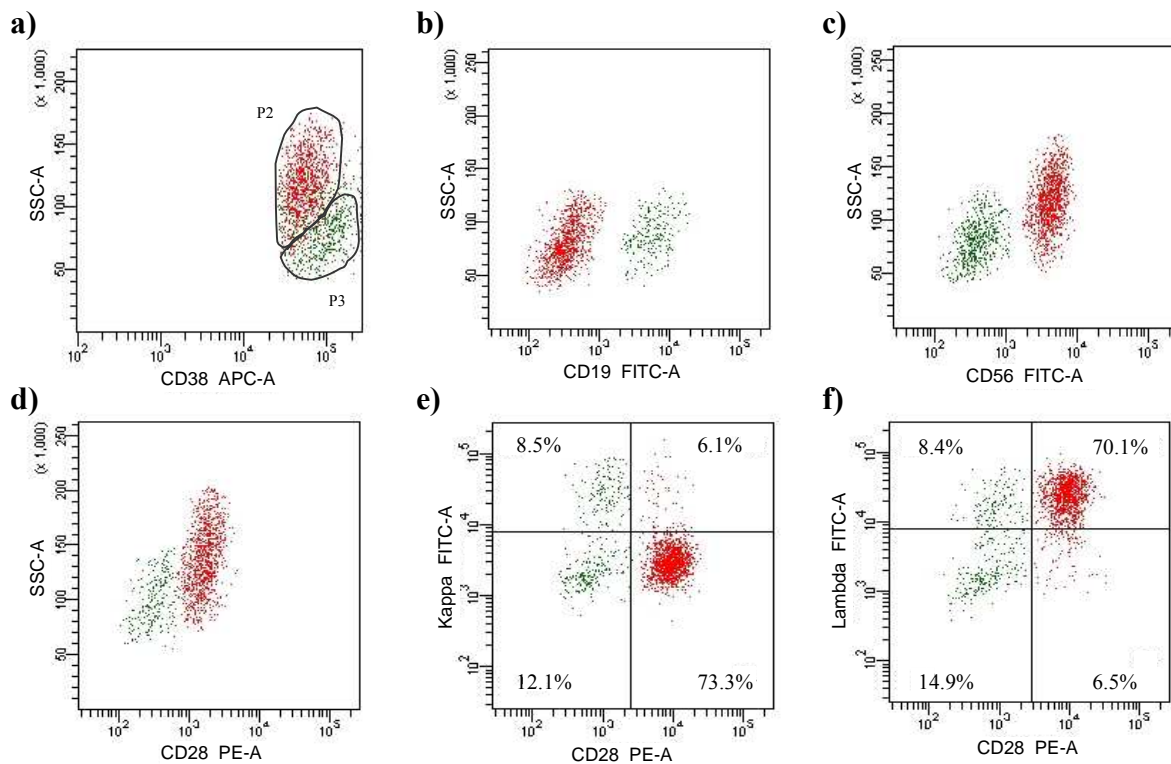


Figura 12. Detección de CP normales y tumorales por CTF. Las CP se detectaron atendiendo a la elevada expresión del antígeno CD38 (células CD38++) y a su granularidad intermedia, de forma idéntica a lo descrito en la figura 11. Las imágenes de los 6 histogramas biparamétricos mostrados en esta figura se encuentran referidas a la ventana de CP P1, también previamente representada en la figura 11. (a) En este ejemplo representativo, fueron las diferencias de granularidad y de expresión del antígeno CD38 las elegidas para distinguir a las CP malignas (eventos de color rojo, P2) de las CP normales (eventos de color verde, P3). Se muestra la expresión diferencial en una y otra población de los antígenos CD19 (b), CD56 (c) y CD28 (d), así como la expresión clonal y policlonal de la cadena ligera de la Ig en las CP tumorales y normales, respectivamente, en un paciente con MGUS (e, f).

La naturaleza tumoral de la población de CP CD28+ (o CD56+) se confirmó al comprobar la expresión clonal de la cadena ligera de la inmunoglobulina citoplásmica. Por el contrario, las CP normales CD28- (o CD56-) expresaron en su citoplasma una proporción de cadena ligera *kappa* y *lambda* compatible con policlonalidad (figuras 12e y 12f).

2. Análisis de la expresión de la forma constitutiva y activada de la integrina CD29 en células plasmáticas de médula ósea. Relación con la expresión de otras moléculas de adhesión: CD44, CD49d e integrina $\beta 7$.

Como es bien sabido, la proteína CD29, la cadena común de todas las integrinas $\beta 1$, se expresa en la práctica totalidad de las células de estirpe hematopoyética, incluyendo a las CP, independientemente de la naturaleza sénil o recirculante de las poblaciones (172).

En un trabajo previo, nuestro grupo ha descrito que las CP de MO, tanto las normales en individuos sanos como las tumorales de la mayoría de los pacientes con gammopatías monoclonales, expresan no sólo la forma constitutiva de la integrina CD29, es decir, aquella forma de CD29 que expresan las células independientemente de la afinidad que esta molécula de adhesión muestre en el reconocimiento de sus ligandos, sino también, y lo que es más importante desde un punto de vista fisiopatológico, su forma de alta afinidad por los ligandos. Esta forma se denomina forma activa (o activada).

En este trabajo se ha estudiado, por un lado, la expresión de la forma activa de la integrina CD29 en un número mayor de pacientes con MM y se ha ampliado el estudio a pacientes con MGUS o con plasmocitosis reactivas, y por otro, se han investigado los factores que regulan la expresión del estado activo de la integrina CD29.

Para la detección de la forma constitutiva de la integrina CD29 se utilizó el AcMo anti-CD29, clon MAR4, que detecta la molécula independientemente del estado

de activación en el que se encuentre (forma total de CD29). La forma de alta afinidad de esta integrina se detectó con el AcMo anti-CD29 HUTS21, clon que reconoce un epítipo expuesto cuando la integrina muestra un estado activado.

En la tabla IV se muestra que las CP de MO de individuos sanos y de pacientes con MM expresaron la forma constitutiva de CD29 en la práctica totalidad de la población ($99.2\% \pm 1.9$ en individuos sanos *versus* $97.7\% \pm 0.6$ en pacientes con MM). En cuanto a la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la integrina CD29 constitutiva (valor que determina la cantidad media del antígeno en una población determinada y que se expresa en unidades arbitrarias -u.a.-), se detectaron diferencias significativas entre las CP tumorales de MM con respecto a las CP normales de individuos sanos.

Tabla IV: Porcentaje de expresión e IMF de la forma constitutiva de la integrina CD29.				
	% CP MAR4+		IMF MAR4 (u.a.)	
CP normales	99.2 ± 0.5	NS	19736 ± 1769	p<0.05
CP tumorales	97.7 ± 0.6		8682 ± 1446	

Tabla IV. Porcentaje de expresión e IMF de la forma constitutiva de la integrina CD29 en CP de MO de individuos sanos y de pacientes con MM. La forma constitutiva de esta integrina se determinó por CTF utilizando el AcMo anti-CD29-PE (clon MAR4). Individuos sanos: n=17; pacientes con MM: n=60. NS: no significativo.

Estos resultados se corroboraron con otros dos AcMo anti-CD29 capaces de reconocer epítipos que revelan el estado constitutivo de la integrina CD29, epítipos diferentes al detectado con el clon MAR4: los clones anti-CD29 P5D2 y K20 (Tabla V). Al igual que en el caso del epítipo MAR4, las IMF de los epítipos P5D2 y K20 mostraron diferencias significativas al comparar CP normales y tumorales (datos no mostrados).

Tabla V: Porcentaje de expresión de los epítomos P5D2 y K20 de la integrina CD29.

	% CP P5D2+		% CP K20+	
CP normales	99.4 ± 0.2	NS	97.4 ± 1.5	NS
CP tumorales	98.8 ± 0.3		99.7 ± 2.8	

Tabla V. Porcentaje de CP que expresan la forma constitutiva de la integrina CD29 en muestras de MO de individuos sanos y en pacientes con MM. Este porcentaje se determinó por CTF utilizando los AcMo anti-CD29-PE, clones P5D2 y K20. Individuos sanos: n=13; pacientes con MM: n=20. NS: no significativo.

En contraposición a lo descrito con la forma constitutiva, el porcentaje de CP que expresaban la forma activa de la integrina CD29, determinada con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21, sí mostró diferencias significativas al comparar CP normales y tumorales. Así, observamos que el 66.5% de la población de CP de MO de individuos sanos expresaban la forma activa de la integrina CD29 (Tabla VI). Por el contrario, aunque con una gran variabilidad, el porcentaje se redujo significativamente en las CP clonales de pacientes con MM (34.4% ± 14.7). Así mismo, la IMF de la forma activa de la integrina CD29 presentó diferencias significativas entre pacientes de MM con respecto a controles sanos.

Tabla VI: Porcentaje de expresión e IMF de la forma activa de CD29.

	% CP HUTS21+		IMF HUTS21 (u.a.)	
CP normales	66.5 ± 5.5	p<0.001	2442 ± 218	p<0.05
CP tumorales	34.4 ± 14.7		1217 ± 194	

Tabla VI. Porcentaje de expresión e IMF de la forma activa de la integrina CD29 en CP de muestras de MO de individuos sanos y en pacientes con MM. Este porcentaje se determinó mediante el AcMo anti-CD29-PE clon HUTS21. Individuos sanos: n=17; pacientes con MM: n=36.

A la vista de las notables diferencias exhibidas por las CP tumorales de pacientes con MM con respecto a las CP de individuos sanos en lo que respecta al porcentaje de células HUTS21+ y a la IMF de la integrina CD29 en su forma constitutiva, analizamos

paralelamente la expresión de ambas formas en cada uno de los pacientes. En cuanto a la forma activa de CD29 y como anticipaba la notable variabilidad de sus valores, observamos que podían distinguirse dos grupos de pacientes: aquellos en los que el porcentaje de células positivas para este epítipo era similar al de los pacientes sanos ($66.5\% \pm 7.8$) y pacientes que mostraban un porcentaje disminuido ($16.3\% \pm 2.2$) (figura 13a). Atendiendo a estos datos de la forma activa de la integrina CD29, dividimos a los pacientes con MM en MM HUTS21⁺ (cuando el porcentaje de CP que expresaban este epítipo era superior al 30%) y en MM HUTS21⁻ (cuando el porcentaje de CP que expresaban este epítipo era inferior al 30%). Cabe destacar que la IMF de los dos grupos fue similar.

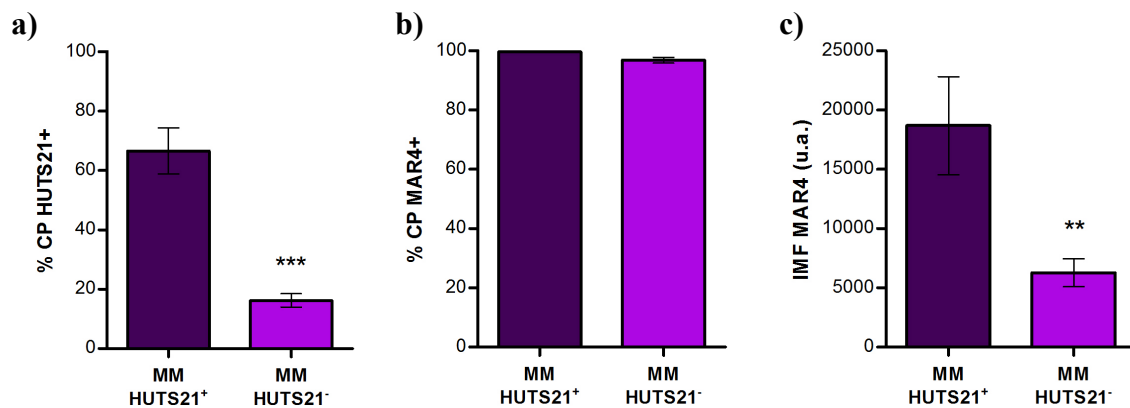


Figura 13. División de los pacientes con MM atendiendo a la alta o baja expresión de la forma activa de la integrina CD29 y su correlación con la expresión de la forma constitutiva. (a) Porcentaje de expresión de la forma activa de la integrina CD29 (epítipo HUTS21), (b) de la integrina CD29 constitutiva (epítipo MAR4) y (c) IMF de la forma constitutiva en los dos grupos de pacientes con MM establecidos según las diferencias de expresión de la forma activa de la integrina CD29. Los datos se representan como media \pm EEM (pacientes HUTS21⁺: n=45; pacientes HUTS21⁻: n=21) (**p<0.01; ***p<0.001).

La división de los pacientes con MM en HUTS21⁺ y HUTS21⁻, establecida según los niveles de expresión de la forma activa de la integrina CD29, permitió establecer a su vez diferencias en la IMF de la forma constitutiva de CD29 en ambos grupos. Tal y como se muestra en la figura 13, mientras que el porcentaje de CP que expresaban la forma constitutiva de la integrina no difirió significativamente en uno y otro grupo ($99.7\% \pm 0.2$ versus $96.8\% \pm 0.9$ en los grupos HUTS21⁺ y HUTS21⁻, respectivamente; p<0.001) (figura 13b), la IMF de la forma constitutiva sí que mostró diferencias manifiestamente significativas (18700 ± 4500 u.a. en pacientes HUTS21⁺

versus 6300 ± 1750 u.a. en pacientes HUTS21⁻; $p < 0.01$) (figura 13c). Estos resultados fueron corroborados cuando se utilizaron otros 4 AcMo capaces de reconocer otros epítomos de la forma constitutiva de CD29 (clones K20, P5D2, 4B4 y JB1A), revelando todos ellos un descenso de la IMF equivalente al mostrado con el clon MAR4 (datos no mostrados).

Contrariamente a lo descrito con CD29, la molécula de adhesión CD44, no perteneciente a la familia de las integrinas $\beta 1$ pero descrita también como una molécula implicada en el anclaje de las CP al microambiente medular (26), no mostró diferencias en su expresión en los pacientes HUTS21⁺ con respecto a los HUTS21⁻ ($89.2\% \pm 5.1$ *versus* $84.7\% \pm 7.5$, respectivamente; IMF 40757 ± 8509 u.a. *versus* 37437 ± 7199 u.a., respectivamente; $n=20$). Dos ejemplos representativos se muestran en la figura 14.

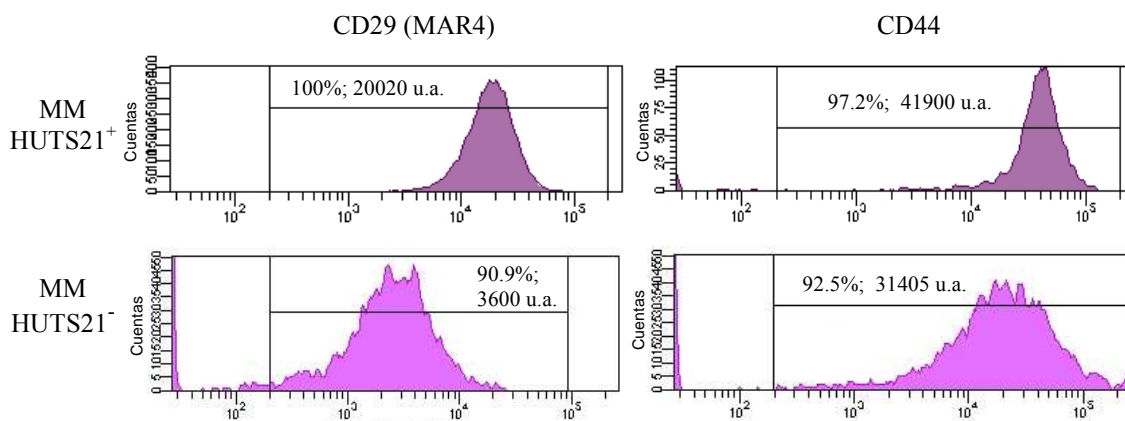


Figura 14. Expresión de la forma constitutiva de CD29 y de la molécula de adhesión CD44 en los pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Se muestran ejemplos representativos de la detección por CTF de la expresión de la forma constitutiva de CD29 y de la molécula de adhesión CD44 en las CP malignas de dos pacientes, pertenecientes al grupo de MM HUTS21⁺ y al grupo de MM HUTS21⁻, respectivamente en cada caso. En el interior de cada histograma se refieren los porcentajes de positividad para cada molécula en cada caso, así como su IMF.

En resumen, estos resultados establecen una estrecha correlación entre un porcentaje manifiestamente disminuido de la forma activa de la integrina CD29 y una menor IMF de su forma constitutiva, o lo que es lo mismo, que las CP tumorales de pacientes con MM HUTS21⁻ no sólo expresan en menor cantidad la forma total de la integrina CD29, sino que además presenta menor activación.

A continuación quisimos determinar si la expresión disminuida de la integrina constitutiva en el grupo de pacientes HUTS21⁻ llevaba aparejada una menor expresión de la cadena α acompañante CD49d (VLA-4) (el resto de cadenas α estudiadas no se expresaron en cantidades significativas en las CP de MO; datos no mostrados). Tal y como se muestra en la figura 15, el porcentaje de expresión de CD49d fue similar en ambos grupos de pacientes con MM (99.9% \pm 0.02 en el grupo de pacientes HUTS21⁺, 98.6% \pm 0.5 en el grupo de pacientes HUTS21⁻). Por el contrario sí se detectaron, con niveles de expresión muy variables, diferencias significativas en lo que respecta a la IMF de la cadena CD49d en ambos grupos de pacientes (23000 \pm 2010 u.a. y 11350 \pm 2100 u.a., en pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻, respectivamente; p<0.001).

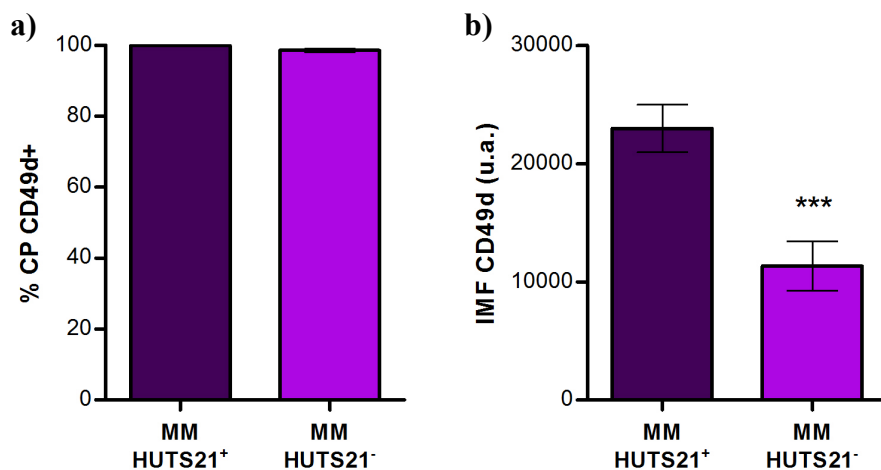


Figura 15. Expresión de la cadena CD49d en las CP de pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Porcentaje de expresión (a) e IMF (b) de CD49d en los pacientes con alta y baja expresión de la forma activa de CD29. Las CP se detectaron por CTF como células CD38⁺⁺ / SSC intermedio. La expresión de CD49d se determinó utilizando el AcMo anti-CD49d-PE, clon 9F10. Pacientes HUTS21⁺: n=20; pacientes HUTS21⁻: n=15 (***p<0.001).

Como es bien sabido, la cadena CD49d no solo puede asociarse a CD29, sino también a la cadena β 7, una proteína especialmente abundante en células situadas en tejidos linfoides asociados a mucosas (22). Por este motivo estudiamos la expresión de la cadena β 7 en CP de MO (normales y tumorales), así como su posible correlación con los niveles de expresión de CD29 y CD49d. El porcentaje de expresión de la cadena β 7 en los pacientes con MM estudiados (sin dividirlos en grupos atendiendo a la expresión de la forma activa o constitutiva de la integrina CD29) fue de 70.4% \pm 5.7 (n=49). Cuando estos casos se dividieron en pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻, el porcentaje de CP que expresaban la cadena β 7 no difirió significativamente (figura 16a). Sin embargo,

sí se detectó una diferencia significativa en la IMF de la cadena $\beta 7$ en estos dos grupos de pacientes: las CP de los pacientes HUTS21⁻ (que expresaban una cantidad disminuida de la forma constitutiva de CD29) expresaron una cantidad variable de la cadena $\beta 7$ en su membrana, que, por término medio, duplicaba o triplicaba la cantidad expresada por las CP de los pacientes HUTS21⁺ (2450 ± 610 u.a. *versus* 5760 ± 1200 u.a. en pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻, respectivamente; $p < 0.05$) (figura 16b). Un ejemplo representativo de la expresión de la cadena $\beta 7$ en el grupo de pacientes con MM HUTS21⁺ y en el grupo de pacientes HUTS21⁻ se muestra en las figuras 16c y 16d.

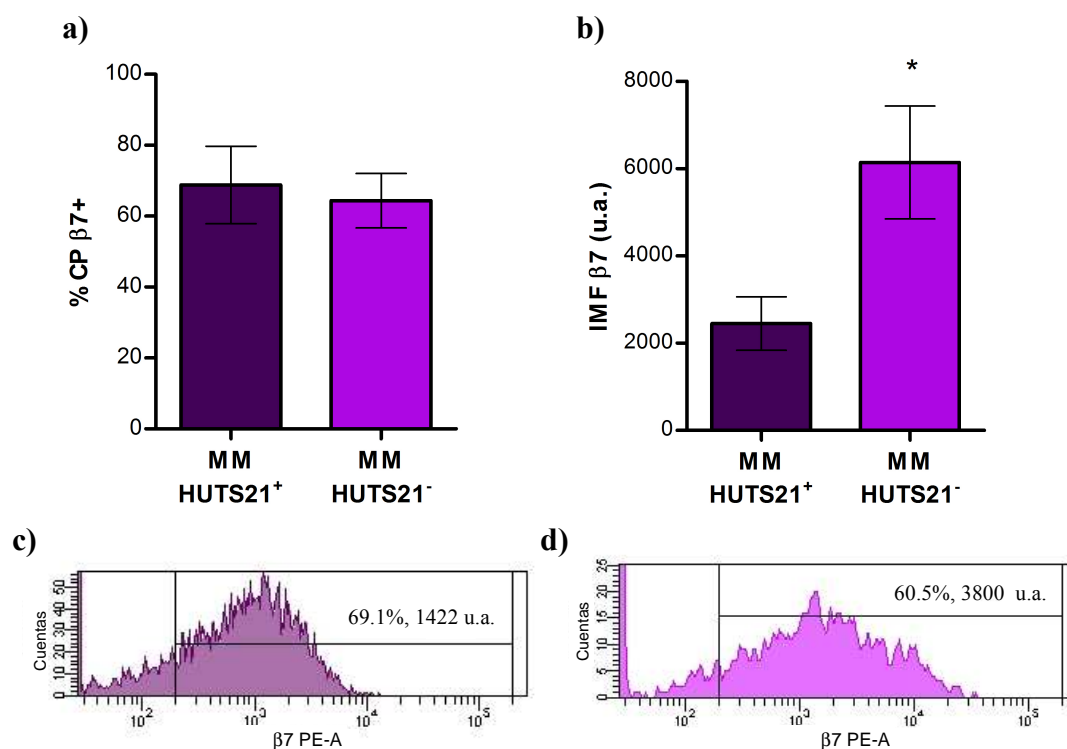


Figura 16. Expresión de la cadena $\beta 7$ en las CP de MO de pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻. (a) Porcentaje de expresión y (b) IMF de la cadena $\beta 7$ en los pacientes con alta y baja expresión de la forma activa de CD29. Las CP se detectaron por CTF como células CD38⁺⁺ /SSC intermedio. La expresión de la cadena $\beta 7$ se determinó utilizando el AcMo anti- $\beta 7$ -PE, clon FIB504. Pacientes HUTS21⁺: n=34; pacientes HUTS21⁻: n=15 (* $p < 0.05$). (c,d) Ejemplo representativo de la expresión de la cadena $\beta 7$ en un paciente HUTS21⁺ (c) y en un paciente HUTS21⁻ (d).

Debido a la amplia variabilidad observada en los datos correspondientes a la IMF de la cadena $\beta 7$ en los pacientes con MM HUTS21⁻, decidimos dividir a este grupo de pacientes en dos subgrupos bien definidos por este parámetro: aquellos pacientes HUTS21⁻ cuyas CP mostraban una IMF de la cadena $\beta 7$ alta (superior a 3000 u.a.) y pacientes HUTS21⁻ con una IMF de la cadena $\beta 7$ baja (inferior a 3000

u.a.). Estos dos subgrupos establecidos según la cantidad de cadena $\beta 7$ expresada en la membrana de las CP de los pacientes HUTS21⁻, exhibieron además diferencias significativas tanto en el porcentaje de expresión de la cadena $\beta 7$ (figura 17b) como en la IMF de CD49d (figura 17c).

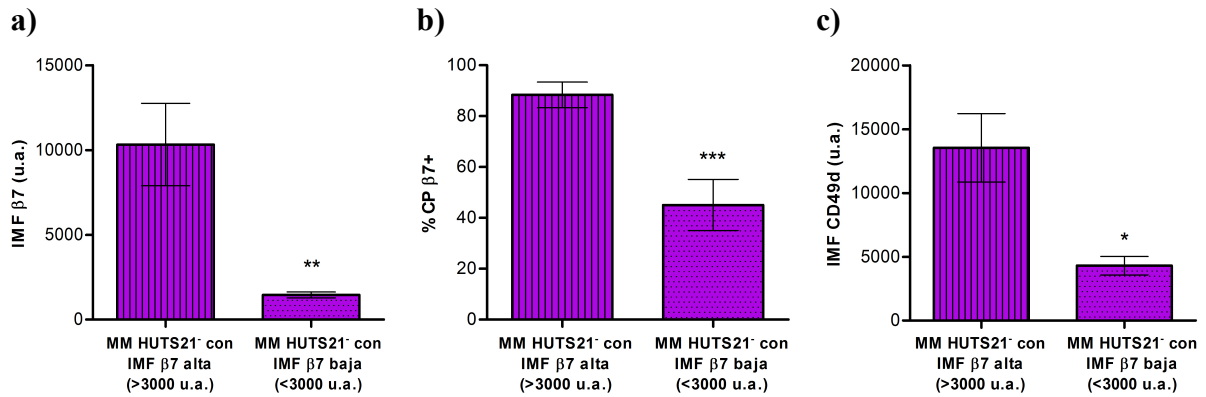


Figura 17. Subdivisión de las CP de pacientes con MM HUTS21⁻ en pacientes con una IMF alta y baja de la cadena $\beta 7$. (a) Las CP de pacientes con MM HUTS21⁻ se subdividieron en pacientes con IMF de $\beta 7 > 3000$ u.a. ($\beta 7$ IMF alta) y pacientes con IMF de $\beta 7 < 3000$ u.a. ($\beta 7$ IMF baja). (b) Porcentaje de expresión de $\beta 7$ y (c) IMF de CD49d en los pacientes HUTS21⁻ en los dos subgrupos. El porcentaje y expresión de la cadena $\beta 7$ se determinó con el AcMo anti- $\beta 7$ -PE, clon FIB504. La IMF de CD49d se determinó con el AcMo anti-CD49d-PE, clon 9F10. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Es importante recordar que los pacientes HUTS21⁻ pertenecían a un grupo de pacientes cuyas CP expresaban niveles bastante homogéneos y bajos de la forma constitutiva de CD29, por lo que no resulta sorprendente que las IMFs del epítipo MAR4 en los dos subgrupos de pacientes HUTS21⁻, con IMF de la cadena $\beta 7$ tanto alta como baja, no mostraran diferencias significativas (tabla VII). Más relevante aún es la certificación de que, si en cada uno de estos dos subgrupos examináramos caso por caso, la suma de las IMFs de la forma constitutiva de CD29 y de la cadena $\beta 7$ se aproximaba de forma bastante precisa a la IMF de CD49d (tabla VI), indicando claramente que una fracción de los pacientes HUTS21⁻ tratan de equilibrar la pérdida de CD29 constitutivo en sus CP con un aumento de la cadena $\beta 7$. Para ilustrar gráficamente este hallazgo, se muestra en la figura 18 un ejemplo representativo de un paciente con MM HUTS21⁻ e IMF alta de la cadena $\beta 7$ y otro ejemplo un paciente con MM HUTS21⁻ e IMF baja de la cadena $\beta 7$, y la expresión en ambos de la forma constitutiva de CD29 y de CD49d.

Tabla VII. Expresión de CD49d/CD29 en los dos subgrupos de pacientes con MM HUTS21⁻ atendiendo a la alta o baja IMF de β7.				
		IMF β7 alta		IMF β7 baja
β7	IMF	10320 ± 2430	p<0.01	1457 ± 179
	%	88.4 ± 5	p<0.001	45.1 ± 10
CD49d	IMF	13540 ± 2683	p<0.05	4301 ± 720
	%	99.1 ± 0.5	NS	97.3 ± 1.3
CD29 (MAR4)	IMF	4453 ± 465	NS	3906 ± 393
	%	92.8 ± 3.7	NS	93.8 ± 2

Tabla VII. Porcentaje de expresión e IMF de la cadena β7, la forma constitutiva de CD29 y de CD49d en pacientes con CP HUTS21⁻ con IMF alta o baja de β7. El porcentaje de expresión y la IMF se determinaron por CTF utilizando los AcMo anti-β7 clon FIB504, anti-CD29-PE clon MAR4 y anti-CD49d-PE clon 9F10. Pacientes HUTS21⁻ con IMF de β7 alta: n=17; pacientes HUTS21⁻ con IMF de β7 baja: n=14. NS: no significativo.

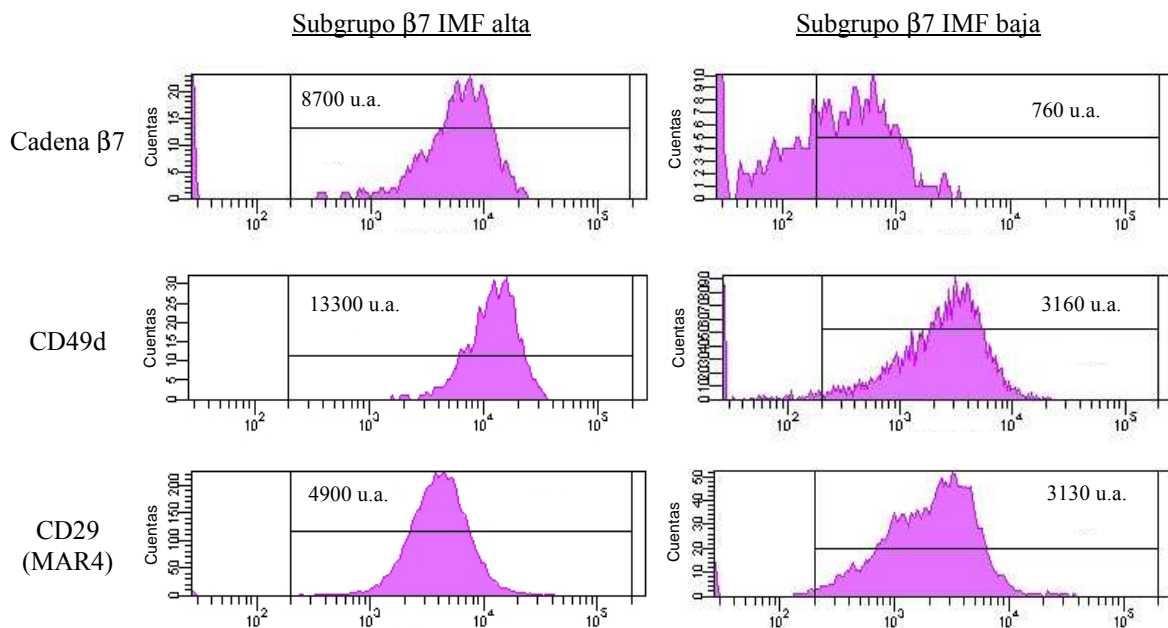


Figura 18. Detección por CTF de la expresión de la cadena β7, CD49d y la forma constitutiva de CD29 en pacientes con MM HUTS21⁻ con IMF de la cadena β7 alta o baja. Se muestran ejemplos representativos de un paciente perteneciente al grupo de MM HUTS21⁻ con expresión alta de la cadena β7 (histogramas de la izquierda) y de un paciente perteneciente al grupo de MM HUTS21⁻ con IMF baja de la cadena β7 (histogramas de la derecha). En el interior de cada histograma se señala la IMF de la cadena β7, de CD49d y de la forma constitutiva de CD29.

3. Análisis de la expresión diferencial de la forma constitutiva y activa de CD29 en pacientes con MGUS.

La gammapatía monoclonal de significado incierto o MGUS se caracteriza por la coexistencia en MO de CP normales (policlonales) y tumorales (monoclonales), y es considerada el estadio premaligno del MM. De hecho, un porcentaje significativo, aunque no mayoritario, de estos pacientes progresa hasta la etapa de MM. Teniendo en cuenta nuestros hallazgos en la expresión de la integrina CD29 en los pacientes con MM, nos dispusimos a estudiar si los pacientes con MGUS mostraban o no las mismas alteraciones. En la tabla VIII se muestra que la práctica totalidad de las CP normales y tumorales que coexisten en la MO de estos pacientes expresaron la forma constitutiva de la integrina CD29. Sin embargo, y de manera similar a lo descrito al comparar las CP de pacientes con MM e individuos sanos, la IMF de la forma constitutiva en las CP malignas de pacientes con MGUS fue significativamente menor a la IMF de las CP normales con las que coexisten.

Tabla VIII. Porcentaje de expresión e IMF de la forma constitutiva de CD29 (epítipo MAR4) en las CP normales y tumorales de pacientes con MGUS.				
	% CP MAR4+		IMF MAR4 (u.a.)	
CP normales	99.3 ± 0.3	NS	17900 ± 1000	p<0.001
CP tumorales	98.3 ± 0.6x		13750 ± 1100	

Tabla VIII. Porcentaje de expresión e IMF de la forma constitutiva de CD29 en CP normales y tumorales en pacientes con MGUS. Las poblaciones policlonal y tumoral se distinguieron utilizando varios de los criterios referidos en la figura 12. La forma constitutiva de CD29 se determinó por CTF mediante el AcMo anti-CD29-PE, clon MAR4 (n=36). NS: no significativo.

De igual manera a lo descrito en pacientes con MM, detectamos una heterogeneidad considerable en la IMF de la forma constitutiva de la integrina CD29 en las CP clonales de los distintos pacientes con MGUS, de manera que una fracción de los mismos expresaban niveles por completo equiparables a los niveles expresados por las CP normales con las que coexistían, mientras que otros expresaban una cantidad inferior en las CP tumorales con respecto a las CP normales. A su vez, y también de manera

similar a los pacientes con MM, se detectó una gran heterogeneidad en el porcentaje de células positivas para la forma activa de la integrina CD29. Por ambas razones, establecimos en los pacientes con MGUS una división idéntica a la adoptada con los pacientes con MM: pacientes con MGUS HUTS21⁺ (porcentaje de expresión de la forma activa de CD29 en las CP tumorales superior al 30%) y pacientes con MGUS HUTS21⁻ (porcentaje de expresión de la forma activa de CD29 en las CP tumorales inferior al 30%). Estas anomalías quedan claramente expuestas en la figura 19, donde vuelve a demostrarse una evidente correlación entre el bajo porcentaje de la forma activa de CD29 y la IMF disminuida de la forma constitutiva de CD29.

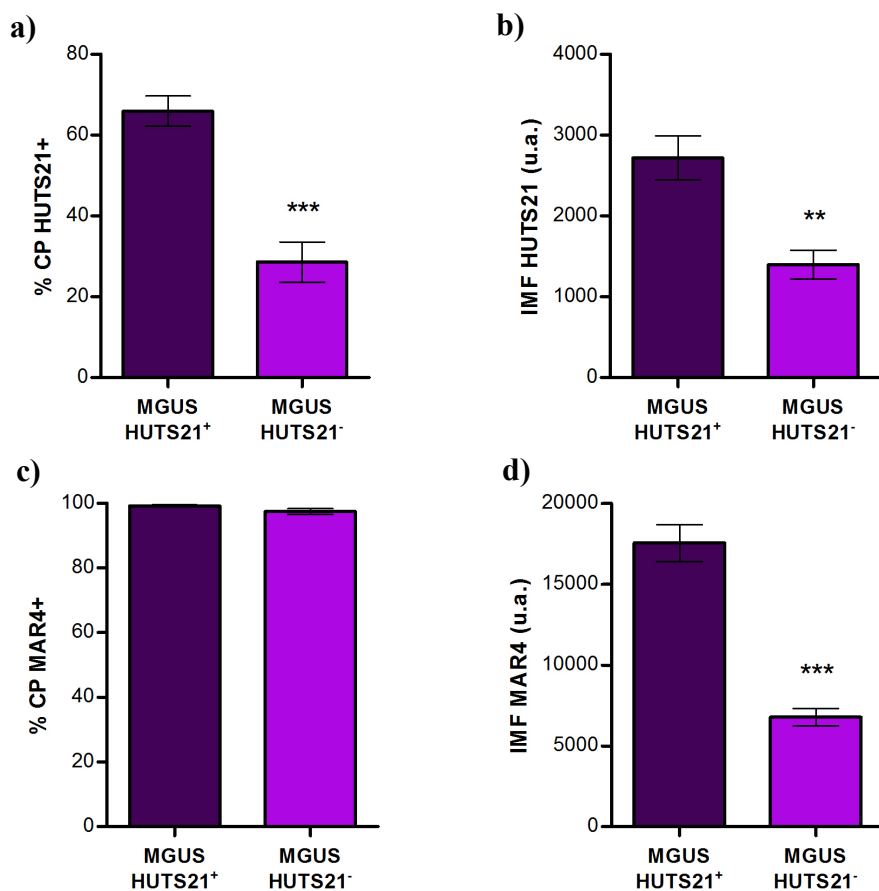


Figura 19. División de los pacientes con MGUS atendiendo a la alta o baja expresión de la integrina activada y su correlación con la IMF de la forma constitutiva. (a) Porcentaje de expresión y (b) IMF de la forma activa de CD29 en los dos grupos de pacientes con MGUS establecidos según la mayor o menor expresión de la forma activa de CD29. (c) Porcentaje de expresión de la forma constitutiva de CD29 en los pacientes con MGUS divididos atendiendo a la expresión alta o baja de CD29 activado, según el patrón mostrado en (a). (d) IMF de la expresión de la forma constitutiva de CD29 en los dos grupos de pacientes con MGUS. Los porcentajes de expresión y las IMF se determinaron por CTF en CP CD38⁺⁺ / SSC intermedio. Pacientes MGUS HUTS21⁺: n=28; pacientes con MGUS HUTS21⁻: n=12 (**p<0.01; ***p<0.001).

Por lo tanto, los pacientes con MGUS reproducen el modelo descrito en los pacientes con MM.

4. Regulación de la forma activa de la integrina CD29 por los factores solubles contenidos en el plasma medular.

Tal y como hemos descrito anteriormente, las CP de un grupo mayoritario de pacientes con MM, así como las CP normales de MO, expresan la integrina CD29 en su estado activado, si bien un grupo de pacientes no expresaron o expresaron débilmente la forma activa de CD29. Esta heterogeneidad en la expresión de la forma activada de la integrina nos indujo a estudiar los mecanismos implicados en su regulación. Así, nos dispusimos a explorar la contribución de los factores solubles contenidos en el plasma medular. Para ello, separamos la fase celular del aspirado de MO de su fase líquida, el plasma, tal y como se detalla en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, observamos que la retirada del plasma autólogo no modificó la expresión de la forma constitutiva de la integrina CD29 en las CP, ni en individuos sanos ni en pacientes con MM HUTS21⁺ (tabla IX).

Tabla IX. Efecto del plasma autólogo en la expresión de la forma constitutiva de CD29 en las CP de MO.				
	CP normales		CP tumorales HUTS21⁺	
	MO fresca	MO lavada	MO fresca	MO lavada
% CP MAR4 +	99.9 ± 0.05	99.9 ± 0.03	97.9 ± 1.4	98.5 ± 1.5
IMF (u.a.)	13410 ± 1250	12190 ± 1850	11400 ± 1245	10980 ± 878

Tabla IX. Expresión de la forma constitutiva de CD29 en CP, antes (MO fresca) o después (MO lavada) de la retirada del plasma autólogo. El porcentaje de expresión y la IMF se determinaron por CTF utilizando el AcMo anti-CD29-PE, clon MAR4. Los datos se expresan como la media ± EEM. Toda comparación entre porcentajes o IMFs no fue estadísticamente significativa ($p > 0.1$). Individuos sanos, n=5; pacientes con MM HUTS21⁺, n=5.

Por el contrario, como muestra la figura 20, la retirada de los factores solubles contenidos en el plasma medular condujo a un claro proceso de inactivación de la integrina, a juzgar por la notable disminución de la forma activa de CD29. Este efecto se observó de forma equiparable tanto en las CP de individuos sanos (figura 20a) como en las CP de pacientes con MM HUTS21⁺ (figura 20b).

A su vez, la adición del plasma medular previamente retirado reestableció los niveles iniciales de la forma activa de CD29, con una respuesta dosis-dependiente: a mayor cantidad de plasma añadido a las CP lavadas, mayor porcentaje de CP recuperaban la forma activa de CD29 (figura 20c). En cambio, la adición del plasma a la serie linfocítica lavada de MO no tuvo ningún efecto (figura 20c), un resultado esperable dado que, *in vivo*, esta población carece del epítipo de activación de la integrina. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó el clon 9EG7, otro AcMo que, al igual que el clon HUTS21, reconoce la forma activa de CD29 (datos no mostrados)

A continuación quisimos comprobar si los cationes contenidos en el plasma medular eran responsables, al menos en parte, de su capacidad estimuladora. Tal hipótesis estaba sustentada en el hecho de que la función adhesiva de las integrinas $\beta 1$ es fuertemente dependiente de cationes divalentes en numerosos sistemas celulares y, más en concreto, porque la forma activada de CD29 es también dependiente de cationes. Como primera aproximación, incubamos el plasma medular con EDTA, un quelante de cationes divalentes, previamente a añadirlo a las CP (que ya habían sido deplecionadas anteriormente de ese mismo plasma). Bajo estas condiciones, el plasma medular perdió su capacidad para reactivar la integrina CD29 tanto en CP normales como en CP tumorales HUTS21⁺ (figura 20a y 20b).

Así mismo, la forma activa de la integrina CD29 expresada en las CP normales y tumorales de los pacientes con MGUS HUTS21⁺ respondió de forma análoga tanto a la depleción del plasma como a la adición del plasma autólogo de los aspirados medulares de estos pacientes. De igual forma, el efecto activante del plasma autólogo sobre CD29 fue inhibido si era incubado previamente con EDTA (datos no mostrados).

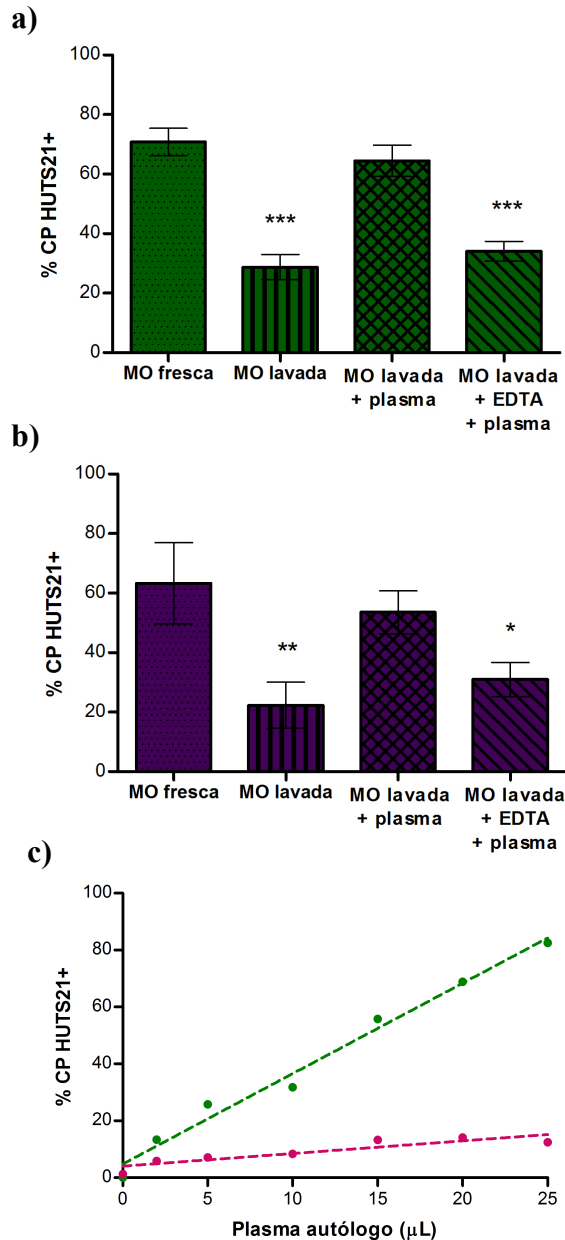


Figura 20. Efecto del plasma autólogo y de los cationes divalentes en la expresión de la forma activa de la integrina CD29 en CP normales y tumorales de MO. Expresión de la forma activa de CD29 en CP normales **(a)** y tumorales procedentes de pacientes con MM HUTS21⁺ **(b)**, antes (MO fresca), después (MO lavada), o tras la reconstitución de las CP lavadas con el plasma autólogo, incubado o no previamente con EDTA (5 mM) durante 1 hora. El porcentaje de expresión se determinó por CTF utilizando el AcMo anti-CD29-PE, clon HUTS21. Los datos se expresan como la media \pm EEM. Individuos sanos, n=5; pacientes con MM HUTS21⁺, n=10 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, con respecto al control de MO fresca). **(c)** La recuperación de la forma activa de CD29 en las CP lavadas en respuesta al plasma autólogo fue dependiente de la cantidad de plasma añadido. Se muestra el efecto dosis-dependiente en las CP (línea verde) y la ausencia de efecto en la serie linfóide de MO (línea rosa). En ambos casos, se muestra un ejemplo representativo de cuatro ensayos.

Estos resultados indicaban con claridad que la expresión fisiológica de la forma de alta afinidad de la integrina CD29 en CP de MO, detectada *in vivo*, era dependiente, al menos en parte, de cationes divalentes contenidos en el plasma.

En el plasma medular, además, se pueden encontrar moléculas que han sido previamente descritas en la literatura como activantes de CD29, entre las que destacan los dos principales ligandos de la integrina, la molécula CD106 (VCAM-1) y la fibronectina (FN), y la quimioquina SDF-1 α . Con el fin de comprobar si uno o varios de ellos eran capaces de activar CD29, el plasma medular fue incubado con

cantidades óptimas de Ac neutralizantes anti-CD106, anti-FN o anti-SDF-1 α antes de ser añadido a las células. Tal y como se muestra en la figura 21, sólo la incubación con Ac neutralizantes anti-CD106 bloqueó el efecto inductor del plasma sobre la integrina CD29 en los pacientes con MM HUTS21⁺ (resultados similares se obtuvieron con CP normales). Por el contrario, los Ac anti-FN o anti-SDF-1 no neutralizaron tal efecto inductor. Tampoco lo hicieron otros Ac neutralizantes frente a distintos factores de crecimiento (datos no mostrados).

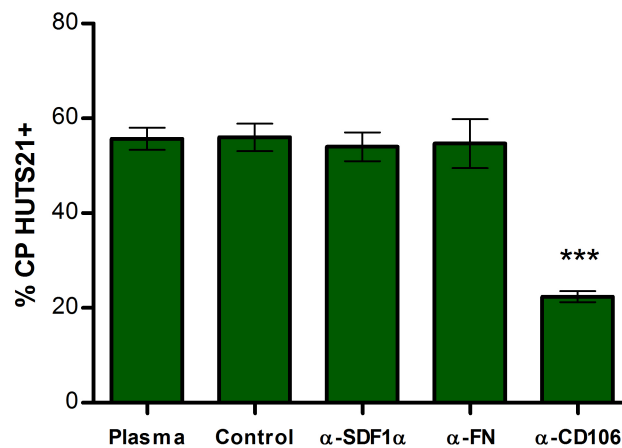


Figura 21. Contribución de los ligandos de CD29 (CD106 y FN) y de otros factores solubles contenidos en el plasma medular en su capacidad activante de CD29. Alícuotas de plasma medular autólogo fueron incubadas durante 18 horas con Ac neutralizantes anti-CD106, anti-FN o anti-SDF-1 α o con un Ac irrelevante (control isotípico). La modalidad “Plasma” corresponde a plasmas no incubados con ningún tipo de anticuerpo; después del tiempo establecido, se añadieron y se incubaron durante 45 minutos con las CP lavadas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de tres ensayos realizados en 3 individuos con MM HUTS21⁺. El cálculo de la significación estadística se estableció con respecto al efecto mediado por el plasma no incubado con anticuerpos (modalidad “Plasma”) (***) ($p < 0.001$).

En resumen, nuestros resultados demuestran que los factores contenidos en el plasma medular capaces de mantener activada a la integrina CD29 en la membrana de las CP son la molécula CD106 y los cationes divalentes.

5. Efecto de la adición exógena de cationes divalentes en la activación de la integrina CD29 en las células plasmáticas de médula ósea.

Una vez demostrado que el efecto regulador del plasma autólogo en la activación de CD29 era bloqueado por la previa incubación con EDTA, nos dispusimos a comprobar el efecto que tendría la adición exógena de diferentes cationes divalentes en la expresión de la forma activa de CD29 en las CP de MO. Para ello se utilizaron CP tanto de individuos sanos como de pacientes con MM que expresaban *in vivo* niveles normales de la integrina CD29 activa. Una vez que fueron deplecionadas del plasma autólogo y lavadas para eliminar cualquier vestigio de factor soluble activante, las CP normales se incubaron con cantidades crecientes de diferentes cationes divalentes: Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} . En la figura 22 se demuestra que el catión divalente Mn^{2+} indujo la expresión de la forma activa de CD29 en una forma dependiente de concentración: en la mayoría de los casos, se consiguió el efecto máximo (expresión de la forma activa en el 80-100% de las CP) a una concentración de 0.05 a 0.1 mM de Mn^{2+} . Este efecto se confirmó utilizando el AcMo 9EG7, otro AcMo que reconoce la forma activada de CD29 dependiente de Mn^{2+} (datos no mostrados).

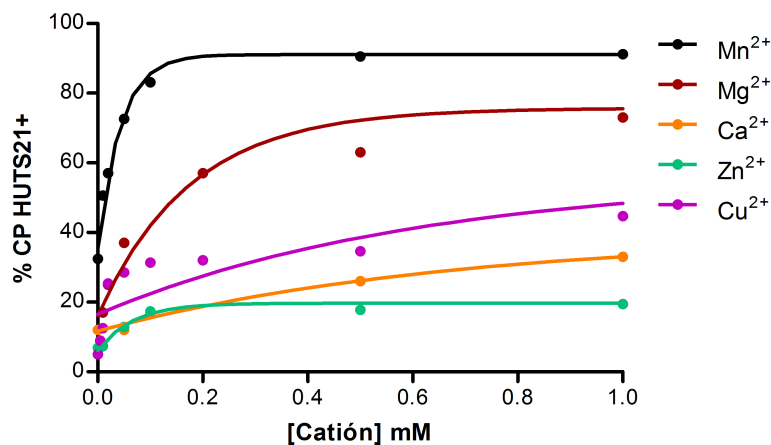


Figura 22. Efecto de diferentes cationes divalentes en la expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO. Las CP de MO de un individuo sano, lavadas exhaustivamente, se incubaron durante 45 minutos con concentraciones crecientes de los cationes divalentes indicados en la leyenda de esta figura. Las células se incubaron entonces con el AcMo anti-CD29-PE clon HUTS21 y se analizaron por CTF. Se muestra un ejemplo representativo de cinco realizados para cada especie de catión divalente.

Las concentraciones de Mg^{2+} capaces de activar CD29 de una manera similar a Mn^{2+} fueron más altas, sugiriendo diferentes afinidades por uno u otro catión en los dominios de la integrina conformados para tal fin. Por el contrario, otros cationes divalentes tales como Zn^{2+} , Cu^{2+} o Ca^{2+} no fueron capaces de restablecer la expresión de la forma activa de la integrina.

Dado que el efecto inductor más potente se consiguió con Mn^{2+} , este fue el catión elegido en todos los experimentos posteriores. Tal y como muestra la figura 23 de un ejemplo representativo de CP de MO de un individuo sano, de un paciente con MM o de un paciente con MGUS (todos con niveles normales *in vivo* de CD29 activado), los niveles de activación de la integrina se recuperaron rápidamente tras la adición de Mn^{2+} : a concentraciones tan bajas como 0.03 mM se consiguió que el 60-70% de las CP volvieran a expresar la forma activa de CD29 (porcentaje parecido al observado *in vivo*). El *plateau* se establecía habitualmente a concentraciones de Mn^{2+} de 0,1-0,2 mM con las que se conseguía que el 90-100% de las CP expresaran la forma activa de la integrina CD29.

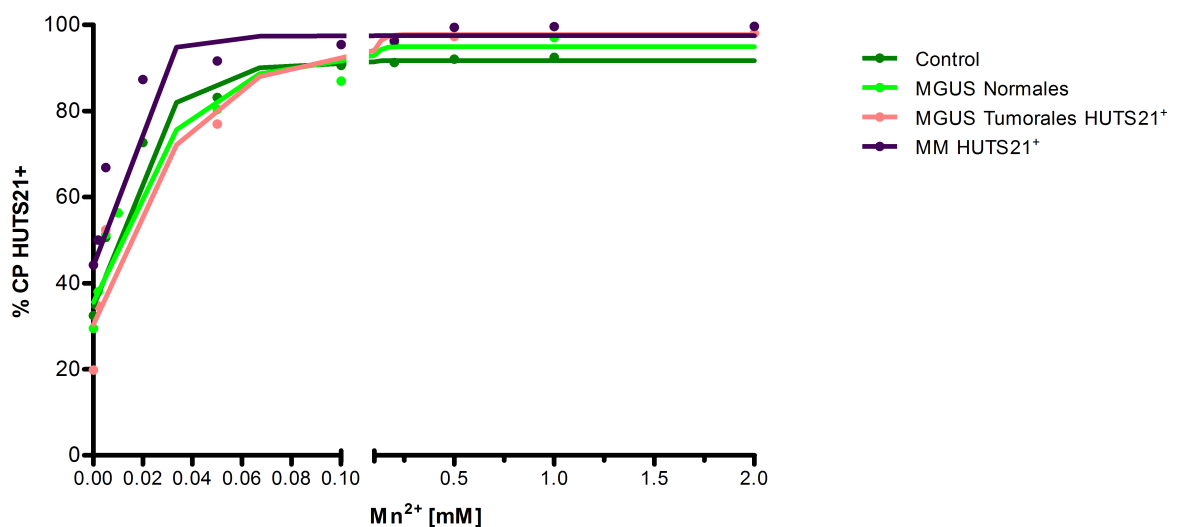


Figura 23. Efecto del Mn^{2+} en la activación de CD29 en CP normales y tumorales de MO con expresión normal *in vivo* de CD29 activado. Las CP normales o tumorales, lavadas previamente de forma exhaustiva para desactivar la integrina CD29 que, *in vivo*, se expresaba en un elevado porcentaje de células, se incubaron con concentraciones crecientes de Mn^{2+} durante 45 minutos. Las células se marcaron entonces con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21 y analizadas por CTF. Se presenta un caso representativo de un paciente con MO normal (control), de un paciente con MGUS con CP normales y tumorales HUTS21⁺ y de un paciente con MM HUTS21⁺.

6. Efecto de la adición exógena de rsCD106 en la activación de la integrina CD29 en las células plasmáticas de médula ósea.

Tras determinar que CD106 es uno de los factores contenidos en el plasma medular capaz de activar CD29 en la membrana de las CP, quisimos confirmar su implicación en la activación de esta integrina utilizando una forma comercial recombinante de CD106 (CD106 soluble recombinante o rsCD106).

Con tal fin, las CP de MO de pacientes con MM HUTS21⁺ se incubaron con concentraciones crecientes de rsCD106 en presencia de 0.01 mM de Mn²⁺. En los cinco casos estudiados, esta concentración de Mn²⁺ no indujo un cambio significativo en la expresión de la forma activa de CD29 en las CP lavadas. Como se muestra en el ejemplo representativo de la figura 24, la recuperación de los niveles de activación de la integrina se consiguió a una concentración de rsCD106 de 0.5 µg/mL (rango: 0.3 a 0.6 µg/mL). La recuperación mostró de nuevo una respuesta dependiente de concentración. El *plateau* en la respuesta se consiguió a una concentración de 0.5-1 µg/mL de rsCD106. Resultados similares se obtuvieron en el caso de CP normales (datos no mostrados). Un dato interesante en estos experimentos fue la necesaria presencia de Mn²⁺ para que el rsCD106 activara la integrina, sugiriendo la cooperación de ambos factores solubles.

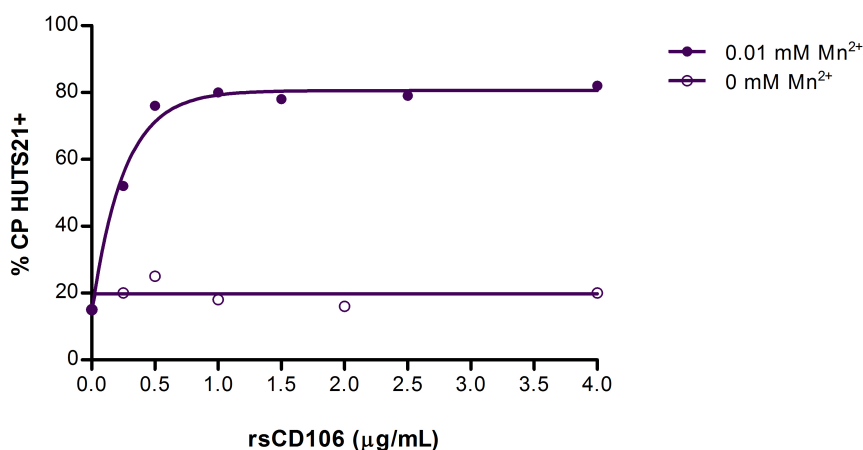


Figura 24. Efecto de rsCD106 en la activación de CD29 en CP tumorales HUTS21⁺ de MO. La MO de un paciente con MM HUTS21⁺ fue lavada exhaustivamente antes de la adición de cantidades crecientes de rsCD106. La incubación se realizó durante 45 minutos en presencia o ausencia de Mn²⁺. Las CP se marcaron entonces con el AcMo anti-CD29-PE clon HUTS21 y analizadas por CTF. Se muestra un ejemplo representativo de cinco realizados.

7. Refractoriedad de las células plasmáticas HUTS21⁻ a la activación de CD29 por los factores inductores contenidos en el plasma medular.

Como se ha descrito en los apartados anteriores, las CP tumorales de un grupo de pacientes con MM expresaron niveles bajos o indetectables de la forma activa de CD29 (pacientes HUTS21⁻). Por otro lado, los ensayos de regulación de la expresión de la forma activa de la integrina CD29 en las CP de individuos sanos y en las CP de pacientes con MM HUTS21⁺ indicaban claramente que la activación de CD29 era dependiente de los cationes divalentes y del CD106 soluble contenidos en el plasma medular. Por lo tanto, nos dispusimos a comprobar si el plasma medular de los pacientes con MM HUTS21⁻ carecía de los factores activantes de la integrina. La figura 25a muestra que las CP que *in vivo* no expresaban la forma activa de CD29, no sólo no respondieron a su propio plasma autólogo, sino que también fueron refractarias a los plasmas alógenicos procedentes de individuos sanos o de pacientes con MM HUTS21⁺ que habían mostrado, en ensayos previos, una acreditada capacidad activante de la integrina. La figura 25b, por otro lado, muestra cómo el plasma medular de un paciente con MM HUTS21⁻ es capaz de restaurar la forma activa de CD29 en las CP de pacientes HUTS21⁺ de manera similar a la de su propio plasma.

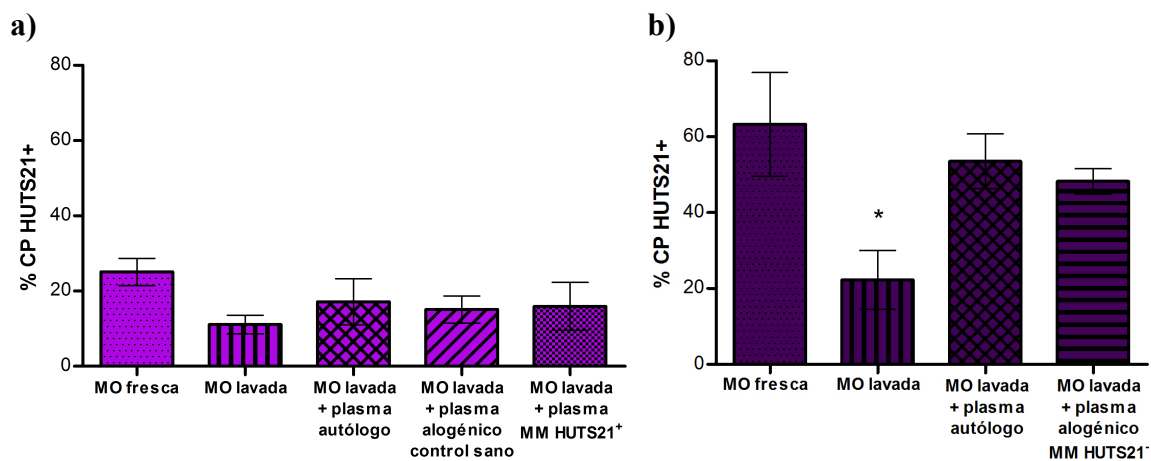


Figura 25. Respuesta diferencial en la activación de CD29 en CP HUTS21⁻ y HUTS21⁺ tras la adición de plasmas medulares. Se seleccionaron (a) pacientes con MM HUTS21⁻ (n=7) o (b) pacientes con MM HUTS21⁺ (n=6). Se incubaron las CP de estos pacientes tanto con sus propios plasmas autólogos como con plasmas alógenicos de individuos sanos o de pacientes con MM HUTS21⁺ o HUTS21⁻, en cada caso. Los datos se expresan como la media \pm EEM. La significación se estableció con respecto a la MO fresca (no lavada) (*p<0.05).

Estos resultados indicaban claramente que los plasmas de aquellos pacientes con niveles bajos o inexistentes de la integrina activada en la membrana de sus CP tumorales, contenían los factores activantes en cantidades equivalentes a los de los plasmas de pacientes con MM HUTS21⁺. De hecho, y como muestra la figura 26, las CP de MO de los pacientes con MM HUTS21⁻ no respondieron, o lo hicieron mínimamente, a la adición exógena de Mn²⁺ incluso en cantidades que quintuplicaban la dosis que un paciente con MM HUTS21⁺ requiere para conseguir un efecto óptimo.

La correlación entre los niveles de expresión *in vivo* de la integrina activada y la respuesta *in vitro* a los cationes de Mn²⁺ mostró un paralelismo excelente, de manera que los MM con nulos niveles *in vivo* de integrina activada muestran una total refractariedad a la adición exógena de Mn²⁺, mientras que las CP tumorales que *in vivo* manifestaban un nivel bajo pero detectable de CD29 activada, respondieron en un cierto grado al efecto inductor del Mn²⁺. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizaron rsCD106 en combinación con concentraciones subóptimas de Mn²⁺ (datos no mostrados).

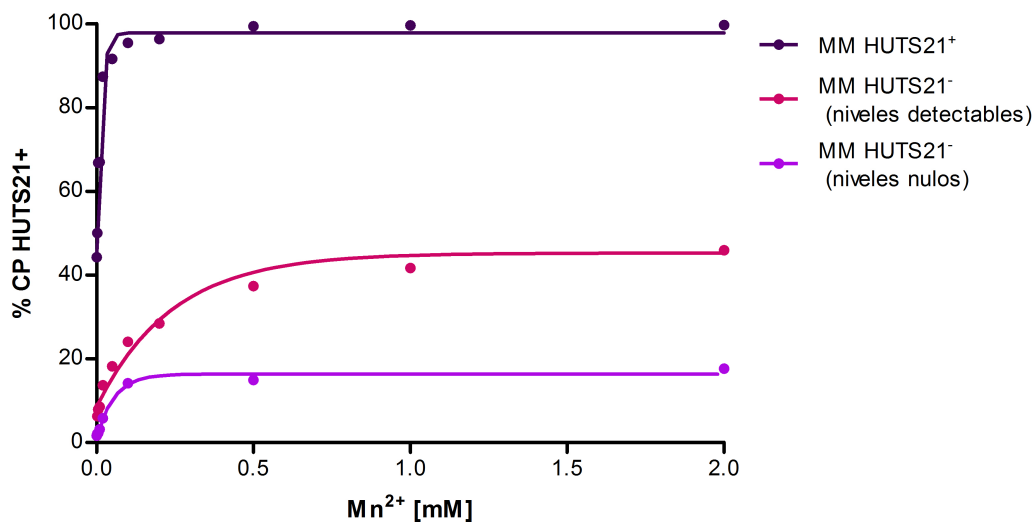


Figura 26. Correlación de la respuesta *in vitro* de las CP de MO al efecto inductor del Mn²⁺ y los niveles de expresión *in vivo* de la forma activa de CD29. Las CP de los pacientes de MM representados en este gráfico fueron lavadas para, a continuación, incubarse con cantidades crecientes de Mn²⁺. Las células se incubaron entonces con el AcMo CD29-PE, clon HUTS21 para comprobar el porcentaje de CP que reexpresaban CD29 en su forma activa. Se muestra un ejemplo representativo de ocho distintos para cada uno de los tres grupos de pacientes.

Esta refractariedad también pudo observarse en aquellos casos de pacientes con MGUS en donde, *in vivo*, las CP policlonales mostraban niveles normales de activación de CD29, mientras que sus CP tumorales expresaban niveles muy reducidos de la integrina activada (figura 27a). Un modelo perfecto, pues coexisten en el mismo microambiente CP con expresiones muy diferentes de CD29. Tal y como se muestra en la figura 27b, la adición de Mn^{2+} restauró los niveles de CD29 en las CP normales del paciente con MGUS a una concentración equivalente a la necesaria con las CP normales de la MO de sujetos sanos. Por el contrario, sólo una fracción minoritaria de la población clonal reexpresó la forma activa tras la adición de cationes de Mn^{2+} .

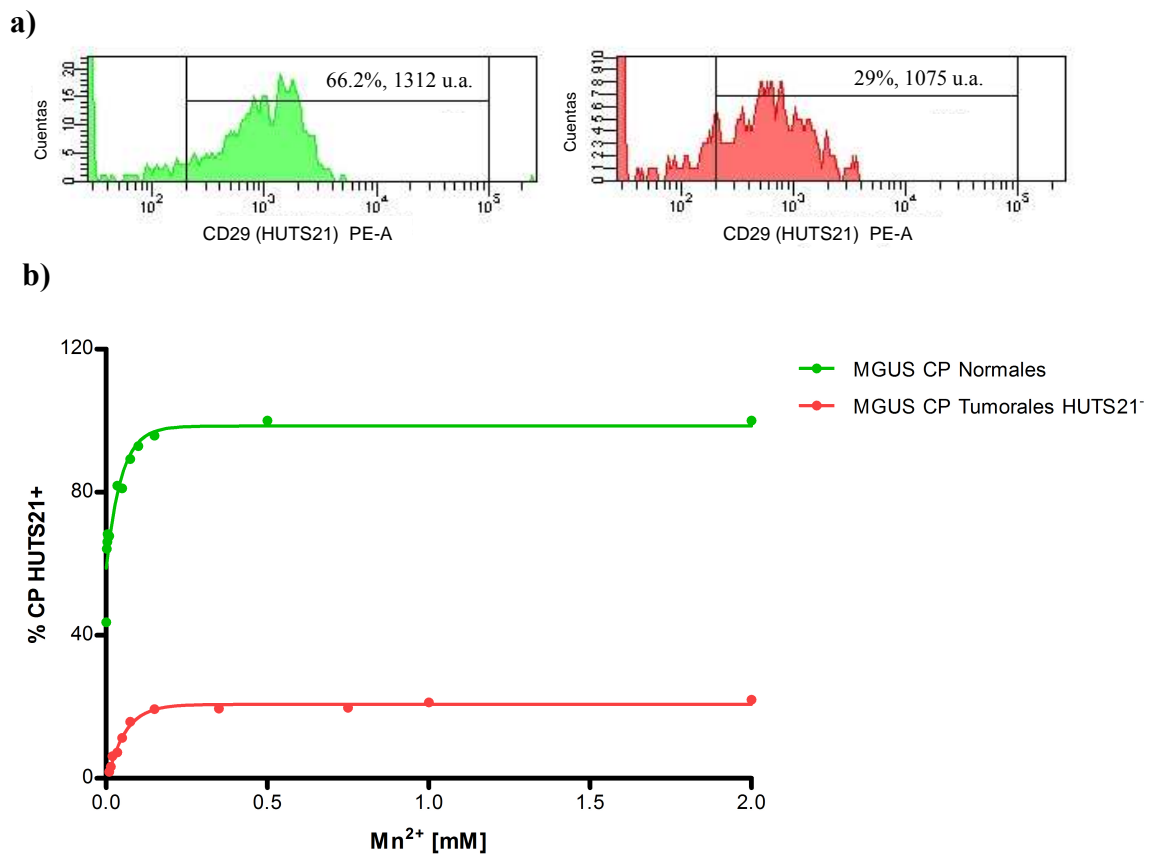


Figura 27. Paciente de MGUS con CP normales y CP tumorales HUTS21⁻. Efecto del Mn^{2+} en ambas poblaciones. (a) Histogramas en los que se muestra la distinta expresión de la forma activa de CD29 en las dos poblaciones de CP en un paciente de MGUS, detectadas según los criterios marcados en las figuras 11 y 12. (b) Las CP lavadas se incubaron con concentraciones crecientes de Mn^{2+} durante 45 minutos. Se marcaron posteriormente con el AcMo anti-CD29-PE, clon HUTS21 y se analizaron por CTF.

8. Correlación entre la expresión de la forma activa de CD29 en las células plasmáticas de médula ósea y la detección de células plasmáticas circulantes.

Aunque el MM es una enfermedad acantonada en MO, en las últimas dos décadas se ha demostrado que en una mayoría de pacientes con MM se pueden detectar CP circulantes en un porcentaje habitualmente tan bajo que pasa desapercibido para el estudio microscópico del frotis sanguíneo (120). Por otro lado, hemos descrito en el apartado 1 de Resultados que los pacientes de MM pueden dividirse en dos grupos atendiendo a la expresión en sus CP de la forma activa de CD29 (MM HUTS21⁺ y MM HUTS21⁻). Dada la especial relevancia que parece jugar la integrina CD49d/CD29 en la retención de las CP en MO, hemos considerado que la expresión disminuida de la forma activa de CD29 pudiera dar cuenta de la salida de las CP tumorales de la MO a la sangre periférica (SP). Tal y como se describe en la tabla X, el porcentaje de CP circulantes en los pacientes HUTS21⁻ fue claramente superior al detectado en los pacientes HUTS21⁺.

Tabla X. Porcentaje de CP tumorales en SP.		
	MM HUTS21⁺	MM HUTS21⁻
Media	0.08%	0.9%
Rango	0.01% - 0.16%	0.05% - 3%
n° de casos positivos/ n° casos totales	16/26 (61%)	13/13 (100%)

Tabla X. Las CP circulantes se detectaron con un triple marcaje (CD38-FITC/ CD138-PE/ CD45-PerCP) o cuádruple marcaje (CD38-FITC/ CD56-PE/ CD45-PerCP/ CD138-APC). Para el cálculo del porcentaje de CP circulantes, se realizó una ventana sobre células CD138+ con SSC bajo a intermedio. El estudio se realizó sobre, al menos, 500 CP circulantes. El porcentaje se expresa con respecto a la celularidad nucleada total de SP.

Además, las CP circulantes pudieron detectarse por CTF en todos los casos estudiados de pacientes HUTS21⁻ (13 de 13), mientras que se detectaron tan solo en 16 de 26 casos de pacientes HUTS21⁺ (61% de los casos). Por CTF, no se detectaron CP circulantes en individuos sanos o se detectaron en un porcentaje muy exiguo en un grupo muy minoritario de pacientes con MGUS (datos no mostrados).

Estos resultados indicaban una clara correlación entre la pérdida de expresión de la forma activa de CD29 y la salida de CP a la periferia. Tal relación se hizo más patente al constatar que las CP circulantes expresaban la forma activa de CD29 en un porcentaje aún menor que el registrado en las CP de MO de pacientes con MM HUTS21⁻ (6.3% ± 2.7 *versus* 16.2% ± 2.2, respectivamente), y que tal porcentaje disminuía hasta niveles prácticamente anecdóticos en las CP circulantes de pacientes con LCP (1.7% ± 0.8) (figura 28).

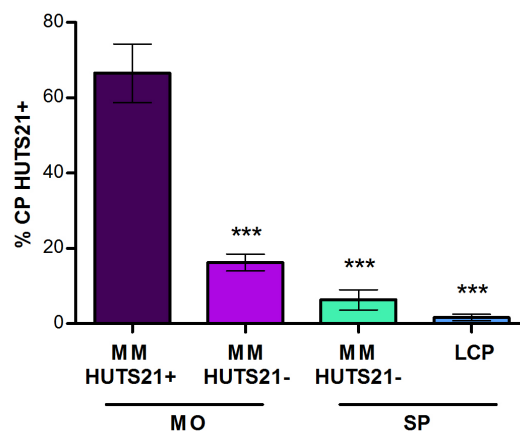


Figura 28. Porcentaje de expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO y SP en pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Las CP de MO o circulantes se detectaron por CTF siguiendo criterios ya descritos en las figuras 11 y 12 y en la tabla X. Las CP circulantes de pacientes con MM HUTS21⁻ se detectaron con la siguiente combinación de AcMo: CD38-FITC /CD29-PE (clon HUTS21), CD45-PerCP / CD138-APC. Los datos se expresan como la media ± EEM. MO de pacientes con MM HUTS21⁺: n=10; MO de pacientes con MM HUTS21⁻: n=20; SP de pacientes con MM HUTS21⁻: n=12; y SP de pacientes con LCP: n=4). La significación se estableció con respecto al porcentaje de CP HUTS21⁺ en pacientes con MM HUTS21⁺ (***)p<0.001).

Así mismo, y en concordancia con los datos anteriormente expuestos con CP de MO de pacientes con MM HUTS21⁻, la prácticamente total ausencia de la forma activa de CD29 en la membrana de las CP tumorales circulantes en pacientes con LCP, llevó aparejada una notable disminución en la IMF de la forma constitutiva de CD29 (figura 29). El porcentaje de expresión de la forma constitutiva estuvo próximo al 100% en las CP de MO o SP de todos los grupos de pacientes (MM HUTS21⁺, MM HUTS21⁻ y LCP) (datos no mostrados).

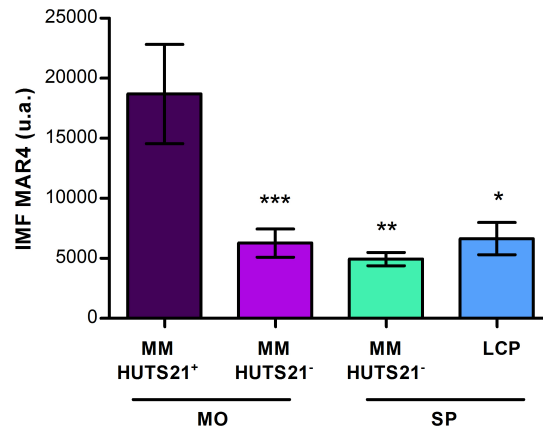


Figura 29. IMF de la expresión de CD29 constitutivo en CP tumorales de MO y circulantes.

Las CP de MO y circulantes se detectaron por CTF siguiendo criterios ya descritos en las figuras 11 y 12. Las CP circulantes de pacientes con MM HUTS21⁻ se detectaron con la siguiente combinación de AcMo: CD38-FITC /CD29-PE, clon MAR4 / CD45-PerCP / CD138-APC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. MO de pacientes con MM HUTS21⁺: n=10; MO de pacientes con MM HUTS21⁻: n=20; SP de pacientes con MM HUTS21⁻: n=12; y SP de pacientes con LCP: n=4. La significación se estableció con respecto a la IMF de CD29 epítipo MAR4 en pacientes con MM HUTS21⁺ (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

La estrecha correlación entre la ausencia de expresión de la forma activa de CD29 *in vivo* y la incapacidad de estas células para responder *in vitro* al Mn²⁺ (o a rsCD106) se corroboró cuando se estudió tanto la población circulante de células tumorales en pacientes con LCP, como cuando se analizó dicha respuesta en la pequeña población circulante de CP clonales que se detecta en los pacientes con MM HUTS21⁻. Tal y como ha descrito previamente, ambas poblaciones no expresaron la forma activa de CD29, y como cabía esperar, ambas poblaciones no respondieron o lo hicieron muy pobremente a la adición de Mn²⁺. En ninguno de los casos, la adición de Mn²⁺ consiguió reexpresar la forma activa de la integrina en más de un 15% de las células tumorales. Se muestra un ejemplo representativo de cada grupo de pacientes en la figura 30.

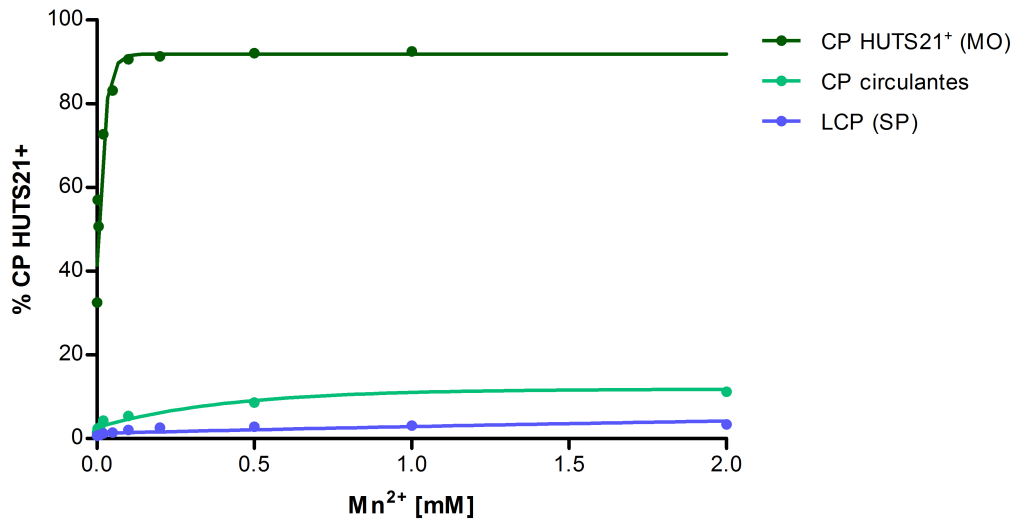


Figura 30. Efecto del Mn^{2+} en la activación de CD29 en CP circulantes de pacientes con MM HUTS21⁻ o con LCP en comparación con las CP de MO de pacientes con MM HUTS21⁺. Las CP lavadas de cada uno de los pacientes se incubaron con concentraciones crecientes de Mn^{2+} durante 45 minutos. Se marcaron posteriormente con el AcMo anti-CD29-PE, clon HUTS21 y se analizaron por CTF. Se muestra un ejemplo representativo para cada uno de los tres grupos de pacientes.

9. Respuesta de las células plasmáticas en plasmocitosis reactivas al efecto de los factores que inducen la activación de CD29.

Las plasmocitosis reactivas se caracterizan por una expansión transitoria de CP en territorios tales como la MO o la SP. Aunque este proceso puede asociarse al desarrollo de infecciones, enfermedades autoinmunes o tumores, su relativa rareza justifica que su biología siga siendo en gran medida desconocida.

En nuestra casuística, el porcentaje normal de CP en MO sanas (es decir, en MO sin ningún tipo de alteración porcentual o inmunofenotípica en ninguna de sus poblaciones medulares), determinado por CTF, fue de 0.3% como media con respecto a la celularidad total medular (rango: 0.1% a 0.7%; n=15). Con este patrón de normalidad, consideramos que una MO podía ser catalogada como MO con plasmocitosis reactiva cuando el porcentaje de CP policlonales sobre la celularidad total medular era mayor del

1,5%. En la mayoría de estos casos, el resultado se contrastó con el estudio citológico paralelo.

Tratamos entonces de comprobar si la expansión controlada de las CP en las plasmocitosis reactivas pudiera deberse a alteraciones en la expresión de CD29. Tal y como muestra la tabla XI, las CP de las plasmocitosis reactivas mostraron un perfil de expresión de la integrina CD29, tanto en su forma constitutiva como en su forma activa, que las emparentaba con el grupo de MM HUTS21⁺: exhibían una disminución de la IMF de la forma constitutiva de la integrina, así como una disminución tanto en el porcentaje de expresión como en IMF de la forma activa.

Tabla XI. Expresión de las formas constitutiva y activa de CD29 en individuos sanos y en individuos con plasmocitosis reactivas.							
	CD29 (MAR4)			CD29 (HUTS21)			
	Porcentaje	IMF (u.a.)		Porcentaje		IMF (u.a.)	
Individuos sanos	99.2 ± 0.5	19736 ± 1769	p<0.05	66.5 ± 5.5	p<0.01	2442 ± 218	p<0.05
Plasmocitosis reactivas	95.3 ± 4.1	10584 ± 2376		35.2 ± 6		1752 ± 328	

Tabla XI. Porcentaje de expresión e IMF de las formas constitutiva y activa de CD29 en CP de MO de individuos sanos con un porcentaje normal de CP (0.1%-0.7% respecto a la celularidad total medular) y en MO con porcentajes aumentados de CP policlonales (>1,5% sobre la celularidad total medular). El porcentaje de expresión e IMF de las formas constitutiva (CD29 clon MAR4) y activada (CD29 clon HUTS21) de CD29 se determinaron por CTF (individuos sanos: n=13; plasmocitosis reactivas: n=7).

Ante estos resultados, realizamos ensayos de activación *in vitro* de la integrina CD29 con el fin de comprobar si las CP de los pacientes con plasmocitosis reactivas respondían o no al efecto inductor del Mn²⁺. Tal y como se muestra en la figura 31, las CP de MO en plasmocitosis reactivas fueron capaces de reexpresar la forma activa de CD29 en respuesta a Mn²⁺, con un perfil de reactivación idéntico al de las CP de individuos sanos y al de las CP del grupo de pacientes con MM HUTS21⁺. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó rsCD106 como factor inductor (datos no

mostrados). Por lo tanto, la disminución en la expresión de la forma activa de CD29 fue por completo reversible en este tipo de proceso.

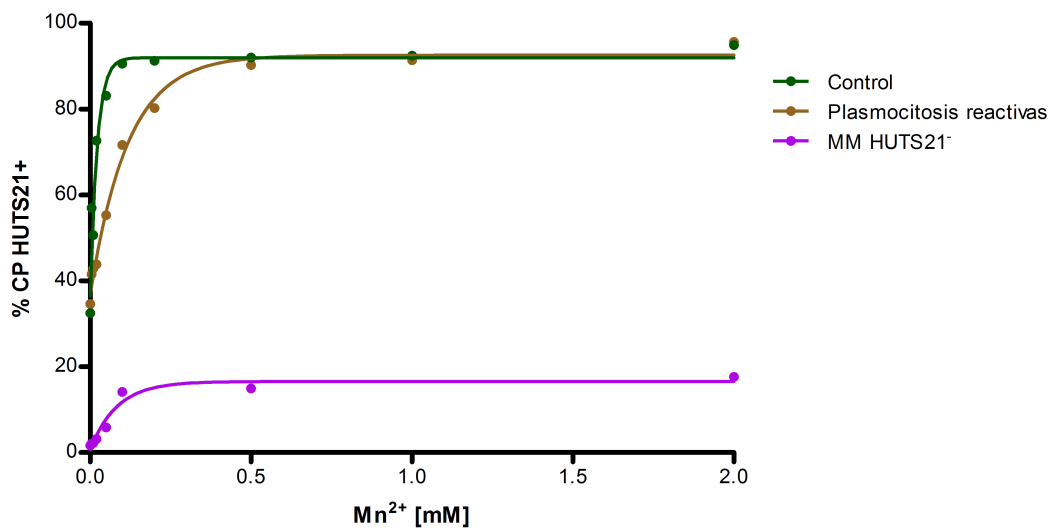


Figura 31. Efecto del Mn²⁺ en la activación de CD29 en CP de plasmocitosis reactivas. CP de un individuos sanos, de pacientes con plasmocitosis reactiva y pacientes con MM HUTS21⁻, lavadas previamente, se incubaron con cantidades crecientes de Mn²⁺. Las células se marcaron entonces con el AcMo CD29-PE, clon HUTS21, para comprobar el porcentaje de CP que reexpresaban CD29 en su forma activa. Se muestra un ejemplo representativo para cada uno de los tres grupos de pacientes.

10. Correlación entre la unión a fibronectina y los niveles *in vivo* de la integrina CD29 activada.

Dado que las CP se unen a FN utilizando CD49d/CD29 como principal molécula de adhesión, nos dispusimos a comprobar si la expresión *in vivo* de la forma activa de CD29 se correlacionaba con diferentes capacidades de unión a esta proteína de la MEC. El ensayo se realizó en presencia de una cantidad óptima de Mn²⁺ (0.2 mM), utilizando CP purificadas como indica el apartado 5 de Materiales y Métodos.

Tal y como muestra la figura 32, las CP de pacientes con MM HUTS21⁺ se unieron a FN. Además, tal unión fue inhibida aproximadamente en un 70-80% tras la adición de anticuerpos bloqueantes anti-CD29 (4B4) o anti-CD49d (HP2/1), confirmando el papel esencial jugado por este heterodímero en nuestro ensayo de

adhesión. La correlación existente entre el porcentaje de CP que expresan *in vivo* la forma activa de CD29 y la unión a FN fue lineal, pues las CP de pacientes con MM HUTS21⁻ (con un porcentaje de la forma activa de CD29 bajo pero cuantificable por CTF) manifestaron una adhesión a FN claramente disminuida con respecto a los pacientes cuyas CP expresaban niveles elevados de CD29 en su forma de alta afinidad, mientras que las CP de MO de pacientes con LCP, que mostraban una nula expresión de la forma activa de CD29 *in vivo*, no exhibieron adhesión a FN.

Por lo tanto, estos resultados demuestran una correlación prácticamente lineal entre los niveles *in vivo* de la forma activa de la integrina CD29 en la membrana de las CP, su respuesta al plasma o a los factores añadidos exógenamente (cationes de Mn²⁺ y rsCD106) y la adhesión a FN.

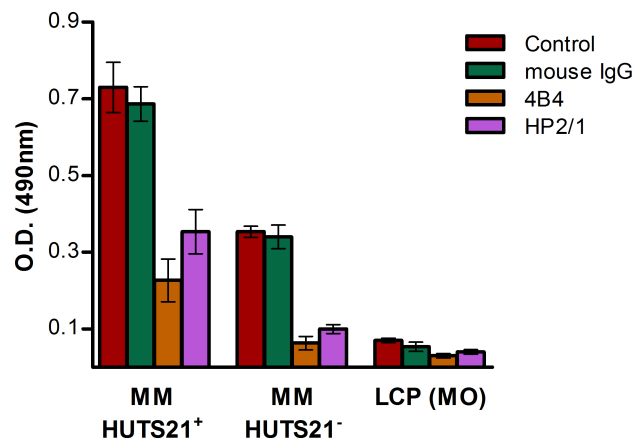


Figura 32. Adhesión a FN de las CP de pacientes con MM HUTS21⁺, HUTS21⁻ y LCP. La capacidad de adhesión de CP purificadas de MO en pacientes con MM HUTS21⁺ (n=4), HUTS21⁻ (n=3) y LCP (n=3) fue cuantificada según se describe en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en presencia de 0.2 mM de Mn²⁺. (O.D.: unidades de densidad óptica).

11. Perfil electroforético de CD29 en células plasmáticas normales y tumorales de pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻.

Los resultados expuestos hasta el momento indican con claridad que las CP de un grupo minoritario de pacientes con MM o con MGUS expresan *in vivo* cantidades disminuidas de la integrina CD29 activada, y que tal hallazgo se correspondía con una

disminución de la cantidad de la forma constitutiva de esta integrina. Dado que en estos casos la forma activa de CD29 no era recuperable tras la adición exógena de plasma alogénico normal, de Mn^{2+} o de rsCD106, quisimos comprobar las características electroforéticas de esta molécula en ambos tipos de pacientes para descartar posibles cambios estructurales de la misma.

Tal y como muestra la figura 33, el lisado de CP normales de MO mostró en el *western blot* dos bandas de aproximadamente 130kD y 110kD. Este patrón coincide con el de otros tipos celulares en el que la proteína de 130kD se corresponde con la forma madura glicosilada de membrana y la proteína de 110kD con la proteína precursora y parcialmente glicosilada de la primera (173). Por otro lado, estas dos mismas bandas se detectaron en las CP de todos los pacientes, independientemente de su pertenencia a muestras de pacientes con MM HUTS21⁺ o HUTS21⁻ o con LCP, y también de forma independiente con respecto al territorio del que fueron obtenidas, ya sea MO o SP. Estos resultados indicaban claramente que la ausencia *in vivo* de la integrina activada y su refractariedad *in vitro* a los activadores no es dependiente del estado de maduración de CD29. Además, la proporción de ambas isoformas de CD29 (madura y precursora) era muy similar en todos los grupos de pacientes estudiados.

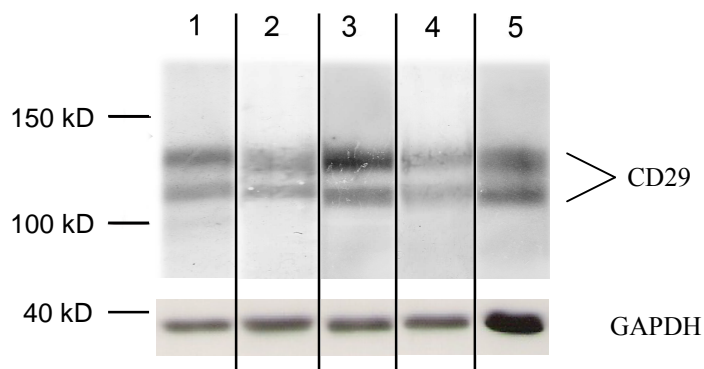


Figura 33. Imagen de *western blot* comparando los perfiles electroforéticos de la molécula CD29 en CP normales y tumorales de distintas gammapatías monoclonales y de diferentes territorios. **1:** CP normales de MO; **2 y 3:** CP tumorales de MO procedentes de pacientes con MM HUTS21⁻ y HUTS21⁺, respectivamente; **4 y 5:** CP tumorales de un paciente con LCP procedentes de SP y MO, respectivamente. 1×10^6 CP purificadas fueron utilizadas en cada caso. La posición de los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH (37kD).

Estos resultados, por lo tanto, indican que, independientemente de la capacidad de la integrina para activarse *in vivo* e *in vitro*, no existen cambios ni en el grado de glicosilación ni en el peso molecular de ambas bandas de la molécula CD29 que justifiquen su diferente comportamiento.

12. Capacidad proliferativa de las células plasmáticas normales y tumorales. Índice proliferativo en MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻.

Es bien sabida la escasa capacidad proliferativa de las células tumorales en procesos crónicos, incluyendo el MM (152). Sin embargo, apenas se tienen datos respecto al índice proliferativo de las CP normales y tumorales que coexisten en pacientes con MGUS. A su vez, la relación existente entre proliferación y la capacidad de adhesión de las células tumorales no se ha explorado suficientemente.

Con este fin estudiamos por CTF la incorporación de BrdU por las CP, una técnica que permite un análisis muy preciso de células proliferantes en poblaciones incluso muy minoritarias.

En la tabla XII se puede comprobar cómo el índice proliferativo de las CP normales es significativamente superior al detectado en las CP tumorales tanto en pacientes con MGUS como en pacientes con MM. A su vez, la capacidad proliferativa de las CP normales en pacientes con plasmocitosis reactivas fue significativamente superior no sólo al registrado por las CP tumorales en MM y MGUS, sino también al detectado en las CP normales (tabla XII).

Tabla XII. Índices de proliferación de CP (% CP BrdU+).		
	CP Normales	CP Tumorales
Individuos sanos	1.8% ± 0.2	NP
MGUS	1.4% ± 0.1	0.8% ± 0.1
	p < 0.05	
MM	ND	1.1% ± 0.2 p < 0.01 (vs. individuos sanos)
Plasmocitosis reactivas	3.4% ± 0.8 p < 0.001 (vs. individuos sanos) p < 0.001 (vs. MGUS normales)	NP

Tabla XII. Tasas de proliferación en CP de individuos sanos (n=19), pacientes con MGUS (n=24), con MM (n=32) o con plasmocitosis reactivas (n=5). Las células se cultivaron 18 horas en presencia o ausencia de BrdU. Tras marcar los antígenos de superficie, las células fueron permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti-BrdU-FITC. (NP: no presentes; ND: no detectables).

A continuación, y en línea con los resultados previamente expuestos, quisimos comprobar si las CP tumorales de los pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻ diferían o no en su capacidad proliferativa. Tal y como muestra la figura 34, las CP de los pacientes HUTS21⁻ mostraron un índice proliferativo significativamente mayor que el de las CP de los MM HUTS21⁺ (2.1% ± 0.7, rango de 0.3% a 5.9% *versus* 1% ± 0.3, rango de 0.7% a 1.8%, respectivamente, p<0.05).

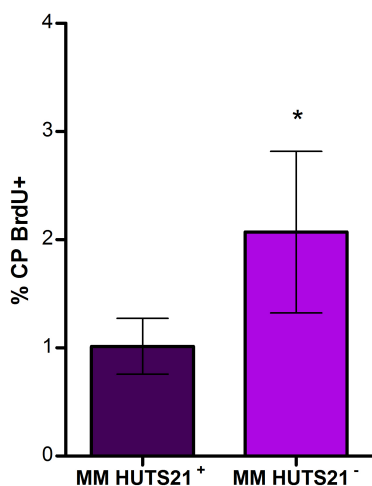


Figura 34. Índice proliferativo de las CP tumorales en pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Las células se cultivaron 18 horas en presencia o ausencia de BrdU. Tras marcar los antígenos de superficie (CD38-APC, CD138-PE y CD45-PerCP), las células fueron permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti-BrdU-FITC. Los datos se expresan como la media ± EEM de las CP tumorales BrdU+ en los pacientes con MM HUTS21⁺ (n=14) y HUTS21⁻ (n=18) (*p<0.05).

En línea con los resultados mostrados hasta ahora, las CP de MO de pacientes con LCP, un proceso caracterizado por la ausencia prácticamente total de la expresión la forma activa de CD29, mostró un porcentaje de CP BrdU+ de un $6\% \pm 3.3$ ($n=5$) (figura 35). Además, las CP de SP de estos mismos pacientes con LCP mostraron una capacidad proliferativa aún mayor ($9.8\% \pm 4.3$; $n=4$).

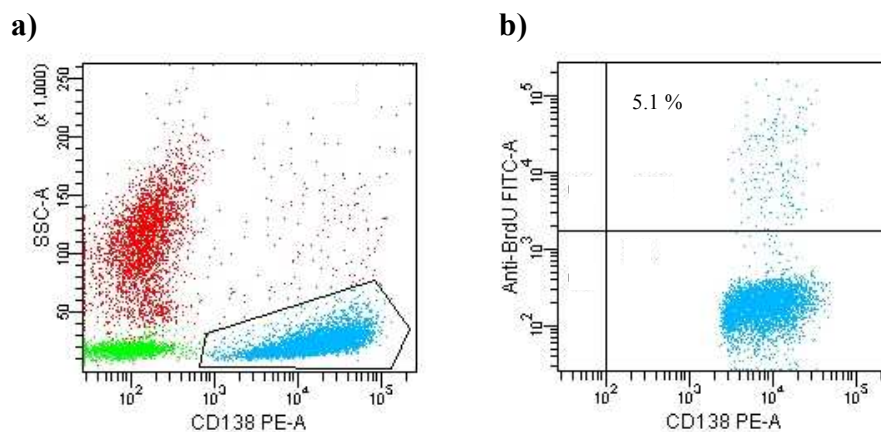


Figura 35. Detección de CP proliferantes en la SP de un paciente con LCP. (a) Imagen de CTF de las CP tumorales circulantes (en azul) en un paciente con LCP. Las CP se detectaron como células CD138+, y constituían el 50% de la celularidad total analizada. (b) Histograma biparamétrico de las células de la ventana dibujada en a). Fracción proliferante: 5.1% de CP BrdU+).

Por lo tanto, la pérdida de expresión de la forma activa de la integrina CD29 se asocia a una mayor capacidad proliferativa de las CP.

13. Expresión de moléculas asociadas a supervivencia y apoptosis en células plasmáticas normales y tumorales.

Los resultados mostrados en el apartado anterior demostrando una menor capacidad proliferativa de las CP tumorales en el MGUS y en pacientes con MM HUTS21⁺ con respecto a las CP normales, no sólo concuerdan con la conocida naturaleza crónica y acumulativa de las gammopatías monoclonales, sino que también abren un interrogante interesante en relación a cómo coexisten en equilibrio durante largos periodos de tiempo las CP normales y tumorales en el MGUS, así como en la distinta progresión de las dos poblaciones de CP tumorales HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Para

dar contestación a estas preguntas, pasamos a estudiar dos de las moléculas que regulan la supervivencia y la apoptosis de estas células.

Comenzamos estudiando los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Tal y como se describe en la tabla XIII, las CP de MO de controles sanos expresaron porcentajes de positividad para Bcl-2 inferiores a los detectados en las CP tumorales de pacientes con MM, resultados que se reprodujeron de forma muy similar en las CP normales y tumorales que coexisten en los pacientes con MGUS.

Tabla XIII. Expresión de Bcl-2 en CP.				
	% CP Bcl-2+		IMF Bcl-2 (u.a.)	
Individuos sanos	76.8 ± 7.6	NS	1688 ± 107	p<0.05
MM	93.7 ± 1.6		4392 ± 669	
MGUS: CP normales	80 ± 3.4	NS	2806 ± 200	p<0.05
MGUS: CP tumorales	93.3 ± 1.5		3935 ± 300	
Plasmocitosis reactivas	30.4 ± 4	p<0.001 (1)	782 ± 41	p<0.001 (1)

Tabla XIII. Expresión e IMF de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en CP de individuos sanos (n=10), pacientes con MM (n=32), MGUS (n=27) y plasmocitosis reactivas (n=6). Las CP fueron detectadas según los criterios referidos en las figuras 11 y 12. Las CP fueron permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo anti-Bcl-2-FITC, clon 124. (1) Significación estadística con respecto a las CP de individuos sanos.

Estas diferencias en la expresión de Bcl-2 entre CP normales y tumorales fueron estadísticamente significativas al comparar las IMF: la tabla XIII muestra con claridad que la cantidad de proteína Bcl-2 en las células tumorales fue considerablemente mayor que en las CP normales.

Por otra parte, las CP de las plasmocitosis reactivas expresaron los niveles más bajos de esta proteína, tanto en porcentaje de expresión como en IMF, indicando una evidente regulación negativa de esta proteína en el proceso que conduce a la expansión policlonal de estas células.

Una vez más, cuando los pacientes con MM se subdividieron en MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻, se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos: aunque los porcentajes de positividad para Bcl-2 fueron muy similares (92% ± 4.2 en CP de pacientes con MM HUTS21⁺ con respecto al 94.1% ± 1.2 en MM HUTS21⁻) (figura 36a), las IMF fueron significativamente distintas (4605 ± 600 u.a. vs. 3006 ± 435 u.a., respectivamente) (Figura 36b).

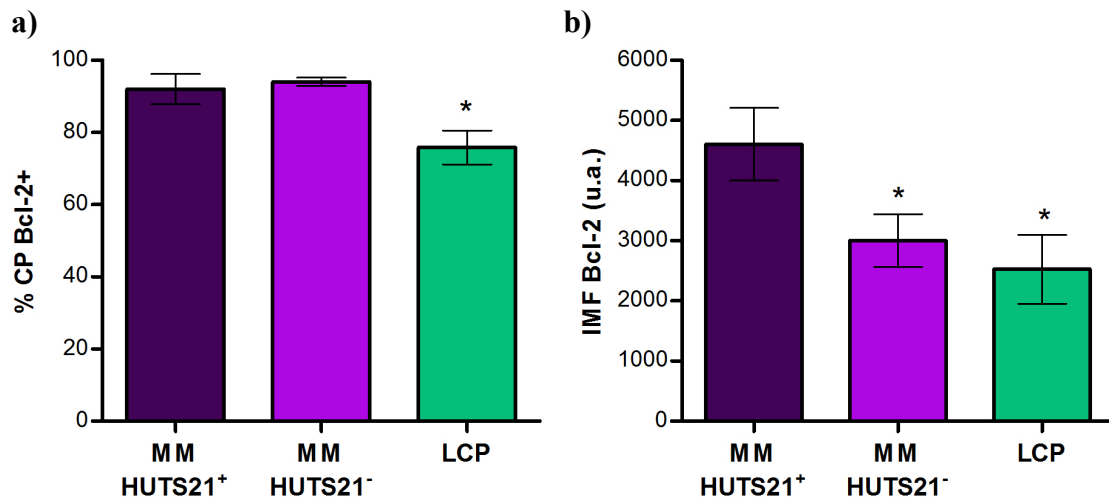


Figura 36. Porcentaje de expresión e IMF de Bcl-2 en las CP de pacientes con MM HUTS21⁺ y HUTS21⁻. Las células contenidas en 50 µl de aspirado de MO de pacientes con MM HUTS21⁺ (n=14) y HUTS21⁻ (n=18) o LCP (n=4), fueron inicialmente marcadas en su superficie con cantidades óptimas de anticuerpos anti-CD138-PE, anti-CD45-PerCP y anti-CD38-APC. Posteriormente las células fueron permeabilizadas y paralelamente marcadas con anti-Bcl-2-FITC, clon 124. Los datos se expresan como la media ± EEM. La significación se estableció con respecto a la IMF de Bcl-2 de las CP tumorales de los pacientes con MM HUTS21⁺ (*p<0.05).

En coherencia con estos resultados, las CP de los pacientes con LCP, el más claro ejemplo de gammapatía monoclonal HUTS21⁻, extremó la tendencia apuntada en los MM HUTS21⁻: el porcentaje de expresión de Bcl-2 se redujo significativamente (75.8% ± 4.7) y, de igual forma, la IMF descendió aún más llamativamente (2526 ± 573 u.a.) (figura 36).

Así como la molécula Bcl-2 promueve la supervivencia de las células, la expresión de CD95 se asocia a una mayor tendencia a la apoptosis en diversos tipos celulares (174). Como se puede comprobar en la Tabla XIV, la expresión de CD95 siguió en gran medida un patrón inverso al exhibido por Bcl-2: las CP normales

expresaron, en la gran mayoría de los casos, una cantidad de CD95 superior a la de las CP tumorales.

Tabla XIV. Expresión de CD95 en CP normales y tumorales.				
	% CP CD95+		IMF CD95 (u.a.)	
Individuos sanos	65.5 ± 6.2	p<0.05	3782 ± 348	p<0.01
MM	32.4 ± 6.6		2317 ± 322	
MGUS: CP normales	58.8 ± 3.3	p<0.001	3866 ± 362	p<0.05
MGUS: CP tumorales	32.5 ± 3.5		2960 ± 350	
Plasmocitosis reactivas	90.9 ± 3.4	p<0.05(†) p<0.01(††)	4217 ± 933	NS

Tabla XIV. Porcentaje de expresión e IMF de la proteína pro-apoptótica CD95 en CP de individuos sanos (n=11), pacientes de MM (n=33), MGUS (n=35) y plasmocitosis reactivas (n=5). La proteína CD95 se detectó con el anticuerpo anti-CD95-PE, clon DX2. Los datos se expresan como la media ± EEM. (†) Significación estadística con respecto a las CP de individuos sanos, (††) Significación estadística con respecto a las CP normales de pacientes con MGUS.

Es de resaltar que no se encontraron diferencias reseñables entre los dos grupos de pacientes con MM HUTS21⁺ o HUTS21⁻, ni en porcentaje de células positivas para el antígeno ni en IMF (figura 37); al mismo tiempo, aunque los pacientes con LCP presentaron un ligero aumento en el porcentaje de CP positivas para la proteína CD95 (48.9% ± 4, n=4), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, mostrando, al mismo tiempo, una IMF para el antígeno idéntica a los dos grupos de pacientes con MM (2518 ± 693 u.a., n=4).

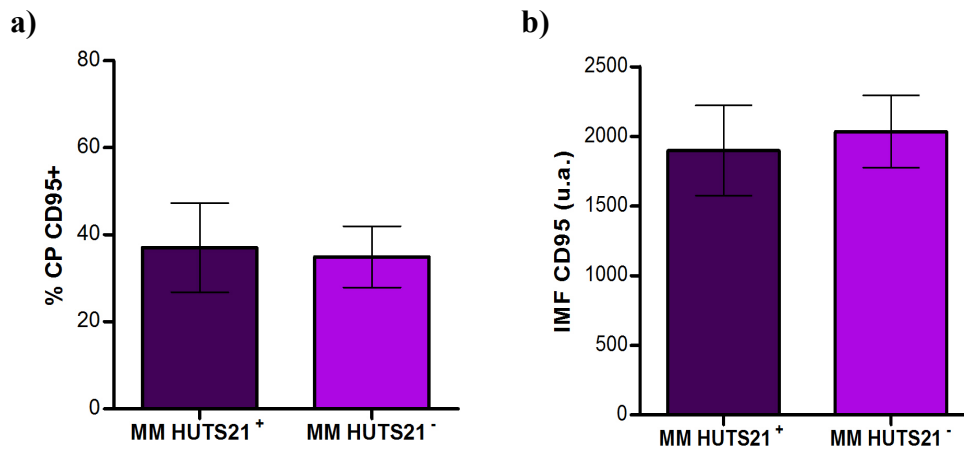


Figura 37. Porcentaje de expresión e IMF de CD95 en pacientes con MM HUS21⁺ y HUS21⁻. Las células contenidas en 50 μ l de aspirado de MO de pacientes con MM HUS21⁺ (n=17) y HUS21⁻ (n=14), fueron marcadas en su superficie con cantidades óptimas de anticuerpos anti-CD138-FITC, anti-CD95-PE clon DX), anti-CD45-PerCP y anti-CD38-APC. Los datos se expresan como la media \pm EEM. La significación se estableció con respecto a la IMF de CD95 de las CP tumorales de los pacientes con MM HUS21⁺ ($p < 0.1$).

14. Células preplasmáticas tumorales en el linfoma de cavidades: un modelo de déficit de adhesión.

Aunque en la actualidad el linfoma de cavidades no está catalogado como una gammapatía monoclonal, el perfil antigénico y en ocasiones la morfología de sus células emparenta a este proceso como un tumor de células pre-plasmáticas / plasmáticas (87). Nuestro interés radicaba en la peculiar localización de estas células en diferentes cavidades corporales (abdominal, pleural) y en los exudados que se generan en ellas bajo ciertas condiciones, es decir, en una fase líquida que parece indicar una capacidad adhesiva atípica.

Se examinaron dos muestras de pacientes con linfoma de cavidades, una procedente de la cavidad abdominal y otra de la cavidad pleural. En ambos casos, las células tumorales exhibieron un perfil antigénico compatible con una CP clonal: CD38+, CD138+, CD19- y restricción para la cadena ligera de la Ig citoplásmica. Estas células no expresaron Ig en su superficie y, contrariamente a lo que es habitual en el MM, no expresaron tampoco el antígeno CD56 (figura 38).

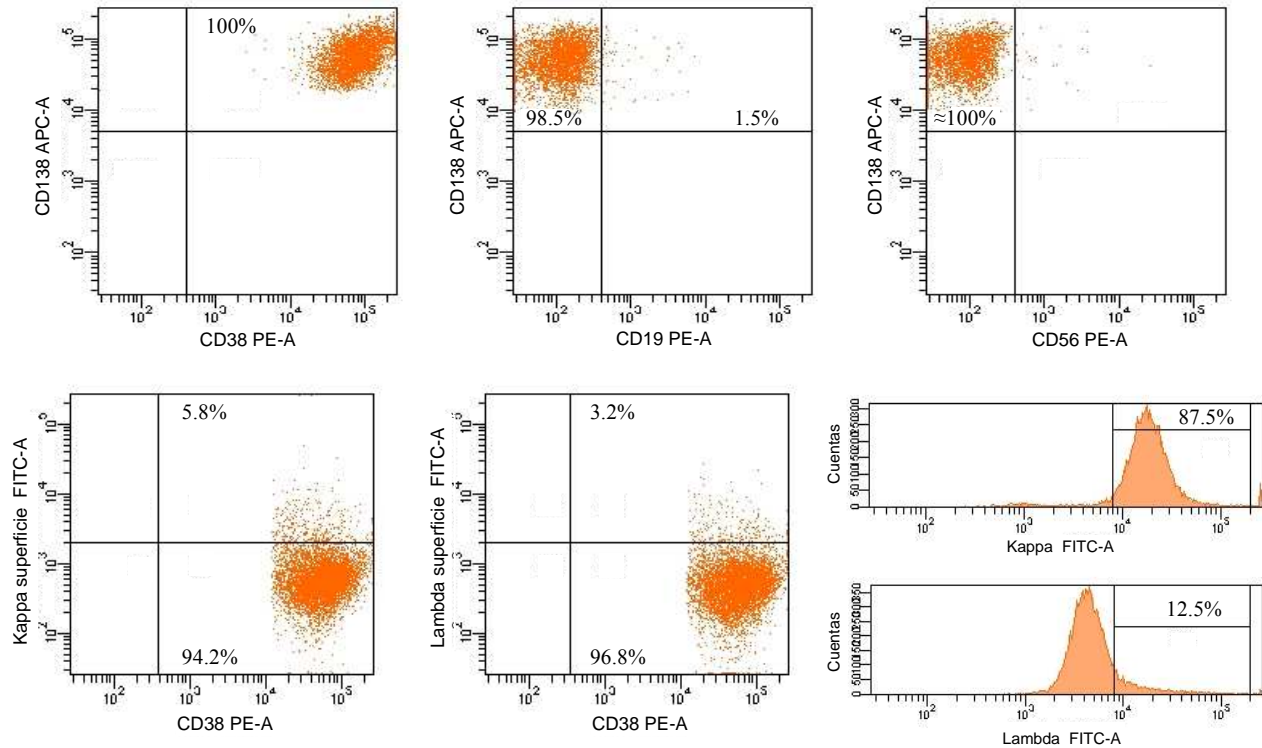


Figura 38. Perfil antigénico de las células tumorales en el linfoma de cavidades. Las células procedentes del líquido ascítico de la cavidad peritoneal se marcaron a 4°C con una combinación de AcMo donde los anticuerpos anti-CD138, anti-CD38 y anti-CD45 eran siempre añadidos, combinándolos con AcMo capaces de reconocer diferentes moléculas de adhesión u otro tipo de moléculas útiles para determinar la malignidad de la población. La expresión de cadenas ligeras *kappa* y *lambda* citoplásmicas se realizó previa permeabilización de las células.

Dado la peculiar localización de las células tumorales en los linfomas de cavidades, nos dispusimos a estudiar el patrón de expresión de las moléculas de adhesión, para así compararlo con el observado en las CP tumorales de MO de las gammopatías monoclonales. La tabla XV indica que, en lo que respecta a CD49d/CD29, el patrón de expresión fue muy similar al observado en pacientes con MM HUTS21. Por el contrario, las células linfomatosas de ambos pacientes sí que diferían en su expresión de CD44 y $\beta 7$ con respecto al que exhiben las CP del grueso de los pacientes con MM.

Tabla XV. Expresión de moléculas de adhesión en las CP del linfoma de cavidades		
Antígenos	Porcentaje de células positivas	
	Paciente 1 (LA)	Paciente 2 (LP)
CD29 (MAR4)	98.6%	100%
CD29 (HUTS21)	3%	3.2%
CD49d	99.5%	100%
Integrina $\beta 7$	8.2%	1.3%
CD44	20%	66.9%
CD11a	9%	22.4%
CD11b	22.5%	12.6%
CD11c	3.5%	2.3%

Tabla XV. Expresión de moléculas de adhesión en las CP tumorales de los dos pacientes estudiados con linfoma de cavidades. LA: líquido ascítico; LP: líquido pleural.

De igual forma a lo ya descrito con las CP de MO de los pacientes con MM HUTS21⁻, el peso molecular de la cadena CD29 de las CP tumorales en el linfoma de cavidades fue idéntica o muy similar al de las CP de MM HUTS21⁺, HUTS21⁻ o al de las CP normales de MO sana (figura 39).

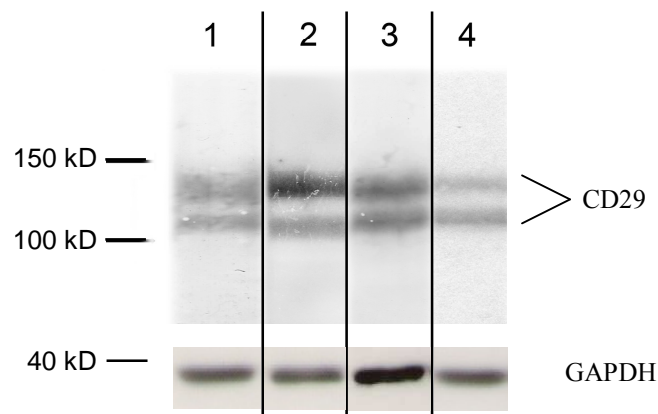


Figura 39. Imagen de inmunoblot comparando los perfiles electroforéticos de CP tumorales de pacientes con 1) MM HUTS21⁻, 2) MM HUTS21⁺, 3) linfoma de cavidades procedentes del líquido ascítico y 4) procedentes del líquido pleural. 1×10^6 CP purificadas fueron utilizadas en cada caso. La posición de los marcadores de peso molecular se muestra a la izquierda. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH (37kD).

La práctica total ausencia *in vivo* de la forma activa de la integrina CD29 nos indujo a realizar los ensayos de reactivación con Mn^{2+} . Tal y como muestra la figura 40, las células tumorales del linfoma de cavidades fueron totalmente refractarias al efecto inductor del Mn^{2+} . De igual manera fueron incapaces de expresar la forma de alta afinidad de CD29 cuando se incubaron con plasma alogénico de MO de controles sanos o de pacientes con MM HUTS21⁺ o con rsCD106 (datos no mostrados).

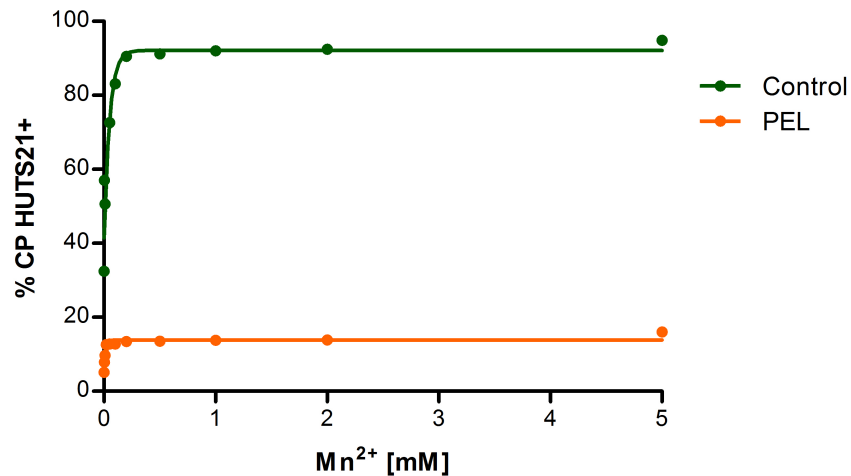


Figura 40. Efecto del Mn^{2+} en la activación de CD29 en CP de linfoma de cavidades. CP de individuos sanos y del linfoma de cavidades lavadas previamente, se incubaron con cantidades crecientes de Mn^{2+} . Las células se marcaron entonces con el AcMo CD29-PE, clon HUTS21, para comprobar el porcentaje de CP que expresaban CD29 en su forma activa. Se muestra un ejemplo representativo de 2 realizados en el caso del linfoma de cavidades.

Dada la expresión prácticamente nula de la forma activa de CD29 en estas células y su total refractariedad al efecto inductor por los factores solubles (Mn^{2+} y rs CD106), quisimos comprobar si la ausencia de adhesión en estas células conllevaba un aumento en la tasa de proliferación, como sucede en las CP de los pacientes con MM HUTS21⁺. Así, observamos que la fracción proliferante de la población tumoral era de un 7.2% en el linfoma de cavidades del líquido ascítico y de un 6.8% en el líquido pleural, porcentajes claramente aumentados con respecto a los observados tanto en CP normales como en pacientes con otras gammopatías monoclonales, a excepción de los pacientes con LCP.

En cuanto a la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, el porcentaje de expresión fue muy inferior a lo observado en pacientes con gammapatías monoclonales, tanto en MO como en SP: el 23.3% de las células del líquido ascítico y el 27.2% de las células del líquido pleural de los dos linfomas de cavidades expresaron esta proteína intracelular. La IMF a su vez también estuvo disminuida (1672 u.a. y 1490 u.a.). En lo que se refiere a la expresión de CD95, fue muy elevada en ambos pacientes (100% en los dos casos).

DISCUSIÓN

En un estudio previo, nuestro grupo describió que las CP de MO expresan la cadena común de las $\beta 1$ integrinas, la proteína de membrana CD29, en su forma activa o de alta afinidad, tanto en individuos normales como en la mayoría de los pacientes con gammapatías monoclonales. Por el contrario, las células linfoides y mieloides expresan la forma no activa, constitutiva o de baja afinidad de esta molécula (172). Sin embargo, en tal trabajo no se describieron los factores que regulan y mantienen activada la integrina en las CP, ni tampoco la posible ausencia de los mismos en aquellos pacientes cuyas CP tumorales no expresan CD29 en su forma activada.

Los resultados de este trabajo experimental demuestran que los factores que estimulan la expresión de la forma activa de CD29 en la membrana de las CP, determinada mediante el estudio de la expresión del epítipo de activación HUTS21, se corresponden con factores solubles contenidos en el plasma medular, pues la retirada del mismo condujo a la práctica desaparición de dicho epítipo. Y que tales factores se corresponden con cationes divalentes (Mn^{2+} y Mg^{2+}) y una forma soluble de CD106 (VCAM-1). Tal vez esta exquisita regulación sea el motivo por el que no está descrita en la literatura la expresión basal de la forma activa de CD29 en las CP de MO, pues la práctica totalidad de los estudios funcionales con estas células se han realizado tras la ejecución de un gradiente de densidad y/o de un proceso de purificación de estas células (175,176), procedimientos que, obviamente, conducen a la eliminación del plasma medular. En este sentido, el estudio de la expresión *ex vivo* de epítopos de activación como HUTS21, u otros parecidos, estaría sometido a un estricto control en el manejo de las muestras, a la manera en que ya se ha descrito en el estudio de epítopos fosforilados en diferentes proteínas, donde resulta imprescindible el manejo de SP o de MO completas (sin ningún tipo de manipulación), inmediatamente después de realizada la extracción y con un protocolo que incluya la fijación inmediata de la muestra con el fin de evitar fosforilaciones o defosforilaciones que alteren los resultados (177). Aunque en la detección del epítipo HUTS21 no es necesaria la fijación inmediata de las células, el almacenaje de la muestra, la utilización de EDTA (y no de heparina) en el tubo donde se extrae el aspirado de médula ósea o, como ya se ha citado, la realización de un gradiente, conducen a una drástica reducción de la expresión de la forma activa de la integrina (datos no mostrados).

Los ensayos en los que se añadía al plasma medular quelantes como el EDTA o cationes a las CP de MO previamente deplecionadas de su plasma autólogo, demostraron que los cationes divalentes del plasma medular estimulan la expresión de la forma activa de la integrina CD29 en las CP. Con gran diferencia, fue el Mn^{2+} el que mostró un efecto más potente, mientras que el Mg^{2+} también estimuló la expresión de HUTS21 aunque no con la magnitud del Mn^{2+} y necesitando además de cantidades mayores para conseguir tal efecto. El Ca^{2+} tuvo un efecto muy limitado y otros cationes divalentes tales como Zn^{2+} o Cu^{2+} no tuvieron efecto reseñable. Estos resultados son coherentes con la amplia literatura que describe el papel esencial que los cationes muestran en la conformación de las integrinas (51), en especial el Mn^{2+} (49), y en concreto en el cambio desde la forma inactiva hasta la forma activa de la integrina CD29. Dado que en la gran mayoría de las ocasiones estos estudios se han realizado con líneas celulares, a nuestro juicio esta es la primera ocasión en la que se describe conjuntamente la expresión y regulación de la forma activa de CD29 en células tumorales primarias y la utilización de un líquido biológico como fuente de los factores activantes, lo que confiere a nuestros hallazgos una gran relevancia en el campo de la fisiopatología humana. Un hallazgo interesante de nuestros experimentos fue la potente inducción que el Mn^{2+} ejerce en la activación de la integrina CD29, pues a concentraciones que oscilaban generalmente entre 0,05 mM y 0,1 mM, el epítipo HUTS21 se expresaba en el 85-100% de las CP. El Mg^{2+} , aunque efectivo, requería de una concentración 10-20 superior, cercana casi siempre a 1 mM, sin conseguir en ningún caso la expresión del epítipo en la totalidad de la población. Una primera aproximación a las concentraciones requeridas *in vitro* de Mn^{2+} y Mg^{2+} para activar CD29 podría plantear dudas respecto a la relevancia fisiológica del Mn^{2+} , pues las concentraciones de ambos cationes en el plasma medular son, según un estudio reciente, de 0,069 μ M (con un rango de 0,016 μ M a 0,224 μ M) y de 960 μ M (rango: 580-1392 μ M), respectivamente (49). Es decir, las cantidades de Mn^{2+} efectivas *in vitro* son, por término medio, 1000 veces superiores a las detectadas *in vivo*. Por el contrario, la cantidad de Mg^{2+} necesaria en los ensayos para llegar al máximo de activación se ajusta perfectamente a la concentración de este catión en el plasma de MO. Sin embargo, los experimentos realizados con rsCD106 como inductor de la activación de la integrina en las CP de MO rebaja la necesidad de Mn^{2+} a 0.005 mM, una cantidad que sí se ajusta a la concentración que alcanza este catión en el microambiente medular. Además, es necesario recordar que una cantidad abrumadora de los cationes divalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} y

Mn^{2+} son secuestrados en el hueso (178), de manera que en el proceso fisiológico de resorción ósea que se produce a menudo en estos pacientes es muy posible que, además de Ca^{2+} , se movilice Mn^{2+} en cantidades significativas. De hecho, se considera que la concentración de Mn^{2+} en la proximidad del osteoclasto se aproxima a 50 μM (179), es decir, una concentración próxima o muy similar a la de los ensayos *in vitro* que utilizan aisladamente el Mn^{2+} como único agente activante, concediendo al Mn^{2+} un posible papel relevante *in vivo* incluso en ausencia de rsCD106. Además, no es en absoluto descartable la cooperación entre ambos cationes, de manera que cantidades casi vestigiales de Mn^{2+} potencien el efecto del Mg^{2+} .

Como se acaba de citar en esta discusión, el otro factor contenido en el plasma de MO capaz de activar la integrina CD49d/CD29 fue uno de los dos ligandos esenciales de esta integrina, la molécula CD106 (en concreto una forma soluble de la misma). La molécula CD106 es una molécula de adhesión bien representada en MO, pues son varios los tipos celulares que la expresan (58). Además, la presencia de una forma soluble de CD106, posiblemente procedente de la proteólisis del CD106 de membrana, es un hallazgo común en diferentes líquidos biológicos (180). De hecho, la cantidad de CD106 soluble recombinante necesario en nuestros ensayos para activar CD29 se ajusta a las concentraciones de sCD106 contenido en dichos fluidos. Estos datos reafirman la relevancia fisiopatológica de CD106 como regulador de la activación de la integrina CD29 en CP normales y malignas de MO. De hecho, es bien sabido por diversos estudios experimentales que la activación de muy diferentes integrinas es dependiente de sus ligandos (181). Es necesario resaltar igualmente que el efecto *in vitro* mediado por la molécula recombinante soluble de CD106 requirió de la presencia en el medio de ensayo de cationes, abundando en lo descrito en la literatura científica: la evidencia del acoplamiento de la unión del ligando y de los cationes divalentes a la integrina CD49d/CD29 (182). Contrariamente al efecto inductor de CD106, el otro ligando de la molécula CD49d/CD29, la FN, una proteína de la matriz extracelular de la MO y de otros territorios, no activó significativamente a esta integrina. El hecho de que el dominio de la integrina que reconoce FN sea distinto al que reconoce CD106 (63) puede ser uno de los motivos, pues aunque el epítipo HUTS21 es expuesto tanto tras la unión a CD106 como tras la unión a FN en otros tipos celulares, es posible que la distinta afinidad con la que se reconocen ambos ligandos pueda explicar su efecto diferencial en la expresión de la forma activa de CD29 en las CP.

Otros factores descritos en la bibliografía como activantes de la molécula CD49d/CD29 en las células de MM, estimulando la adhesión a FN, tales como el SDF-1 α (183,184), no tuvieron efecto en nuestro sistema. Tampoco lo tuvieron factores como el IGF-I (185) o el HGF (186) (datos no mostrados). Es cierto que en estos trabajos el efecto no se determinaba estudiando la expresión del epítipo HUTS21, sino, como se ha citado, comprobando mediante un estudio funcional el aumento de adhesión a FN. Sin embargo, no parece ser esta la razón de la discrepancia puesto que, como hemos comprobado, la correlación entre una clara expresión del epítipo y una clara adhesión a FN es más que evidente. Una vez más, la explicación podría residir en que los trabajos antes citados son realizados sobre todo con líneas celulares de MM. De hecho, aunque el SDF-1 α ha demostrado activar la integrina CD49d/CD29 no solo en células de MM sino también en otros tipos celulares (187, 188), datos más recientes indican que tal efecto es muy pobre cuando se utilizan células primarias de MM (189). Por otro lado, el efecto de SDF-1 α y de otros factores solubles en la adhesión a FN mediada por CD49d/CD29 suelen ser muy rápidos y poco persistentes, y los ensayos referidos en estos trabajos así lo indican. Por el contrario, parece evidente que la expresión de CD29 activado es permanente y esencial para la retención de las CP, normales o tumorales, en la MO, por lo que parece más apropiado que un factor como el Mn²⁺ sea capaz de mantener activada la integrina de manera persistente. En este sentido, un reciente trabajo ha demostrado que el Mn²⁺ regula la adhesión de las células de MM a FN de forma diferente que las citoquinas SDF-1 α , HGF e IGF-1 (49). Y, aún con más precisión, utilizando para ello la línea celular U937 (190), se ha demostrado que, en ausencia de ligando, la activación de la integrina por SDF-1 α no expone el epítipo HUTS21 en la membrana de estas células. Por el contrario, sin previa activación, la mera ocupación por el ligando del dominio de la integrina habilitado para tal fin fue suficiente para inducir la expresión de este epítipo. Por lo tanto, tanto nuestros resultados como los mencionados en la literatura científica apoyan la existencia de múltiples estados conformacionales de la integrina regulados independientemente por la unión externa de cationes y/o ligandos (vía *outside-in*) o por vías de señalización intracelulares (vía *inside-out*). La contribución de una y otra en la retención de las CP (normales o tumorales) al microambiente medular es difícil de cuantificar. Muy probablemente ambas son complementarias, aunque la permanente expresión *in vivo* del epítipo HUTS21 en la membrana de las CP y el rápido pero poco duradero efecto que

tradicionalmente se asocia a las quimioquinas (191), parecen conceder un papel más relevante al mecanismo regulatorio descrito en este trabajo.

Un hallazgo muy interesante de nuestro trabajo es la detección de un grupo minoritario de pacientes con MM cuyas CP expresan niveles disminuidos o prácticamente inexistentes de la integrina activada (pacientes HUTS21⁻). Esta desaparición parcial o total de HUTS21 en la membrana de las CP no fue debida a la ausencia de factores estimulantes en el plasma medular de este grupo de enfermos, pues este mismo plasma estimulaba la reexpresión del epítipo en el grupo de pacientes HUTS21⁺. Por lo tanto y al contrario de lo descrito en otros tipos celulares donde cambios bruscos en la concentración de cationes en el microambiente, como el Mg²⁺ o el Ca²⁺, inducen un fenotipo tumoral en las células que se asientan en él, tal como sucede con el jugo pancreático y las células pancreáticas (192), las células mielomatosas experimentan este cambio fenotípico por un mecanismo independiente de los niveles de cationes en su microambiente. De hecho, nuestros resultados experimentales indican que la pérdida *in vivo* del epítipo HUTS21 correlacionaba con una falta de respuesta *in vitro* de las CP HUTS21⁻, tanto tras la adición exógena de plasma alogénico procedente de MO normales o procedentes de pacientes HUTS21⁺, como tras la adición de Mn²⁺ y/o sCD106. La imposibilidad de activar CD29 en estos pacientes no fue debida a cambios estructurales detectables en los ensayos de western-blot, pues estos indicaban que las CP de los pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻ expresaban especies indistinguibles de CD29, con pesos moleculares aparentemente idénticos, tanto de la forma madura como de la forma precursora. Estos datos sugieren que no hay alteraciones post-transduccionales en la cadena CD29 de los pacientes HUTS21⁻ con respecto a los pacientes HUTS21⁺, pues el grado de glicosilación de una y otra especie parece idéntico en ambos grupos. Este hallazgo es fundamental dada la importancia que la glicosilación tiene en la función biológica de la molécula CD29 (193), así como en el transporte de CD29 desde el aparato de Golgi a la membrana citoplásmica (61). De hecho, las alteraciones en la glicosilación de CD29 ha sido descrita como un factor esencial en la progresión de diferentes tumores (194). Como se ha descrito en nuestros resultados, casi todos los pacientes HUTS21⁻ expresaron en sus CP una cantidad disminuida de CD29 total (CD29 independiente del grado de activación) con respecto a las CP de los pacientes HUTS21⁺ o de individuos sanos. Tal disminución era prácticamente idéntica independientemente del AcMo anti-CD29 utilizado, de manera que los clones 4B4 (que

reconoce un epítopo entre los aminoácidos 207-218), K20 (que reconoce un epítopo situado entre los residuos 426-487), JB1A (entre los residuos 82-87) o los clones MAR4 y P5D2 (que reconocen otros epítopos en la parte extracelular de CD29), dieron porcentajes de disminución muy similares en la señal emitida en el citómetro con respecto a la CP “estándar” (presente en pacientes HUTS21⁺ y en individuos sanos), dato que sugiere fuertemente que en los pacientes HUTS21⁻ se sintetiza una menor cantidad de proteína CD29, probablemente por una regulación transcripcional diferente a la que se ejerce en las CP HUTS21⁺. Aunque en otros tipos celulares, tales como los queratinocitos, se han descrito los mecanismos que regulan la expresión de CD29 en las diferentes etapas madurativas de estas células, incluida la transcripción génica (195), nada ha sido descrito en lo que respecta a los factores que regulan la expresión de CD29 en la serie linfocítica B, incluyendo las CP. Obviamente, no puede descartarse que los pacientes HUTS21⁻ tengan mutaciones puntuales en CD29 que alteren mínimamente la secuencia aminoacídica de la molécula entre los residuos 355-425 que impidan su reconocimiento por el AcMo HUTS21 (196) y su activación mediada por sCD106 y cationes (o por el plasma medular). De hecho, tales mutaciones han sido descritas previamente en algunos tumores sólidos en humanos (197). En estos carcinomas de células escamosas, la mutación descrita es activante, lo que confiere a la molécula CD29 una capacidad constante para unir con gran afinidad sus ligandos. Aunque se han generado *in vitro* tanto mutaciones activantes como inactivantes de CD29 (198), hasta el momento no se han descrito mutaciones en tumores humanos de origen hematopoyético que afecten la capacidad de CD29 para activarse en presencia de cationes. De hecho, los pacientes con deficiencia de adhesión leucocitaria, en sus variantes II y III, muestran bien un defecto en la capacidad de CD29 para activarse, bien una incapacidad para formar “clusters” en la membrana para así incrementar la avidéz por los ligandos (199), que no están mediados, en ningún caso, por mutaciones en el gen de CD29. Hasta ahora, además, el único polimorfismo descrito que afecta a la porción codificante del gen CD29, detectado en algún paciente con esta deficiencia de adhesión, traduce una proteína por completo funcional (200). En este sentido y hasta el momento, parece evidente que la frecuencia con que muta el gen CD29 es claramente inferior al descrito para el gen CD18. Y, de igual manera, los escasos polimorfismos descritos no parecen contribuir a la expresión mayor o menor de esta proteína en la membrana, tal y como se ha descrito en integrinas tales como CD61 (cadena común β 3) (201) o CD49b (cadena α 2) (202). Por lo tanto, la ausencia de mutaciones o polimorfismos en la práctica

totalidad de los modelos patológicos y/o tumorales estudiados hasta el momento indica probablemente que las alteraciones en este gen no contribuyen a variantes fenotípicas o de densidad de la proteína CD29.

A tenor de nuestros resultados y a nuestro juicio, la falta de respuesta a los factores reguladores podría ser explicada por la posible relación existente entre la densidad de la integrina, es decir, el número de moléculas de CD29 en la membrana, y su capacidad de activación, de manera que un descenso en el número de copias de la integrina en las CP de los pacientes HUTS21⁻ dificultaría el cambio conformacional en la molécula CD29 desde su estado inactivo hasta su estado de alta afinidad. De hecho, Constantin et al. demuestran que, en el caso de las integrinas, prevalece un aumento de afinidad o de avidéz dependiendo en cierta medida de los niveles de expresión de la integrina en la célula y también de la densidad del ligando (203). Quizá este sea el motivo por el que las series linfoide, monocitoide y mieloide de la MO, con un número de copias de CD29 en sus membranas manifiestamente inferior al de las CP, no expresen *in vivo* esta integrina en su forma activa y que, a su vez, requieran para su activación *in vitro* una concentración de Mn²⁺ o Mg²⁺ claramente superiores. Aunque es cierto que estas poblaciones de MO con una densidad de CD29 equivalente a la mostrada por las HUTS21⁻ son capaces de activar la integrina a concentraciones que sin embargo son insuficientes en las células malignas de este grupo de pacientes, es probable que entonces opere el mecanismo, ya descrito, por el cual la activación de las integrinas puede ser muy distinta dependiendo del tipo celular del que se trate (204).

Otro hallazgo muy interesante de nuestros resultados fue que un porcentaje significativo de pacientes con CP HUTS21⁻ y, por lo tanto, con una cantidad de CD29 total disminuido, expresaron la cadena CD49d (la cadena $\alpha 4$ unida prácticamente en exclusiva a la cadena CD29 en las CP de MO) en cantidades elevadas y muy similares a las de las CP de los pacientes HUTS21⁺. En este grupo de pacientes, las CP HUTS21⁻ expresaron la cadena $\beta 7$ en niveles muy superiores a los habituales. Dado que CD49d (la cadena $\alpha 4$) puede unirse bien a CD29 o a $\beta 7$ (205), no es arriesgado suponer que, en ciertos casos, un mecanismo compensatorio parece dotar a las CP con CD29 disminuido de una mayor cantidad de $\beta 7$ en sus membranas. Un mecanismo compensatorio en apariencia similar se ha descrito recientemente en células T CD4⁺, donde la unión de $\beta 1$ domina sobre $\beta 7$ en lo que se refiere a la unión a la cadena $\alpha 4$ (206), de forma que solo

bajo ciertas condiciones la cadena $\beta 7$ se convierte en mayoritaria. En cualquier caso, el aumento en la expresión de $\beta 7$ y de CD49d en este subgrupo de pacientes HUTS21⁻ no modificó el comportamiento de estas células ni en lo que se refiere a una adhesión muy disminuida a FN ni tampoco en lo que se refiere a la presencia de CP circulantes, un hallazgo esperable teniendo en cuenta que la unión a los ligandos de CD49d/CD29 y de CD49d/ $\beta 7$ se encuentra regulada por factores solubles muy distintos. De hecho, la unión de CD49d/ $\beta 7$ a su ligando MAdCAM-1 se encuentra regulada por quimioquinas escasamente representadas en el microambiente medular (207).

La división en pacientes HUTS21⁺ y HUTS21⁻ también pudo realizarse en el MGUS, la fase premaligna de las gammopatías monoclonales y un modelo inmejorable para el estudio paralelo de CP clonales y de las CP normales con las que coexisten. En nuestro caso, una forma excelente de demostrar que el mismo microambiente medular es capaz de mantener niveles de CD29 activado completamente normales en las CP policlonales mientras que es incapaz de hacerlo con las CP clonales en 1/3 de los pacientes con MGUS (MGUS HUTS21⁻). Además, este resultado reafirma la idea de que la gran mayoría de las alteraciones genéticas, bioquímicas e inmunológicas de las CP ya se encuentran en las CP tumorales del MGUS (59,104). En todo caso, cabría preguntarse si la ausencia de la integrina activada en este grupo de pacientes con MGUS puede relacionarse o no con una progresión más rápida a MM. En otras palabras, si la no expresión de la forma activa de CD29 en las CP clonales en pacientes con MGUS puede considerarse un factor de mal pronóstico. Los motivos por los que de momento no es posible responder a esta pregunta son los mismos por los que aún no podemos conocer si los MM HUTS21⁻ tienen peor pronóstico que los MM HUTS21⁺: se necesita un tiempo de seguimiento mayor y, posiblemente, de un mayor número de casos.

Algunos de los resultados de nuestro trabajo, sin embargo abonan la idea, siquiera de forma indirecta, de que la ausencia de la forma activa de CD29 en la membrana de las CP tumorales pueda estar relacionada con una peor evolución de la enfermedad. Sin duda, entre ellos destaca aquel que indica no solo un mayor porcentaje de CP circulantes en los pacientes con MM HUTS21⁻ con respecto a los pacientes HUTS21⁺, sino también que en todos los pacientes con MM HUTS21⁻ se detectaron estas células, mientras que solo fueron detectables en una fracción de pacientes HUTS21⁺. La salida favorecida a la SP parece una consecuencia lógica habida cuenta de

la menor o inexistente adhesión a la FN de las CP HUTS21⁻ en nuestros ensayos de adhesión *in vitro*, en especial en los casos de enfermos con LCP. Como bien se sabe, la detección de CP circulantes en gammapatías monoclonales es un hallazgo bien sabido y relativamente común cuando se utiliza la citometría de flujo para tal fin (208) y, recientemente, se ha demostrado que a mayor número de CP circulantes, menor supervivencia de los pacientes con esta enfermedad (209). Dada la clara correlación existente entre la pérdida de la integrina activa en la membrana de las CP y la salida a SP, parece probable que la ausencia de CD29 activado sea un factor de mal pronóstico en esta enfermedad.

Por otro lado, es bien conocida la influencia que las integrinas tienen no solo en la adhesión a diferentes sustratos, sino también en la proliferación y apoptosis celulares (210). Con respecto a no pocos procesos tumorales, el MM es un tumor muy poco proliferante, incluso en etapas avanzadas de la enfermedad (211). En la regulación de la proliferación de las CP malignas parecen intervenir proteínas tales como ciclinas (212) o proteín-quinasas (213), aunque estudios más recientes sugieren un perfil mucho más complejo (214). A nuestro entender, aún no se ha establecido una correlación entre la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad proliferativa de las células en el MM. En este sentido, resulta de gran interés que las CP malignas HUTS21⁻ mostraran un índice proliferativo significativamente mayor que las CP HUTS21⁺. Es probable que en las CP malignas pueda operar un mecanismo de control de la proliferación dependiente de adhesión a sustrato similar al descrito en otros modelos (215), de manera que la deadhesión conduzca a un aumento de la fracción celular proliferante. Además, y también de forma indirecta como en el caso de las CP circulantes, estos hallazgos sugieren que la pérdida de la forma activa de la integrina es un dato de posible mal pronóstico, pues es bien sabido que el aumento del índice proliferativo se encuentra asociado a la progresión de la enfermedad (216).

Imbricado con el incremento de la proliferación celular, es bien sabido que la pérdida del anclaje de células normales o tumorales a su microambiente puede inducir la apoptosis de las mismas (217). Frish & Francis denominaron anoikis a esta modalidad de muerte celular programada que resulta de la pérdida completa de unión al sustrato de la matriz extracelular (218). En un primer término, nuestros resultados demuestran que las CP malignas, tanto de MGUS como de MM, mostraron niveles de expresión de la

proteína anti-apoptótica Bcl-2 superiores a los observados en CP normales. Este hallazgo ha sido ya previamente observado en trabajos previos (219, 220). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que las CP HUTS21⁻, caracterizadas por la pérdida total o parcial de unión a FN, expresaron niveles de Bcl-2 significativamente disminuidos con respecto a las CP malignas HUTS21⁺. Como es bien sabido, Bcl-2 no solo es una proteína relacionada con la supervivencia de las células (167), sino que también influye de forma importante en el ciclo celular (221). Por lo tanto, de nuevo el déficit de activación de la integrina se asocia a características esenciales de la biología de la CP maligna, en este caso por su asociación con la mayor o menor expresión de Bcl-2. Otra proteína, en este caso la molécula pro-apóptótica CD95, manifestó expresiones diferenciales en CP normales y malignas, siendo inferior en estas con respecto a las primeras. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de CD95 entre los dos grupos de pacientes, quizá reafirmando el papel secundario que esta proteína tiene en la apoptosis de las CP en MM, salvo excepciones (165), quizá subsidiario de TRAIL, probablemente la proteína más claramente relacionada con la muerte celular en CP malignas (162).

Otros dos modelos patológicos de acumulación de CP se han estudiado en esta tesis. El primero de ellos, las plasmocitosis reactivas, ha sido también evaluado en muestras de MO, en este caso de pacientes con diferentes patologías no tumorales (infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes, etc) (222). El comportamiento de las CP policlonales imitó en cierta medida al mostrado por las CP de pacientes HUTS21⁻, pues mostraron un mayor índice proliferativo que las CP de MO sin plasmocitosis, así como un descenso en la expresión de Bcl-2, un hallazgo ya publicado en algunos trabajos (219), y, por lo general, un aumento en la expresión de CD95. De esta manera, el aumento de la fracción celular en división se vería contrarrestada por un descenso en la viabilidad de las CP, para así mantener a la población en equilibrio en un proceso que, en cualquier caso, es policlonal. De nuevo, lo más sobresaliente fue nuestro hallazgo de que las CP en las plasmocitosis reactivas muestran un moderado descenso en la expresión de la forma activa de CD29. Sin embargo, estas células tuvieron una respuesta *in vitro* por completo normal a los factores estimulantes, de manera que reexpresaron la forma activa de la integrina tras la adición de cationes o rsCD106, lo que marcaba ya una primera diferencia significativa con respecto a las CP malignas HUTS21⁻. Es muy posible, además, que este descenso en la expresión de la forma activa

de la integrina sea responsable, al menos en parte, de la frecuente aparición de CP en la sangre periférica de algunos pacientes con plasmocitosis y enfermedades autoinmunes (223). Estos resultados parecen indicar que, en procesos reactivos, la expansión transitoria de CP en MO está mediada por mecanismos que imitan en cierta medida lo visto en la última y más agresiva fase del MM, la LCP, salvo, como cabía esperar, por la reversibilidad de estas alteraciones en las plasmocitosis, en contraposición a su naturaleza permanente en el caso de las células tumorales de la LCP.

El segundo modelo se corresponde con otro proceso tumoral en el que las células malignas se sitúan en territorios distintos a la MO: el linfoma de cavidades. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia en distintas cavidades del organismo (cavidad pleural y abdominal, en la mayoría de las ocasiones) de células con características fenotípicas y, en menor medida, de rasgos citológicos compatibles con células plasmáticas malignas (87). El modelo es muy interesante en lo que se refiere a la adhesión celular, pues las células crecen en un medio líquido sin que, aparentemente, infiltren los tejidos adyacentes (79). Esta propiedad fue compatible con el hallazgo de que las células fueran negativas en su totalidad para el epítipo HUTS21. Más importante aún, fueron por completo refractarias a la inducción del epítipo con los factores estimulantes utilizados. Y al igual que en las CP malignas HUTS21⁻ de MO, en las células malignas del linfoma de cavidades el peso molecular de la forma madura y precursora de CD29 y la contribución relativa de cada isoforma al CD29 total no difería del observado en CP normales de MO o en las CP malignas de pacientes HUTS21⁺, descartando la posibilidad de un patrón de glicosilación significativamente distinto. Muy posiblemente el nivel disminuido de CD29 en membrana sea de nuevo la razón que explique la refractariedad en la respuesta a cationes divalentes. Por otro lado, en estas células se reprodujo el modelo descrito para toda aquella CP no capaz de activar la integrina CD29: las células mostraron características de células proliferantes y con mayor susceptibilidad a la apoptosis. Las similitudes con las CP malignas de los pacientes con LCP son muy evidentes: incapacidad de adhesión y permanencia en un medio líquido, en contraposición con las CP de MO.

En resumen, nuestro trabajo pone de manifiesto que las CP de MO, tanto normales como malignas en la mayoría de los pacientes con gammapatías monoclonales, expresan la forma activa de la integrina CD29, regulada por los cationes de Mn^{2+} y el CD106 soluble contenidos en el plasma medular. La pérdida irreversible de la expresión de la forma de alta afinidad de CD29, además, se asoció, por un lado, a factores de mal pronóstico en el caso del MM y, por otro, a patologías con un alto grado de malignidad, como el linfoma de cavidades.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación son las siguientes:

1. Un porcentaje elevado de las CP normales de MO de individuos sanos y de las CP malignas de MO de una mayoría de pacientes con MM expresan la integrina CD29 en su forma activa.
2. Los pacientes con MM pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a la expresión diferencial de las formas activa y constitutiva de la integrina CD29: los enfermos HUTS21⁺ exhiben una expresión normal de las dos formas de la integrina, mientras que los enfermos HUTS21⁻ presentan unos niveles de la integrina activada significativamente disminuidos, con una disminución concomitante en la densidad de expresión de CD29 constitutivo. Esta división es aplicable a las CP tumorales de pacientes con MGUS.
3. Un grupo de pacientes con CP HUTS21⁻ y pérdida cuantitativa de CD29 expresaron altos niveles de la integrina $\beta 7$.
4. La regulación de la forma activa de CD29 es llevada a cabo por dos factores contenidos en el plasma medular: los cationes divalentes y la forma soluble de CD106. El Mn²⁺ fue el catión con mayor capacidad activante por sí solo. Además, ambos factores cooperan para activar CD29.
5. La pérdida total o parcial de la expresión *in vivo* de la forma activa de CD29 se correlacionó con la imposibilidad *in vitro* de estimular CD29 con los cationes de Mn²⁺ y CD106 soluble.
6. La disminución de la expresión de la forma activa de CD29 se correlacionó con una capacidad disminuida de las CP para unirse a FN.
7. Las CP de las plasmocitosis reactivas muestran una disminución notable de la forma activa de la integrina, aunque respondieron a la activación *in vitro* de la misma, reafirmando la naturaleza transitoria de este proceso.

8. La pérdida *in vivo* de CD29 activado en las CP tumorales de MO en pacientes con MM HSTS21⁻ no es debida a cambios estructurales de la integrina ni a la ausencia o disminución de Mn²⁺ o CD106 en el plasma medular.
9. La pérdida de CD29 activado en la membrana de las CP se correlacionó con una salida favorecida de CP tumorales a la sangre periférica.
10. Se puede establecer una asociación entre la pérdida en la expresión de la forma activa de CD29 y una mayor capacidad proliferativa de las CP, así como con cambios en la expresión de moléculas implicadas en la supervivencia de las células.
11. Las CP de los linfomas de cavidades muestran alteraciones idénticas a las observadas en las CP de la LCP, un hallazgo que puede explicar el crecimiento de estas células en un medio líquido debido a su incapacidad para adherirse a los ligandos de CD29.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía de referencia por orden de citación:

1. G.S. Travlos. Normal structure, function and histology of the bone marrow. *Toxicologic Pathology*, 2006, 34:548-565.
2. Z.L. Whichard, C.A. Sarkar, M. Kimmel and S.J. Corey. Hematopoiesis and its disorders: a systems biology approach. *Blood*, 2010, 115(12):2339-2347.
3. V. Bottero, S. Withoff and I.M. Verma. NF- κ B and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13:785–797.
4. T.M. Fliedner, D. Graessle, C. Paulsen and K. Reimers. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2002, 17(4): 405-245.
5. M.A. Horton. Interactions of connective tissue cells with the extracellular matrix. *Bone*, 1995, 17 (2 Suppl):51S-53S.
6. J. Takagi. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp) dependent integrins. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32 (Pt3):403-406.
7. P. Dasari, I.C. Nicholson, G. Hodge, G.W Dandie and H. Zola. Expression of toll-like receptor on B lymphocytes. *Cellular Immunology*, 2005, 236:140-145.
8. N.L. Bernasconi, N. Onai and A. Lanzavecchia. A role for Toll-Like Receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, 2003, 101:4500-4504.
9. I.B. Bekeredjian-Ding, M. Wagner, V. Hornung, T. Giese, M. Schnurr, S. Endres and G. Hartmann. Plasmacytoid dendritic cells control TLR-7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *Journal of Immunology*, 2005; 174:4043-4050.
10. K. Ozaki, R. Spolski, R. Ettinger, H.P. Kim, G. Wang, C.F. Qi, P. Hwu, D.J. Shaffer, S. Akilesh, D.C. Roopenian, H.C. Morse, P.E. Lipsky and W.J. Leonard. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of Immunology*, 2004, 173: 5361-5371.

11. S. Kuchen, R. Robbins, G.P. Sims, C. Sheng, T.M. Phillips, P.E. Lipsky and R. Ettinger. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration. *Journal of Immunology*, 2007, 179:5886-5896.
12. I.C. MacLennan. Germinal centers still hold secrets. *Immunity*, 2005, 22:656-657.
13. A. Radbruch, G. Muehlinghaus, E.O. Luger, A. Inamine, K.G.C. Smith, T. Dörner and F. Hiepe. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews Immunology*, 2006, 6(10):741-750.
14. O. Pabst, T. Peters, N. Czeloth, G. Bernhardt, K. Scharffetter-Kochanek and R. Förster. Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta2 integrin. *Journal of Immunology*, 2005, 174 (2):7492-7495.
15. P. Brandtzaeg and F.E. Johansen. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunological Reviews*, 2005, 206:32-63.
16. G. Muehlinghaus, L. Cigliano, S. Huehn, A. Peddinghaus, H. Leyendeckers, A.E. Hauser, F. Hiepe, A. Radbruch, S. Arce and R.A. Manz. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood*, 2005, 105:3965-3971.
17. R.A. Manz and A. Radbruch. Plasma cells for a lifetime?. *European Journal of Immunology*, 2002, 32:923-927.
18. E.J. Kunkel and E.C. Butcher. Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3:822-829.
19. Y. Gazitt and C. Akay. Mobilization of myeloma cells involves SDF-1/CXCR4 signalling and downregulation of VLA-4. *Stem Cells*, 2004, 22:65-73.
20. D.C. Hargreaves, P.L. Hyman, T.T. Lu, V.N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, Y.R. Zou, D.R. Littman and J.G. Cyster. A coordinated change in chemokine

- responsiveness guides plasma cell movements. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194(1):45-56.
21. K. Tokoyoda, T. Egawa, T. Sugiyama, B.I. Choi and T. Nagasawa. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity*, 2004, 20:707-718.
 22. H.E. Mei, T. Yoshida, W. Sime, F. Hiepe, K. Thiele, R.A. Manz, A. Radbruch and T. Dörner. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood*, 2009, 113(11):2461-2469.
 23. H.A. Minges-Wols, G.H. Underhill, G.S. Kansas and P.L. White. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *Journal of Immunology*, 2002, 169:4213-4221.
 24. M.K. Slifka and R. Ahmed. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10:252-258.
 25. K.I. Lin, C. Tunyaplin and K. Calame. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunological Reviews*, 2003, 194:19-28.
 26. J. Liu and G. Jiang. CD44 and hematologic malignancies. *Immunology*, 2006, 3(5):359-365.
 27. G. Borland, J.A. Ross and K. Guy. Forms and functions of CD44. *Immunology*, 1998, 93:139-148.
 28. W. Eisterer, O. Bechter, W. Hilbe, M. van Driel, H.M. Lokhorst, J. Thaler, A.C. Bloem, U. Günthert and R. Stauder. CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Leukemia Research*, 2001, 25(12):1051-1057.
 29. C. Huang and T.A. Springer. A binding interface on the I domain of lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with

- intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(32): 19008-19016.
30. Y. Takada, X. Ye and S. Simon. The integrins. *Genome Biology*, 2007, 8:215.
 31. M. Sixt, M. Bauer, T. Lämmermann and R. Fässler. β 1 integrins: zip codes and signalling relay for blood cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18:482-490.
 32. J.D. Humphries, A. Byron and M.J. Humphries. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(19):3901-3903.
 33. P.S. Frenette and D.D. Wagner. Adhesion molecules--Part 1. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334(23):1526-1529.
 34. C. Brakebusch, E. Hirsch, A. Potocnik and R. Fässler. Genetic analysis of β 1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *Journal of Cell Science*, 1997, 110:2895-2904.
 35. C. Pujades, R. Alon, R.L. Yauch, A. Masumoto, L.C. Burkly, C. Chen, T.A. Springer, R.R. Lobb and M.E. Hemler. Defining extracellular integrin α -chain sites that affect cell adhesion strengthening without altering soluble ligand binding. *Molecular Biology of the Cell*, 1997, 8(12):2647-2657.
 36. J. Gu and N. Taniguchi. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 21(1-2):9-15.
 37. M. J. Humphries, P.A. McEwan, S.J. Barton, P.A. Buckley, J. Bella and A. P. Mould. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2003, 28(6):313-320.
 38. M.J. Humphries. Insights into integrin-ligand binding and activation from the first crystal structure. *Arthritis Research*, 2002, 4(3):S69-S78.
 39. J. Solowska, J.M. Edelman, S.M. Albelda and C.A. Buck. Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin β 1 and β 3 subunits are functionally interchangeable. *The Journal of Cell Biology*, 1991, 114(5):1079-1088.

40. A. van der Flier, I. Kuikman, C. Baudoin, R. van der Neut and A. Sonnenberg. A novel $\beta 1$ integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle. *FEBS Letters*, 1995, 369:340-344.
41. F. Balzac, S.F. Retta, A. Albin, A. Melchiorri, V.E. Kotliansky, M. Geuna, L. Silengo and G. Tarone. Expression of $\beta 1B$ integrin isoform in CHO cells results in a dominant negative effect on cell adhesion and motility. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 121:171-178.
42. L. Moro, E. Perlino, E. Marra, L.R. Languino and M. Greco. Regulation of $\beta 1C$ and $\beta 1A$ Integrin Expression in Prostate Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(3):1692-1702.
43. D.M. Rose. The role of the $\alpha 4$ integrin-paxillin interaction in regulating leukocyte trafficking. *Experimental and Molecular Medicine*, 2006, 38(3):191-195.
44. A. Armmulik, T. Velling and S. Johansson. The integrin $\beta 1$ subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15:2558-2567.
45. C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini and J. A. Varner. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(8):604-617.
46. Y. Pylayeva and F.G. Giancotti. Development requires activation but not phosphorylation of $\beta 1$ integrins. *Genes and Development*, 2006, 20:1057-1060.
47. J. Takagi. Structural basis for ligand recognition by integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007, 19:557-564.
48. B.G. Petrich. Talin-dependent integrin signalling in vivo. *Thrombosis And Haemostasis*, 2009, 101(6):1020-1024.
49. T.S. Slørdahl, H. Hov, R.U. Holt, V. Baykov, T. Syversen, A. Sundan, A. Waage and M. Børset. Mn^{2+} regulates myeloma cell adhesion differently than

- the proadhesive cytokines HGF, IGF-1, and SDF-1 α . *European Journal of Haematology*, 2008, 81:437-447.
50. M. Stewart and N. Hogg. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1996, 61:554-561.
51. L.L. Chen, R.R. Lobb, J.H. Cuervo, K.C. Lin, S.P. Adams and R.B. Pepinsky. Identification of ligand binding sites on integrin $\alpha 4\beta 1$ through chemical cross-linking. *Biochemistry*, 1998, 37:8743-8753.
52. A. Chigaev, G. Zwartz, S.W. Graves, D.C. Dwyer, H. Tsuji, T.D. Foutz, B.S. Edwards, E.R. Prossnitz, R.S. Larson and L.A. Sklar. $\alpha 4\beta 1$ integrin affinity changes govern cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (40):38174-38182.
53. B. Leitinger and N. Hogg. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *Journal of Cell Science*, 2002, 115(5):963-972.
54. I. Gombos, Z. Bacso, C. Detre, H. Nagy, K. Goda, M. Andrasfalvy, G. Szabo and J. Matko. Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins. *Cytometry Part A*, 2004, 61A:117-126.
55. J. Takagi, K. Strokovich, T.A. Springer and T. Walz. Structure of integrin $\alpha 5\beta 1$ in complex with fibronectin. *The EMBO Journal*, 2003, 22(18):4607-615.
56. H. Ni, A. Li, N. Simonsen and J.A. Wilkins. Integrin activation by dithiothreitol or Mn^{2+} induces a ligand-occupied conformation and exposure of a novel NH_2 -terminal regulatory site on the $\beta 1$ integrin chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(14):7981-7987.
57. M. Zheng and S.I. Hakomori. Soluble fibronectin interaction with cell surface and extracellular matrix is mediated by carbohydrate-to-carbohydrate interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 374(1):93-99.

58. Y.F. Xia, L.P. Liu, C.P. Zhong and J.G. Geng. NF- κ B activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289:851-856.
59. T. Kamata, W. Puzon and Y. Takada. Identification of putative ligand-binding sites of the integrin α 4 β 1 (VLA-4, CD49d/CD29). *Biochemical Journal*, 1995, 305:945-951.
60. C. Wu, V.M. Keivens, T.E. O'Toole, J.A. McDonald and M.H. Ginsberg. Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell*, 1995, 83:715-724.
61. M. Tokuhira, S. Hosaka, M.V. Volin, G.K. Haines, K.J. Katschke, S. Kim, A.E. Koch. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 mediation of monocyte chemotaxis in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2000, 43(5):1122-1133.
62. D.M. Rose, P.M. Cardarelli, R.R. Cobb and M.H. Ginsberg. Soluble VCAM-1 binding to alpha4 integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells. *Blood*, 2000, 95(2):602-609.
63. M.J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler and R.R. Lobb. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 1990, 60:577-584.
64. A. Masumoto and M.E. Hemler. Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/Fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *Journal of Cellular Biology*, 1993, 268:228-234.
65. S.L. Bellis. Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for β 1 integrins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1663:52-60.
66. A. Litynska, M. Przybylo, D. Ksiazek and P. Laidler. Differences of α 3 β 1 integrin glycans from different human bladder cell lines. *Acta Biochimica Polonica*, 2000, 47(2):427-434.

67. E.C. Seales, F.M. Shaikh, A.V. Woodard-Grice, P. Aggarwal, A.C. McBrayer, K.M. Hennessy and S.L. Bellis. A protein kinase C/Ras/ERK signalling pathway activates myeloid fibronectin receptors by altering $\beta 1$ integrin sialylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(45):37610-37615.
68. J. Gu and N. Taniguchi. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 21:9-15.
69. A.V. Woodard-Grice, A.C. McBrayer, J.K. Wakefield, Y. Zhuo and S.L. Bellis. Proteolytic shedding of ST6GAL-I by BACE1 regulates the glycosylation and function of $\alpha 4\beta 1$ integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(39):26364-26373.
70. H.B. Guo, I. Lee, M. Kamar, S.K. Akiyama and M. Pierce. Aberrant N-glycosylation of $\beta 1$ integrins causes reduced $\alpha 5\beta 1$ integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Research*, 2002, 62:6837-6845.
71. Y. Liu, D. Pan, S.L. Bellis and Y. Song. Effect of altered glycosylation on the structure of the I-like domain of $\beta 1$ integrin: a molecular dynamics study. *Proteins*, 2008, 73:989-1000.
72. E. Pochee, A. Litynska, A. Amoresano and A. Casbarra. Glycosylation profile of integrin $\alpha 3\beta 1$ changes with melanoma progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1643:113-123.
73. P. Bartik, A. Maglott, G. Entlicher, D. Vestweber, K. Takeda, S. Martin and M. Dontenwill. Detection of a hypersialylated $\beta 1$ integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172. *International Journal of Oncology*, 2008, 32:1021-1031.
74. S. Leppa, J. Heino and M. Jalkanen. Increased glycosylation of $\beta 1$ integrins affects the interaction of transformed S115 mammary epithelial cells with laminin-1. *Cell Growth and Differentiation*, 1995, 6:853-861.

75. S.L. Bellis, E. Newman and E.A. Friedman. Steps in integrin β 1-chain glycosylation mediated by TGF β 1 signalling through Ras. *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 181:33-44.
76. IMWG. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, múltiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*, 2003, 121:749-757.
77. R.A. Kyle and S.V. Rajkumar. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Best Practice & Research clinical Haematology*, 2005, 18(4):689-707.
78. R.A. Kyle and S.V. Rajkumar. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Practice & Research clinical Haematology*. 2007, 20(4):637-664.
79. D.K. Das. Serous effusions in malignant lymphomas: a review. *Diagnostic Cytopathology*, 2006, 34:335-347.
80. V. Ascoli and F. Lo-Coco. Body cavity lymphoma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2002, 8:317-322.
81. A. Matolcsy. Primary effusional lymphoma: a new non-hodgkin's lymphoma entity. *Pathology & Oncology Research*, 1999, 5(2):87-89.
82. R.G. Nádor, E. Cesarman, A. Chadburn, D.B. Dawson, M. Q.Ansari, J. Sald, and D.M. Knowles. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the kaposi's sarcoma - associated herpes virus. *Blood*, 1996, 88(2):645-656.
83. D. Shirokov, E. Kadyrova, M. Anokhina, T. Kondratyeva, V. Gourtsevich, and N. Tupitsyn. A case of HHV-8-associated HIV-negative primary effusion lymphoma in Moscow. *Journal of Medical Virology*, 2007, 79:270-277.
84. D. Buonaiuto, D. Rossi, F. Guidetti, D. Vivenza, E. Berra, C. Deambrogi, C. Ariatti, S. Franceschet, A. Conco, M. Ron, G. Valen, and S. Colom. Human herpesvirus type 8-associated primary lymphomatous effusion in an elderly

- HIV-negative patient: clinical and molecular characterization. *Annali Italiani di Medicina Interna*, 2002, 17(1):54-59.
85. Y.B. Chen, A. Rahemtullah and E. Hochberg. Primary effusion lymphoma. *Oncologist*, 2007, 12(5):569-576.
86. V. Ascoli, C.C. Scalzo, C. Danese, K. Vacca, A. Pistilli, and F. Lo Coco. Human herpes virus-8 associated primary effusion lymphoma of the pleural cavity in HIV-negative elderly men. *European Respiratory Journal*, 1999, 14:1231-1234.
87. R.G. Jenner, K. Maillard, N. Cattini, R.A. Weiss, C. Boshoff, R. Wooster and P. Kellam. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *PNAS*, 2003, 100(18):10399-10404.
88. F. Brimo, R.P. Michel, K. Khetani and M. Auger. Primary effusion lymphoma. A series of 4 cases and review of the literature with emphasis on cytomorphologic and immunocytochemical differential diagnosis. *Cancer*, 2007, 111(4):224-233.
89. R. Hamoudi, T.C. Diss, E. Oksenhendler, L. Pan, A. Carbone, V. Ascoli, C. Boshoff, P. Isaacson and M.Q. Du. Distinct cellular origins of primary effusion lymphoma with and without EBV infection. *Leukemia Research*, 2004, 28:333-338.
90. A. Matolcsy, R.G. Nádor, E. Cesarman and D.M. Knowles. Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation. *American Journal of Pathology*, 1998, 153(5):1609-1614.
91. Y. Yanagisawa, Y. Ato, Y. Asahi-Ozaki, E. Ito, R. Honma, J. Imai, T. Kanno, M. Kano, H. Akiyama, T. Sata, F. Shinkai-Ouchi, Y. Yamakawa, S. Watanabe and H. Katano. Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *Journal of Pathology*, 2006, 209(4):464-473.

92. N.N. Sjak-Shie, R.A. Vescio and J.R. Berenson. HHV-8 infection and multiple myeloma. *Journal of Leukocyte Biology*, 1999, 66:357-360.
93. D. Billadeau, G. Ahmann, P. Greipp and B. van Ness. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178 (3):1023-1031.
94. S. Seidl, H. Kaufmann and J. Drach. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncology*, 2003, 4(9):557-564.
95. M. Hallek, P.L. Bergsagel and K.C. Anderson. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, 1998, 91(1):3-21.
96. M.J. Higgins and R. Fonseca. Genetics of multiple myeloma. *Best Practice & Research clinical Haematology*, 2005, 18(4):525-536.
97. J.D. Shaughnessy and B. Barlogie. Interpreting the molecular biology and clinical behavior of multiple myeloma in the context of global gene expression profiling. *Immunological Reviews*, 2003, 194:140-163.
98. H. Avet-Loiseau. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007, 20(4):625-635.
99. W.J. Chng, O. Glebov, P.L. Bergsagel and W.M. Kuehl. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2007, 20(4):571-596.
100. R.A. Kyle, T.M. Therneau, S.V. Rajkumar, J.R. Offord, D.R. Larson, M.F. Plevak and L.J. Melton. A long-term study of prognosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal Medicine*. 2002, 346:564-569.
101. H. Olteanu, H.Y. Wang, W. Chen, R.W. McKenna, N.J. Karandikar. Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC Clinical Pathology*, 2008, 8:13.

102. R. Berenson, K.C. Anderson, R.A. Audell, R.V. Boccia, M. Coleman, M.A. Dimopoulos, M.T. Drake, R. Fonseca, J.L. Harousseau, D. Joshua, S. Lonial, R. Niesvizky, A. Palumbo, G.D. Roodman, J.F. San-Miguel, S. Singhal, D.M. Weber, M. Zangari, E. Wirtschafter, O. Yellin and R.A. Kyle. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *British Journal of Haematology*, 2010, 150(1):28-38.
103. H. Avet-Loiseau, T. Facon, A. Daviet, C. Godon, M.J. Rapp, J.L. Harousseau, B. Grosbois and R. Bataille. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myélome. Cancer Research*, 1999, 59(18):4546-4550.
104. F. Zhan, B. Barlogie, V. Arzoumanian, Y. Huang, D.R Williams, K. Hollmig, M. Pineda-Roman, G. Tricot, F. van Rhee, M. Zangari, M. Dhodapkar and J.D. Shaughnessy. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*, 2007, 109(4):1692-1700.
105. F. Zhan, J. Hardin, B. Kordsmeier, K. Bumm, M. Zheng, E. Tian, R. Sanderson, Y. Yang, C. Wilson, M. Zangari, E. Anaissie, C. Morris, F. Muwalla, F. van Rhee, A. Fassas, J. Crowley, G. Tricot, B. Barlogie and J. Shaughnessy. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*, 2002, 99(5):1745-1757.
106. S.V. Rajkumar, R.A. Mesa, R. Fonseca, G. Schroeder, M.F. Plevak, A. Dispenzieri, M.Q. Lacy, J.A. Lust, T.E. Witzig, M.A. Gertz, R.A. Kyle, S.J. Russell and P.R. Greipp. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8(7):2210-2216.
107. S.V. Rajkumar, A. Dispenzieri and R.A. Kyle. Monoclonal gammopathy of indetermined significance, Waldeström macroglobulinemia, AL amyloidosis and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment. *Mayo Clinical Proceedings*, 2006, 81(5):693-703.

108. R. A. Kyle and S.V. Rajkumar. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2004, 351:1860-1873.
109. J.R. Berenson. Myeloma bone disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 18(4):653–672.
110. A. Dispenzieri and R.A. Kyle. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 18(4):553-568.
111. R.A. Kyle and S.V. Rajkumar. Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. *Immunological Reviews*, 2003, 194:112-139.
112. C.L. Berekman, K.P. Fair and J.D. Cotelingam. Comparative utility of diagnostic bone-marrow components: a 10-year study. *American Journal of Hematology*, 1997, 56:37-41.
113. I. Van Riet, M. De Waele, L. Remels, P. Lacor, R. Schots and B. van Camp. Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *British Journal of Haematology*, 1991, 79:421-427.
114. N. Robillard, G. Jegou, C. Pellat-Deceunynck, D. Pineau, D. Puthier, M.P. Mellerin, S. Barillé, M.J. Rapp, J.L. Harousseau, M. Amito and R. Bataille. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*, 1998, 4:1521-1526.
115. The international myeloma working group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group. *British Journal of Haematology*, 2003, 121:749-757.
116. J.E.J. Guikema, S. Hovenga, E. Vellenca, J.J. Conradie, W.H. Abdulahad, R. Bekkema, J.W. Smit, F. Zhan, J. Shaughnessy and N. A. Bos. CD27 is heterogeneously expressed in multiple myeloma: low CD27 expression in patients with high risk disease. *British Journal of Haematology*, 2003, 121:36-43.

117. J.C. Montero, R. López-Pérez, J.F. San Miguel and A. Pandiella. Expression of c-Kit isoforms in multiple myeloma: differences in signaling and drug sensitivity. *Haematologica*, 2008, 93(6):851-859.
118. S. Kumar, S.V. Rajkumar, T. Kimlinger, P.R. Greipp and T.E. Witzig. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia*, 2005, 19:1466-1470.
119. R. Gupta, A. Bhaskar, L. Kumar, A. Sharma and P. Jain. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *American Journal of Clinical Pathology*, 2009, 132(5):728-732.
120. K.J. Smock, S.L. Perkins and D.W. Bahler. Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by flow cytometric analysis compared with morphologic assessment. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007, 131:951-955.
121. M. Santra, J. Shaughnessy and W. Bellamy. Expression of multiple myeloma associated markers in bone marrow spicules using a novel immunohistochemical technique. *Biotechnic & Histochemistry*, 2011, 86(2):119-123.
122. M. Ocqueteau, A. Orfao, J. Almeida, J. Blade, M. Gonzalez, R. Garcia-Sanz, C. Lopez-Berges, M. J. Moro, J. Hernandez, L. Escribano, D. Caballero, M. Rozman and J.F. San Miguel. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. *American Journal of Pathology*, 1998, 152(6):1655-1665.
123. S.V. Rajkumar and F. Buadi. Multiple myeloma: new staging systems for diagnosis, prognosis and response evaluation. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 20(4):665-680.
124. B.G. Durie and S.E. Salmon. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer*, 1975, 36(3):842-854.
125. P.R. Greipp, J. San Miguel, B.D.M. Durie, J.J. Crowley, B. Barlogie, J. Bladé, M. Boccadoro, J.A. Child, H. Avet-Loiseau, R.A. Kyle, J.J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powlwa, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonnewald, P. Tosi,

- I. Turesson and J. Westin. International Staging System for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(15):3412-3420.
126. G.R. Shaw. Nonsecretory plasma cell myeloma - becoming even more rare with serum free light-chain assay: a brief review. *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine*, 2006, 130 (8):1212-1215.
127. R.A. Kyle, E.D. Remstein, T.M. Therneau, A. Dispenzieri, P.J. Kurtin, J.M. Hodnefield, D.R. Larson, M.F. Plevak, D.F. Jelinek, R. Fonseca, L.J. Melton and S.V. Rajkumar. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 2007, 356:2582-2590.
128. D.L. Wahner-Roedler and R.A. Kyle. Heavy chain disease. *Best Practice & Research clinical Haematology*, 2005, 18(4):729-746.
129. T. Hideshima and K.C. Anderson. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2:927-937.
130. A.M. Roccaro, I.M. Ghobrial, S. Blotta, S.P. Treon, M. Malagola, K.C. Anderson, P.G. Richardson and D. Russo. Advances in the treatment of monoclonal gammopathies: the emerging role of targeted therapy in plasma cell dyscrasias. *Biologics: Targets & Therapy*, 2008, 2(3):419-431.
131. D.H. Vesole, G. Tricot, S. Jagannath, K.R. Desikan, D. Siegel, D. Bracy, L. Miller, B. Cheson, J. Crowley and B. Barlogie. Autotransplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood*, 1996, 88(3):838-847.
132. B. Barlogie, G.J. Tricot, F. van Rhee, E. Angtuaco, R. Walker, J. Epstein, J.D. Shaughnessy, S. Jagannath, V. Bolejack, J. Gurley, A. Hoering, D. Vesole, R. Desikan, D. Siegel, J. Mehta, S. Singhal, N.C. Munshi, M. Dhodapkar, B. Jenkins, M. Attal, J.L. Harousseau and J. Crowley. Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 2006, 135(2):158-164.

133. Y.J. Kim, S.J. Kim, K. Min, H.Y. Kim, H.J. Kim, Y.K. Lee and D.Y. Zang. Multiple myeloma with myelomatous pleural effusion: a case report and review of the literature. *Acta Haematologica*, 2008, 120(2):108-111.
134. V.H. Jiménez-Zepeda and V.J. Domínguez. Plasma cell leukemia: a rare condition. *Annals of Hematology*, 2006, 85:263-267.
135. T.E. Witzig, M.A. Gertz, J.A. Lust, R.A. Kyle, W.M. O'Fallon and P.R. Greipp. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival on patients with multiple myeloma. *Blood*, 1996, 88(5):1780-1787.
136. S. Kumar, S.V. Rajkumar, R.A. Kyle, M.Q. Lacy, A. Dispenzieri, R. Fonseca, J.A. Lust, M.A. Gertz, P.R. Greipp and T.E. Witzig. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(24):5668-5674.
137. M.M. Zutter, G. Mazoujian and S.A. Santoro. Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *American Journal of Pathology*, 1990, 137(4):863-870.
138. K. Podar, P.G. Richardson, T. Hideshima, D. Chauhan and K.C. Anderson. The malignant clone and the bone marrow environment. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 20(4):597-612.
139. B. Klein, X.G. Zhang, M. Jourdan, J. Content, F. Houssiau, L. Aarden, M. Piechaczyk and R. Bataille. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989, 73(2):517-526.
140. M.A. Frassanito, A. Cusmai, G. Iodice and F. Dammacco. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*, 2001, 97:483-489.
141. G. Cassese, S. Arce, A.E. Hauser, K. Lehnert, B. Moewes, M. Mostarac, G. Muehlinghaus, M. Szyska, A. Radbruch and R.A. Manz. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *The Journal of Immunology*, 2003, 171:1684-1690.

142. R.E. Banks, A.J.H. Gearing, I.K. Hemingway, D.R. Norfolk, T.J. Perren and P.J. Selby. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *British Journal of Cancer*, 1993, 68:122-124.
143. H.I.A. Sati, M. Greaves, J.F. Apperley, R. Graham, G. Russell and P.I. Croucher. Expression of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α in plasma cells from patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 1999, 104:350-357.
144. T. Hideshima, N. Nakamura, D. Chauhan and K.C. Anderson. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signalling in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001, 20(42):5991-6000.
145. K. Gadó, G. Domján, H. Hegyesi and A. Falus. Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biology International*, 2000, 24(4):195-209.
146. B. Klein, X.Y. Li, Z.Y. Lu, M. Jourdan, K. Tarte, J. Brochier, E. Claret, J. Wijdenes and J.F. Rossi. Activation molecules on human myeloma cells. *Current Topics In Microbiology and Immunology*, 1999, 246:335-341.
147. M. Potter. Neoplastic development in plasma cells. *Immunological Reviews*, 2003, 194:177-95.
148. A.C. Sprynski, D. Hose, L. Caillot, T. Rème, J.D. Shaughnessy, B. Barlogie, A. Seckinger, J. Moreaux, M. Hundemer, M. Jourdan, T. Meissner, A. Jauch, K. Mahtouk, A. Kassambara, U. Bertsch, J.F. Rossi, H. Goldschmidt and B. Klein. The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor. *Blood*, 2009, 113(19): 4614-4626.
149. T. Hideshima, K. Podar, D. Chauhan and K.C. Anderson. Cytokines and signal transduction. *Best Practice & Research clinical Haematology*, 2005, 18(4):509-524.

150. T.M. Tancred, A.R. Belch, T. Reiman, L.M. Pilarski and J. Kirshner. Altered expression of fibronectin and collagens I and IV in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2009, 57(3):239-247.
151. J.L. Sechler, A.M. Cumiskey, D.M. Gazzola and J.E. Schwarzbauer. A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by $\alpha 4\beta 1$ integrin binding to the alternatively spliced V region. *Journal of Cell Science*, 2000, 113:1491-1498.
152. S. Chen-Kiang. Biology of plasma cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 18(4):493-507.
153. T.E. Witzig, M. Timm, D. Larson, T. Therneau and P.R. Greipp. Measurement of apoptosis and proliferation of bone marrow plasma cells in patients with plasma cell proliferative disorders. *British Journal of Haematology*, 1999, 104(1):131-137.
154. P.L. Bergsagel and W.M. Kuehl. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(26):6333-6338.
155. M.V. Mateos, R. García-Sanz, R. López-Pérez, M.J. Moro, E. Ocio, J. Hernández, M. Megido, M.D. Caballero, J. Fernández-Calvo, A. Báez, J. Almeida, A. Orfao M. González and J.F. San Miguel. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cells proliferation and short survival. *British Journal of Haematology*, 2002, 118(4):1033-1040.
156. D. Chauhan, T. Hideshima and K.C. Anderson. Apoptotic signalling in multiple myeloma: therapeutic implications. *International Journal of Immunology*, 2003, 78:114-120.
157. P. Gomez-Bougie, R. Bataille and M. Amiot. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cell. *European Journal of Immunology*, 2004, 34:3156-3164.

158. L.E. Pérez, N. Parquet, K. Shain, R. Nimmanapalli, M. Alsina, C. Anasetti and W. Dalton. Bone marrow stroma confers resistance to Apo2L/TRAIL in multiple myeloma in part by regulating c-FLIP. *Journal of Immunology*, 2008, 180:1545-1555.
159. D.R. Green. Overview: apoptotic signalling pathways in the immune system. *Immunological Reviews*, 2003, 193:5-9.
160. M. Jourdan, J. De Vos, N. Mechti and B. Klein. 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*, 2000, 7(12):1244-5122.
161. Z. Zhang, K. Vuori, J.C. Reed and E. Ruoslahti. The alpha 5 beta integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 1995, 92:16161-16165.
162. H. Hata, H. Matsuzaki, M. Takeya and K. Takatsuki. Fas/APO-1 (CD95)-mediated and CD95-independent apoptosis of malignant plasma cells. *Leukemia and Lymphoma*, 1996, 24(1-2):35-42.
163. Y. Gazitt, V. Fey, C. Thomas and R. Alvarez. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to dexamethasone, but not melphalan, in multiple myeloma cells. *International Journal of Oncology*, 1998, 13:397-405.
164. M. Gómez-Benito, M.J. Martínez-Lorenzo, A. Anel, I. Marzo and J. Naval. Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Experimental Cell Research*, 2007, 313:2378-2388.
165. L.E. Pérez, N. Parquet, M. Meads, C. Anasetti and W. Dalton. Bortezomib restores stroma-mediated Apo2L/TRAIL apoptosis resistance in multiple myeloma. *European Journal of Haematology*, 2010, 84:212-222.
166. Y. Mura, T. Tsujioka, Y. Nishimura, H. Sakaguchi, M. Maeda, H. Hayashi, M. Dong, F. Hyodoh, K. Yata, H. Wada, T. Sugihara and T. Otsuki. TRAIL

- expression up-regulated by interferon-gamma via phosphorylation of STAT1 induces myeloma cell death. *Anticancer Research*, 2006, 26(6B):4115-4124.
167. A. Krueger, S.C. Fas, S. Baumann and P.H. Krammer. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunological Reviews*, 2003, 193:58-69.
168. J.J. Westendorf, J.M. Lammert and D.F. Jelinek. Expression and function of Fas (APO-1/CD95) in patient myeloma cells and myeloma cell lines. *Blood*, 1995, 85(12):3566-3576.
169. T.H. Landdowski, N. Qu, I. Buyuksal, J.S. Painter and W.S. Dalton. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*, 1997, 90(11):4266-4270.
170. H. Spets, T. Strömberg, P. Georgii-Hemming, J. Siljason, K. Nilsson and H. Jernberg-Wiklund. Expression of the Bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells. *European Journal of Haematology*, 2002, 69:76-89.
171. A.E. Goodwin and B.U. Pauli. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *Journal of Immunological Methods*, 1995, 187(2):213-219.
172. R. Luque, J.A. García-Trujillo, C. Cámara, A. Moreno, P. Eiras, G. Roy, L.M. Villar, M. Lombardía, J.A. Brieva, A. Bootello and E. Roldán. CD106 and activated-CD29 are expressed on myelomatous bone marrow plasma cells and their downregulation is associated with tumour progression. *British Journal of Haematology*, 2002, 119(1):70-78.
173. D.T. Shih, J.M. Edelman, A.E. Horwitz, G.B. Grunwald and C.A. Buck. Structure/Function Analysis of the Integrin/31 Subunit by Epitope Mapping. *The Journal of Cell Biology*, 1993, 122(6):1361-1371.
174. P.G. Ekert and D.L. Vaux. Apoptosis and the immune system. *British Medical Bulletin*, 1997, 53(3):591-603.

175. J. K. V. Willson, D. E. Luberoff, A. Pitts and T. G. Pretlow. A Method for the Separation of Lymphocytes and Plasma Cells from the Human Palatine Tonsil Using Sedimentation in an Isokinetic Gradient of Ficoll in Tissue Culture Medium. *Immunology*, 1975, 28(1):161-170.
176. A. H. Minges-Wols and P.L. Witte. Plasma cell purification from murine bone marrow using a two-step isolation approach. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 329(1-2):219-224.
177. S. Chow, D. Hedley, P. Grom, R. Magari, J.W. Jacobberger and T.V. Shankey. Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations. *Cytometry A*, 2005, 67(1):4-17.
178. V.L. Schramm and F.C. Wedler. Manganese in Metabolism and Enzyme Function. Academic Press, New York, 1986, pp 104-132.
179. J.W. Smith, R.S. Piotrowicz and D.A. Mathis. A mechanism for divalent cation regulation of beta3-integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(2):960-967.
180. S.R. Barthel, D.S. Annis, D.F. Mosher and M.W. Johansson. Differential Engagement of Modules 1 and 4 of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (CD106) by Integrins $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/29) and $\alpha M\beta 2$ (CD11b/18) of Eosinophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(43):32175-32187.
181. G. Bazzoni, L. Ma, M.L. Blue and M.E. Hemler. Divalent Cations and Ligands Induce Conformational Changes That Are Highly Divergent among $\beta 1$ Integrins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(12):6670-6678.
182. L.L. Chen, A. Whitty, D. Scott, W.C Lee, M. Cornebise, S.P. Adams, R.C. Petter, R.R. Lobb and R.B. Pepinsky. Evidence that ligand and metal ion binding to integrin $\alpha 4\beta 1$ are regulated through a coupled equilibrium. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39):36520-36529.

183. F. Sanz-Rodríguez, N. Ruiz-Velasco, D. Pascual-Salcedo and J. Teixidó. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *British Journal of Haematology*, 1999, 107:825-834.
184. F. Sanz-Rodríguez, A. Hidalgo and J. Teixidó. Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 2001, 97(2):346-351.
185. Y.T. Tai, K. Podar, L. Catley, Y.H. Tseng, M. Akiyama, R. Shringarpure, R. Burger, T. Hideshima, D. Chauhan, N. Mitsiades, P. Richardson, N.C. Munshi, C.R. Kahn, C. Mitsiades and K.C. Anderson. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Research*, 2003, 63(18):5850-5858.
186. R.U. Holt, V. Baykov, T.B. Rø, S. Brabrand, A. Waage, A. Sundan and M. Børset. Human myeloma cells adhere to fibronectin in response to hepatocyte growth factor. *Haematologica*, 2005, 90:479-488.
187. C. Laudanna, J.Y. Kim, G. Constantin and E. Butcher. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological Reviews*, 2002, 186:37-46.
188. J.A. DiVietro, D.C. Brown, L.A. Sklar, R.S. Larson and M.B. Lawrence. Immobilized stromal cell-derived factor-1 α triggers rapid VLA-4 affinity increases stabilize lymphocyte tethers on VCAM-1 and subsequently initiate firm adhesion. *Journal of Immunology*, 2007, 178:3903-3911.
189. T. Hideshima, D. Chauhan, T. Hayashi, K. Podar, M. Akiyama, D. Gupta, P. Richardson, N. Munshi and K.C. Anderson. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1 α in multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002, 1(7):539-544.
190. A. Chigaev, A. Waller, O. Amit, L. Halip, C.G. Bologa and L.A. Sklar. Real-time analysis of conformation-sensitive antibody binding provides new insights into integrin conformational regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(21):14337-14346.

191. J.R. Chan, S.J. Hyduk and M.I. Cybulsky. Chemoattractants induce rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular adhesion molecule-1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 193(10):1149-1158.
192. J.J. Grzesiak and M. Bouvet. Divalent cations modulate the integrin-mediated malignant phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Science*, 2008, 99:1553-1563.
193. T. Isaji, Y. Sato, T. Fukuda and J. Gu. N-glycosylation of the I-like domain of $\beta 1$ integrins is essential for $\beta 1$ integrin expression and biological function. Identification of the minimal N-glycosylation requirement for alpha5beta1. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284:12207-12216.
194. S. She, B. Xu, M. He, X. Lan and Q. Wang. Nm23-H1 suppresses hepatocarcinoma cell adhesion and migration on fibronectin by modulating glycosylation of integrin beta1. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010, 29:93-100.
195. N.A Hotchin and F. Watt. Transcriptional and post-translational regulation of $\beta 1$ integrin expression during keratinocyte terminal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(21):14852-14858.
196. R. Luque, J.A. Brieva, A. Moreno, A. Manzanal, L. Escribano, J. Villarrubia, J.L. Velasco, J. López-Jiménez, C. Cerveró, M.J. Otero, J. Martínez, C. Bellas and E. Roldán. Normal and clonal B lineage cells can be distinguished by their differential expression of B cell antigens and adhesion molecules in peripheral blood from multiple myeloma (MM) patients--diagnostic and clinical implications. *Clinical and Experimental Immunology*, 1998, 112(3):410-418.
197. R.D. Evans, V.C. Perkins, A. Henry, P. Stephens, M.K. Robinson and F.M. Watt. A tumor-associated $\beta 1$ integrin mutation that abrogates epithelial differentiation control. *Journal of Cellular Biology*, 2003, 160(4):589-596.
198. S.J. Barton, M.A. Travis, J.A. Askari, P.A. Buckley, S.A. Craig, M.J. Humphries and A.P. Mould. Novel activating and inactivating mutations in the integrin $\beta 1$ subunit A domain. *Biochemical Journal*, 2004, 380(2):401-407.

199. A. Etzioni. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. *Current Opinion in Immunology*, 2009, 21(5):481-486.
200. E.S. Harris, A.O. Shigoeka, W. Li, R.H. Adams, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman and D.E. Lorant. A novel syndrome of variant leukocyte adhesion deficiency involving defects in adhesion mediated by $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins. *Blood*, 2001, 97:767-776.
201. M. Sajid, K.V. Vijayan, S. Souza, and P.F. Bray. PIA polymorphism of integrin $\beta 3$ differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins. *Arteriosclerosis Thrombosis And Vascular Biology*, 2002, 22(12):1984-1989.
202. T.J. Kunicki, M. Kritzic, D.S. Annis and D.J. Nugent. Hereditary variation in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density is associated with two silent polymorphisms in the $\alpha 2$ gene coding sequence. *Blood*, 1997, 89(5):1939-1943.
203. G. Constantin, M. Majeed, C. Giagulli, L. Piccio, J.Y. Kim, E.C. Butcher and C. Laudanna. Chemokines trigger immediate $\beta 2$ integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 2000, 13(6):759-769.
204. G.R. Van de Walle, K. Vanhoorelbeke, Z. Majer, E. Illyés, J. Baert, I. Pareyn and H. Deckmyn. Two functional active conformations of the integrin $\alpha 2\beta 1$, depending on activation condition and cell type. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(44):36873-36882.
205. D.J. Erle, M.J. Briskin, E.C. Butcher, A. García-Pardo, A.I. Lazarovits and M. Tidswell. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin $\alpha 4\beta 7$, on human leukocytes. *Journal of Immunology*, 1994, 153(2):517-528.
206. C.C. DeNucci, A.J. Pagan, J.S. Mitchell and Y. Shimizu. Control of $\alpha 4\beta 7$ integrin expression and CD4 T cell homing by the $\beta 1$ integrin subunit. *Journal of Immunology*, 2010, 184(5):2458-2467.
207. E.P. Bowman, N.A. Kuklin, K.R. Youngman, N.H. Lazarus, E.J. Kunkel, J. Pan, H.B. Greenberg and E.C. Butcher. The intestinal chemokine thymus-

- expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2002, 195(2):269-275.
208. D. Billadeau, B. Van Ness, T. Kimlinger, R.A. Kyle, T.M. Threanu, P.R. Greipp and T.E. Witzig. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood*, 1996, 88(1):289-296.
209. G.S. Nowakowski, T.E. Witzig, D. Dingli, M.J. Tracz, M.A. Gertz, M.Q. Lacy, J.A. Lust, A. Dispenzieri, P.R. Greipp, R.A. Kyle and S.V. Rajkumar. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 2005, 106(7):2276-2279.
210. J. Minarik, V. Scudia, M. Ordeltova, T. Pika, J. Bacovsky, M. Steinbach, V. Kumar and B. Van Ness. Combined measurement of plasma cell proliferative and apoptotic index in multiple myeloma defines patients with good and poor prognosis. *Leukemia Research*, 2011, 35:44-48.
211. N. Robillard, C. Pellat-Deceunynck and R. Bataille. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*, 2005, 105:4845-4848.
212. D. Lesage, X. Trosussard and B. Sola. The enigmatic role of cyclin D1 in multiple myeloma. *International Journal of Cancer*, 2005, 115:171-176.
213. D. Hose, T. Reme, T. Meissner, J. Moreaux, A. Seckinger and J. Lewis. Inhibition of aurora kinases for tailored risk-adapted treatment of multiple myeloma. *Blood*, 2009, 113:4331-4340.
214. D. Hose, T. Rème, T. Hielscher, J. Moreaux, T. Messner, A. Seckinger, A. Benner, J.D. Shaughnessy, B. Barlogie, Y. Zhou, J. Hillengass, U. Bertsch, K. Neben, T. Möhler, J.F. Rossi, A. Jauch, B. Klein, and H. Goldschmidt. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica*, 2011, 96(1): 87-95.

215. E.H.J. Danen and K.M. Yamada. Fibronectin, integrins and growth control. *Journal of Cellular Physiology*, 2001, 189:1-13.
216. M.G. Alexandrakis, F.H. Passam, C. Dambaki, C.A. Pappa and E.N. Stathopoulos. The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma. *Journal of Clinical Pathology*, 2004, 57:856-860.
217. S.M. Frish and H. Francis. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 1994, 124(4):619-626.
218. S.M. Frish and H. Francis. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(5):701-706.
219. A. Miguel-García, T. Orero, E. Matutes, F. Carbonell, A. Miguel-Sosa, M. Linares, F. Tarín, M. Herrera, J. García-Talavera, and F. Carbonell-Ramón. Bcl-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: a comparative study. *Haematologica*, 1998, 83(4):298-304.
220. D. Puthier, C. Pellat-Deceunynck, S. Barille, N. Robillard, C. and N. J. Rapp. Differential expression of Bcl-2 in human plasma disorders according to proliferation status and malignancy. *Leukemia*, 1999, 13:289-294.
221. G. Vairo, T.J. Soos, T.M. Upton, J. Zalvide, J.A. DeCaprio and M.E. Ewen. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27-kip1, pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Molecular Cell Biology*, 2000, 20:4745-4753.
222. T. Wada, H. Maeba, Y. Ikawa, Y. Hashida, A. Okumura, F. Shibata, Y. Tone, M. Inoue, S. Koizumi, H. Takatori, Y. Sakai, S. Kaneko and A. Yachie. Reactive peripheral blood plasmacytosis in a patient with acute hepatitis A. *International Journal of Hematology*, 2007, 85(3):191-194.
223. E.A. Szyszko, J.G. Brun, K. Skarstein, A.B. Peck, R. Jonsson and K.A. Brokstad. Phenotypic diversity of peripheral blood plasma cells in primary Sjögren's syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2011, 73(1):18-28.

APÉNDICE

El trabajo de investigación desarrollado durante esta tesis doctoral ha generado comunicaciones a congresos tanto de índole nacional como internacional, así como publicaciones científicas, como se cita a continuación:

➤ CONGRESOS NACIONALES:

▪ **XXXIII Congreso nacional de la SEI, Granada, 28-31 Marzo 2007**

Las células tumorales de la leucemia de células plasmáticas pierden la forma de alta afinidad de la integrina CD29 y son refractarios al estímulo de sus factores reguladores.

Autores: E. Martínez-Viñambres, J.A. García-Trujillo, E. Rodríguez-Martín, N. Villarrubia, J. Coll, E. Roldán

▪ **XXXIV Congreso nacional de la SEI, Palma de Mallorca, 21- 24 Mayo 2008**

Balance entre proliferación y apoptosis en células plasmáticas normales y tumorales en enfermos con gammopatía monoclonal de significado incierto.

Autores: E. Martínez-Viñambres, J.A. García-Trujillo, MI Alcalá Peña, E. Rodríguez-Martín, J. Coll, E. Roldán

Detección de células tumorales circulantes en un linfoma de efusión primaria.

Autores: E. Martínez-Viñambres, MI Alcalá Peña, M.L. Villar Guimerans, J. Coll, E. Roldán

➤ CONGRESOS INTERNACIONALES:

▪ **2nd European Congress of Immunology, Berlín, 13-16 September 2009**

Downregulation of active beta1 integrin is associated with exit of plasma cells to peripheral blood and progression disease in multiple myeloma patients

Authors: E. Martínez-Viñambres, J.A. García-Trujillo, MI Alcalá Peña, E. Rodríguez-Martín, N. Villarrubia, J. Coll, E. Roldán

➤ PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

**CD29 Expressed on Plasma Cells Is Activated By Divalent Cations
And Soluble CD106 Contained In The Bone Marrow Plasma.
Refractory Activation Is Associated With Enhanced Proliferation And Exit of
Clonal Plasma Cells to Circulation in Multiple Myeloma Patients.**

Eva Martínez-Viñambres, Jose A. García-Trujillo, Eulalia Rodríguez-Martín, Luisa M. Villar, Pedro González-Porque, Javier Coll and Ernesto Roldán.

(mandado a publicar)