

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Asociación de epítomos constitutivos y conformacionales de
CD29 y CD9 en gammapatías monoclonales : regulación,
funcionalidad y su uso como marcadores de progresión**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrés Roncancio Clavijo

Director

Ernesto Roldán Santiago

Madrid

© Andrés Roncancio Clavijo, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Asociación de epítomos constitutivos y conformacionales de CD29 y CD9 en gammapatías monoclonales: regulación, funcionalidad y su uso como marcadores de progresión

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrés Roncancio Clavijo

DIRECTOR

Ernesto Roldán Santiago

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

TESIS DOCTORAL

**ASOCIACIÓN DE EPÍTOPOS CONSTITUTIVOS Y CONFORMACIONALES DE
CD29 Y CD9 EN GAMMAPATÍAS MONOCLONALES: REGULACIÓN,
FUNCIONALIDAD Y SU USO COMO MARCADORES DE PROGRESIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Andrés Roncancio Clavijo

DIRECTOR

Ernesto Roldán Santiago

Madrid, 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Álvaro Prada, la Dra. Lola de Juan, a Larraitz y la Dra. Mercedes Rey. A David. Por su cariño y ser mi familia en tiempos distópicos.

A la Dra. Silvia Sánchez y el Dr. Miguel Fernández, por su colaboración y mediación.

A la Dra. María Guzmán y el Dr. Miguel Piris, por aceptar la tarea de revisar una tesis en tiempos de cenas y villancicos.

Al Dr. Fernando Martín, por aceptar el papel de investigador colaborador.

A la Dra. Noelia Villarrubia, por su orientación en los aspectos éticos.

A la Dra. Villar, por su entera disposición.

A Paulette, por su apoyo bibliográfico desenfadado.

A Lali, por el trabajo de más que pudo significar la recta final.

A Ernesto, por su apoyo, su voto de confianza, su guía citométrica y musical. Y por supuesto a Teresa, por la parte que llevó en el proceso.

A Aurora, motor no tan secreto de mi vida.

A mis suegros y cuñados, mi familia adoptiva.

A mi madre y hermanos.

A mi tía Orfilia. Por todo.

A mi tía Orfilia

-Estoy aquí, bajo el manzano -dijo la voz.

Antoine Marie Jean-Baptiste Roger

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	25
1. Diferenciación de células B: las células plasmáticas	26
1.1. Origen y generación de las células plasmáticas en ganglio	26
1.2. Origen y generación de las células plasmáticas en bazo.....	27
1.3. Influencia del tipo de antígeno en la generación de CP.....	27
1.4. Programa genético en la diferenciación de CP: papel multifuncional del factor de transcripción Blimp-1	29
1.5. Capacidad migratoria de los plasmablastos	30
1.5.1. Salida de los plasmablastos desde los órganos linfoides secundarios a sangre periférica.....	30
1.5.2. Transmigración de los plasmablastos a MO (y otros territorios): contribución de las moléculas de adhesión y quimioquinas	31
2. La médula ósea y su microambiente	33
2.1. Fisiología de la MO	33
2.2. El “nicho” en el microambiente de la MO: interacciones.....	34
2.2.1. Componentes celulares	34
2.2.1.1. Células de estroma	34
2.2.1.2. Otros tipos celulares	35
2.2.2. Componentes moleculares	36
2.2.2.1. Factores solubles	36
2.2.2.2. Moléculas de superficie.....	37
2.2.2.2.1. Las $\beta 1$ integrinas (CD29): propiedades y clasificación	38
2.2.2.2.2. Tetraspaninas.....	45
2.2.2.2.3. Otras moléculas de adhesión.....	49
2.2.2.2.4. Otras moléculas.....	49
3. Neoplasias de células plasmáticas	51
3.1. Clasificación y definición	51
3.2. Mieloma múltiple.....	52
3.2.1. Sistema de estadificación para el MM.....	54
3.2.2. Presentaciones infrecuentes del MM	55
3.3. Etiopatogenia del MM	56
3.3.1. Origen del MM y alteraciones genéticas más comunes.....	56
3.3.2. Interacciones de las células de MM con células del estroma y otros tipos celulares	56
3.3.3. Interacciones de las células de MM con proteínas de la matriz extracelular	59

3.3.4. Redes de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles y sus receptores.....	61
3.3.5. Proliferación de las células de MM	63
3.3.6. Supervivencia / apoptosis en células de MM.....	65
3.4. Resistencia al tratamiento mediada por el microambiente.....	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
RESULTADOS.....	81
DISCUSIÓN.....	128
CONCLUSIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microambiente de la médula ósea.....	36
Figura 2. Organización y estructura de las integrinas	40
Figura 3. Organización y estructura de las tetraspaninas;	46
Figura 4. Comparación de la intensidad de expresión (IMF: intensidad media de fluorescencia; expresada en unidades arbitrarias -u.a.-) de la forma constitutiva de CD29 (CD29 MAR4) y del porcentaje de la forma activada de CD29 (CD29 HUTS21)	83
Figura 5. Porcentaje e IMF (u.a.) de la forma constitutiva (MAR4) y activada (HUTS21) de la molécula CD29 en las CP de MO de diferentes grupos de pacientes con MM.	84
Figura 6. Comparación del porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de la forma constitutiva (MAR4) y activada (HUTS21) de CD29 en diferentes grupos de pacientes con MM.....	85
Figura 7. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma constitutiva de las CP de MO en pacientes con EEM y sin EEM	86
Figura 8. Porcentaje e IMF (u.a.) de la forma constitutiva de CD29 en CP de MO de pacientes con EEM y sin EEM.....	86
Figura 9. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma activa de CD29 de las CP en MO de pacientes con EEM y sin EEM.....	87
Figura 10. Porcentaje e IMF (u.a.) de la expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO de pacientes con EEM y sin EEM.....	87
Figura 11. Efecto del Mn ²⁺ en el porcentaje de activación de CD29 en las CP de MO de pacientes sin EEM y con EEM.	88
Figura 12. Ensayo de adhesión a FN en CP de MO sin EEM o con EEM.....	89
Figura 13. Comparación del porcentaje de expresión y de la IMF (u.a.) de la forma constitutiva de CD29 en CP de líquido pleural (LP) y CP de MO de pacientes con EEM	90
Figura 14. Comparación del porcentaje de expresión y de la IMF (u.a.) de la expresión de la forma activa de CD29 en CP de LP y MO de pacientes con EEM.....	91
Figura 15. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma constitutiva y activa de CD29 en las CP de LP.....	91

Figura 16. Efecto diferencial del Mn^{2+} en el porcentaje de activación de CD29 en las CP de MO y LP de un paciente con EEM y en MO de un paciente sin EEM.....	92
Figura 17. Efecto de otros agentes activadores en la expresión porcentual de la forma activa de CD29 en CP de LP de un paciente con EEM.....	93
Figura 18. Adhesión a FN de CP de MO de MM sin EEM o con EEM y de CP de LP.	93
Figura 19. Las CP del LCR no expresan la forma activa de CD29 y son por completo refractarias a la adición de Mn^{2+}	94
Figura 20. Pérdida progresiva de la expresión porcentual e IMF (u.a.) de CD29 en las diferentes etapas de la enfermedad.....	95
Figura 21. Patrón de expresión de FAK en CP de MO atendiendo a los niveles de expresión de CD29.....	98
Figura 22. Diferentes patrones de expresión de la cadena $\beta 1$ (CD29) y la cadena $\alpha 4$ (CD49d) en las CP de pacientes con MM.	100
Figura 23. Diferentes patrones de expresión de la cadena $\beta 1$ activada (CD29 HUTS21) y la cadena $\alpha 4$ (CD49d).....	102
Figura 24. Diferentes patrones de expresión en las CP de MO de pacientes con MM de las moléculas CD29 MAR4 ($\beta 1$), CD49d y $\beta 7$	103
Figura 25. Diferentes patrones de expresión en las CP de MO de pacientes con MM de las moléculas CD29 HUTS21 (forma activa la cadena $\beta 1$), CD49d y $\beta 7$	104
Figura 26. Efecto compensatorio en la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con expresión baja de CD29 MAR4 y con expresión variable de CD49d.	105
Figura 27. Efecto compensatorio en la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con expresión baja de CD29 HUTS21 ($\leq 30\%$ de CP HUTS21+) y con expresión variable de CD49d	106
Figura 28. Efecto compensatorio recíproco de la expresión de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con MM.	106
Figura 29. Porcentaje de activación de CD29 (células CD29 HUTS21+) tras la adición de Mn^{2+} en CP expresando diferentes niveles de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y $\beta 7$	108
Figura 30. Ensayo de adhesión a FN de CP de MO con expresión intermedia de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ y de CP con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$	109
Figura 31. Patrones de expresión de la forma constitutiva de la molécula CD9 en CP de MO.....	110
Figura 32. Expresión de la forma constitutiva del antígeno CD9 en CP de individuos sanos y de pacientes con gammapatías monoclonales.	111
Figura 33. Patrones de expresión conjunta de CD9 constitutivo y de CD29 MAR4 en CP de individuos sanos y de pacientes con gammapatías monoclonales.....	112
Figura 34. Ejemplo representativo de la expresión de CD29 MAR4 en un paciente con MM atendiendo a los diferentes niveles de expresión de CD9 y CD81.....	114
Figura 35. Patrón de expresión de CD9 PAINS13 en las CP de MO.....	116
Figura 36. Patrones de expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 en CP de MO.....	117
Figura 37. Curva de regresión de los porcentajes de expresión de CD9 constitutivo y CD9 PAINS13.....	118
Figura 38. Estrategia para la detección de CD9 PAINS13 en diferentes estadios madurativos de la serie mieloide/granulocítica.....	119
Figura 39. Estrategia para la detección por CF de diferentes estadios madurativos de la serie monocítica y su expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13.....	120

Figura 40. Comparación de la expresión porcentual del CD9 constitutivo y CD9 PAINS13 en diferentes estadios madurativos de la serie mieloide y monocítica 121

Figura 41. Ejemplo representativo de la regulación por temperatura de la expresión porcentual e IMF (u.a.) del epítipo CD9 PAINS13 (en rojo – expresión a 37°C; en azul – expresión a 4°C)..... 122

Figura 42. Efecto del Mn²⁺ en la expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 en CP de MM. 123

Figura 43. Estudio por CF del paralelismo en la expresión porcentual e IMF (u.a.) de la integrina CD49f y del epítipo conformacional CD9 PAINS13 en dos ejemplos representativos de pacientes con MM 124

Figura 44. Similitud en la expresión porcentual e IMF (u.a.) de CD49f y CD9 PAINS13. ... 125

Figura 45. Patrón de expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 dependiendo de los niveles de expresión de CD29 MAR4 o CD29 HUTS21. 126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Neoplasias de células plasmáticas y otras enfermedades con paraproteínas según la clasificación de tumores hemato-linfoides de la WHO del año 2022 53

Tabla 2. Neoplasias de células plasmáticas según la clasificación del C.A.C. del año 2022..... 53

Tabla 3. Diferencias de expresión de CD29 MAR4 de pacientes de MM en los estadios II y III de la ISS. 96

Tabla 4. Porcentaje de expresión e IMF de CD49d y CD29 MAR4 en CP clonales de MM..... 99

Tabla 5. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de CD49d y CD29 HUTS21 en CP clonales de MM..... 101

Tabla 6. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de las moléculas β7 integrina y CD49d en CP clonales de pacientes con MM 103

Tabla 7. Diferencias de expresión porcentual e IMF (u.a) de las moléculas CD29 MAR 4 y CD29 HUTS atendiendo a la expresión de CD9 constitutivo 113

Tabla 8. Comparación de la intensidad de fluorescencia (IMF -u.a.-) del CD29 MAR4 entre poblaciones atendiendo a la expresión diferencial de CD81 y CD9 115

Tabla 9. Correlación entre los niveles del epítipo conformacional CD9 PAINS13 y CD9 constitutivo..... 117

Tabla 10. Porcentaje e IMF (u.a.) de la expresión de CD49f y CD49d en CP tumorales de MO..... 124

Tabla 11. Expresión de la forma constitutiva y activada de CD29 en CP de pacientes con MM dependiendo del porcentaje de expresión de CD9 PAINS13. 127

ABREVIATURAS

A

AcMo: Anticuerpo monoclonal
 Ag: Antígeno
 AID: *Activation-Induced Deaminase*
 Akt: *Serine/threonine-protein inase Akt*
 APOBEC: *Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme*
 APRIL: *A proliferation-inducing ligand*

B

Bach2: *Broad Complex-Tramtrack-Bric A Brac And Cap'n'collar Homology 2*
 BAFF: Factor Activador de Células B
 BAK: *Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer*
 BAX: *Bcl-2-Associated X Protein*
 BCAM: Antígeno Luterano del Grupo Sanguíneo / Molécula de Adhesión de Células Basales
 Bcl: *B-Cell Lymphoma*
 BCMA: *B-cell Maturation Antigen*
 BCR: Receptor de Células B
 BIM: *Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death*
 BLK: *B-cell Lymphocyte Kinase*
 Blimp-1: *B-lymphocyte Induced Maturation Protein 1*
 BMSC: *Bone Marrow Stromal Cells*
 BMP: Proteína Morfogénica Ósea
 βTD: Dominio Transmembrana de la Cadena β

C

CAR: Células Reticulares Abundantes en CXCL12
 CCL: *C-C Chemokine Ligand*
 CCND: *Cyclin D*
 CCR: *C-C Chemokine Receptor*
 CD: Células Dendríticas

CEi: Células Estromales Inflamatorias
 CF: Citometría De Flujo
 CG: Centro Germinal
 CP: Células Plasmáticas
 CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
 CXCR: *C-X-C Chemokine Receptor*
 CXCL: *C-X-C Chemokine Ligand*

D

DEPTOR: *DEP Domain-Containing Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Interacting Protein*

E

EEM: Enfermedad Extramedular
 EMD: *Extramedullary Disease*
 EMM: *Extramedullary Multiple Mieloma*
 EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
 ERK2: *Extracellular Signal-Regulated Kinases*
 ERM: *Ezrin, Radixin y Moesin*

F

FA: Adhesiones Focales
 FAK: Quinasa de Adhesión Focal
 FC: *Flow Cytometry*
 FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos
 FLC: *Free Light Chains*
 FN: Fibronectina
 FoxO1/3a: *Forkhead Box Protein O1/3^a*
 Fyn: *Proto-oncogene Tyrosine-Protein kinase Fyn*

H

HGF: *Hepatocyte Growth Factor*
 HLA: *Human Leukocyte Antigen*
 HS: Sulfato de Heparán
 HSC: *Hematopoietic Stem Cells*
 HYOU: *Hypoxia Up-regulated Protein*

I

ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*

Ig: Inmunoglobulinas

IGF-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IL: Interleucina

IRF: *Interferon Regulator Factor 4*

ISS: *International Staging System*

ITPR1: *Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1*

L

LAMB1: *Laminin Subunit Beta 1*

LAIR-1: *Leukocyte-associated Immunoglobulin-Like Receptor 1*

LB: Linfocitos B

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LEL: *Large Extracellular Loop*

LFA-1: *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*

LIF: Factor Inhibidor de la Leucemia

LLA Ph +: Leucemia Linfoblástica Aguda con Cromosoma Filadelfia Positivo

LP: Líquido Pleural

LPS: Lipopolisacárido

M

MAC-1: *Macrophage-1 Antigen*

MAdCAM-1: *Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1*

MAPK: *Mitogen-activated Protein Kinase*

MCP: Proteína Quimiotáctica de Monocitos

MEC: Matriz Extracelular

MEK: *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*

MGCS: *Monoclonal Gammopathies of Clinical Significance*

MGUS: *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MICA: *Class I Polypeptide-related Sequence A*

MIDAS: *Metal Ion-dependent Adhesion Site*

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

miRNA: microRNA

MM: Mieloma Múltiple

MO: Médula Ósea

MoAb: *Monoclonal Antibodies*

MTA3: *Metastasis Associated 1 Family Member 3*

mTORC1: *Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*

Myb: *Myeloblastosis Transcription Factors*

MYDGF: *Myeloid Derived Growth Factor*

MZB1: *Marginal Zone B And B1 Cell Specific Protein*

N

NCAM: Molécula de Adhesión de Células Neurales

NK: Natural Killer

NF-Kb: *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells*

NOTCH: *Neurogenic Locus Notch Homolog Protein*

O

OBF-1: *OCT-Binding Factor-1*

OCT-2: *Organic Cation Transporter 2*

OSM: Oncostatina-M

P

PAX-5: *Paired Box 5*

PC: Plasma Cell

PD-1: *Programmed Death 1*

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*

PRDM1: *PR domain zinc finger protein 1*

PF: *Pleural Fluid*

PI3K: Fosfatidilinositol- 3-Kinasa

PRAF2: *PRA1 Domain Family Member 2*

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

PUMA: *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*

R

RAC1: *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*

RAF: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinase*

RANK-L: Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand

RAS: *Rat Sarcoma Virus GTPase*

RCN1: Reticulocalbin 1

RGD: Arginina / Glicina / Aspártico

R-ISS: *Revised International Staging System*

RUNX-2: *Runt Related Transcription Factor 2*

S

S1P: Esfingosina-1-Fosfato

S1P₁: *Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1*

SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SEL: *Small Extracellular Loop*

SDF: *Stromal Cell Derived Factor*

SDF2L1: *Stromal Cell-derived Factor 2-Like Protein 1*

SHP1: Proteína Tirosina Fosfatasa 1

SIL: *Small Intracellular Loop*

SLAMF7: *SLAM Family Member 7*

SLC25A4: *Solute Carrier Family 25 Member 4*

SMM: *Smoldering Multiple Myeloma*

SPARC: *Secreted Protein Acidic Rich in Cystein*

SPF: *Subcapsular Proliferative Foci*

Src: *Proto-oncogene Tyrosine-protein kinase Src*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SyMBS: Sitio Sinérgico de Unión a Iones Metálicos

SyK: *Tyrosine-protein Kinase SYK*

T

TACI: *Transmembrane Activator and CAML Interactor*

TD: Timo Dependientes

TGF-β: *Transforming Growth Factor Beta*

THD: *Head domain*

TIAM1: *T-cell Lymphoma Invasion and Metastasis-inducing Protein 1*

TIGIT: *T cell Immunoglobulin and ITIM Domain*

TEM: *Tetraspanin-Enriched Microdomains*

Tfh: T-Foliculares Auxiliares

TI: Timo Independientes

TLR: *Toll Like Receptors*

TMD: Dominio Transmembrana

TMS: Dominios Transmembrana

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TP53I11: *Tumor Protein P53 Inducible Protein 11*

TRAF: *TNF Receptor-Associated Factor*

TRAP1: *Heat Shock Protein 75 kDa*

TSPAN: Tetraspaninas

V

VCAN: Versican

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesión Molecule-1*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

VLA: *Very Late Antigen*

VTN: Vitronectina

VWA: Von Willebrand A

W

WHSC1: *Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate-1*

WNT: Wingless e Int proteinS

Z

ZM: Zona Marginal

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

Las gammapatías monoclonales son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la expansión de un clon de células plasmáticas (CP). Se considera que las discrasias de CP representan una línea continua con distintas etapas: desde la fase pre-maligna, la gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) hasta el mieloma múltiple (MM) asintomático, también llamado MM *smoldering*, el MM activo y, finalmente, la enfermedad extramedular (EEM). Todas estas entidades representan una gama de enfermedades clonales que van ganando en agresividad. En la mayoría de estas entidades, las CP están retenidas en la médula ósea (MO), con una fuerte dependencia respecto al microambiente medular. La adhesión en las fases iniciales de la enfermedad facilita la resistencia a la apoptosis y también induce la secreción de factores de crecimiento y citoquinas. Se considera que el cambio en el perfil de las moléculas de adhesión es un mecanismo importante que contribuye a la diseminación extramedular del MM. Entre estas moléculas, se ha descrito una expresión disminuida de VLA-4 (CD49d) y CD44.

Sin embargo, no se conocen bien los eventos celulares que conducen a la transición inicial desde la fase pre-maligna hasta el MM activo. Por otro lado, es sorprendente la información muy limitada no solo acerca de la pérdida de capacidad adhesiva de las CP en la EEM, sino también acerca de la biología de las CP que se encuentran en territorios distintos a la MO.

Objetivos y Métodos

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Un acercamiento alternativo para el estudio de los cambios en la expresión cuantitativa y, sobre todo, cualitativa de las β 1 integrinas (CD29) y de las tetraspaninas (CD9) en las CP en las diferentes etapas de las gammapatías monoclonales
- Establecer una correlación entre los hallazgos fenotípicos y las capacidades tanto adhesivas como aquellas relacionadas con la activación de integrinas y tetraspaninas
- Encontrar un biomarcador de progresión de la enfermedad

Las CP procedían de aspirados de MO, de líquido pleural (LP) o de líquido cefalorraquídeo (LCR). Las CP se identificaron por citometría de flujo (CF) como células CD38⁺⁺CD138⁺⁺. Para estudiar la expresión constitutiva de CD29 y CD9, se utilizaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-CD29 clon MAR4 y los AcMo anti-CD9 clones ALB6 o M-L13. Y para evaluar el estado de activación de las moléculas CD29 y CD9, se utilizaron los AcMo que reconocen específicamente los epítomos conformacionales CD29 HUTS21 y CD9 PAINS13, respectivamente.

Se utilizó el catión divalente Mn²⁺ como estímulo tanto para la activación de CD29 como para impulsar la capacidad adhesiva de las CP, así como para un posible efecto regulatorio respecto a la expresión del epítomo PAINS13. Los ensayos de adhesión se realizaron en placas de cultivo revestidas con fibronectina (FN) o con BSA como control negativo. Se utilizaron CP purificadas y biotiniladas, cuantificándose la adhesión utilizando un método colorimétrico. Los ensayos de inhibición de la adhesión se realizaron utilizando AcMo bloqueantes.

Resultados

Los niveles de CD29 constitutivo (CD29 MAR4) y activado (CD29 HUTS21) disminuyeron gradualmente conforme progresaba la enfermedad, con los máximos niveles de expresión en los pacientes con MGUS y con bajos niveles de CD29 MAR4 y pérdida casi completa de la forma activa determinada con CD29 HUTS21 en las CP de los pacientes con EEM. Además, se observó una fuerte correlación entre los resultados obtenidos con el método citométrico y los obtenidos en los ensayos de adhesión y de activación con cationes. De hecho, las CP procedentes de muestras de LP o de LCR fueron totalmente refractarias a la activación mediada por Mn²⁺ y la adhesión a FN fue nula, conformando un comportamiento biológico no descrito hasta el momento en CP. Además, en un grupo de pacientes con expresión baja de CD29 MAR4, las CP expresaron con el doble de intensidad la cadena $\alpha 4$ (CD49d) con respecto a $\beta 1$, lo que indicaba que la cadena $\alpha 4$ (CD49d) establecía una unión funcional con otra proteína además de con $\beta 1$. Estas células expresaron niveles intermedios a altos de $\beta 7$, si bien la combinación $\alpha 4\beta 7$ no restauró los niveles normales de activación por cationes ni tampoco de adhesión a FN. Por último, las CP expresaron niveles variables de expresión de CD9 que correlacionaron con la intensidad de expresión de CD29. La co-expresión de CD9 y CD81 en CP amplificó la señal de CD29 en el análisis por CF, sugiriendo un nexo entre las dos

tetraspaninas y la $\beta 1$ integrina. Además, las CP expresaron CD9 portando el epítipo funcionalmente relevante PAINS13 asociado en otras células a la activación previa de la $\beta 1$ integrina. En CP el epítipo mostró una regulación diferente a la descrita.

Conclusiones

Nuestro trabajo demuestra que los estados constitutivo y activo de CD29 son excelentes biomarcadores de la progresión de la enfermedad, desde el primer estadio de MGUS hasta la etapa más agresiva de la EEM, una entidad que carece de una información mínima en lo que respecta a sus características biológicas. La contribución al conocimiento de la fisiopatología se vio reforzada con el resultado de los ensayos funcionales. Las CP de MO también expresaron el epítipo relevante desde un punto de vista funcional CD9 PAINS13 que, aunque se ha relacionado con la activación previa de CD29 en otras células, en las CP parece estar regulada por una vía diferente.

SUMMARY

SUMMARY

Introduction

The monoclonal gammopathies are defined as a heterogenous group of diseases characterized by proliferation of a single clone of plasma cells (PC). There is a continuum of PC dyscrasias: from pre-malignant disorder called monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) to indolent asymptomatic multiple myeloma (MM) (smoldering myeloma), then to active multiple myeloma and finally extramedullary disease (EMD). Together, these conditions form a spectrum of clonal disorders. During the course of these diseases, PC remains located within the bone marrow (BM) with strong dependence on the BM microenvironment. The initial adhesion affects the survival of MM cells and also mediates secretion of growth factors and cytokines. Subsequent changes in the adhesion molecule profile have been considered as possible mechanisms in the extramedullary dissemination in MM. Specifically, decreased expression of adhesion molecules such as CD49d or CD44 have been described.

However, cellular events driving the initial transition from a premalignant stage to early active MM are not well understood. Moreover, it is surprising not only the very limited information about the mechanisms underlying the detachment of PC in EMD, but also the biology of PC at the extramedullary sites in comparison with the characteristics of the malignant PC in BM.

Objectives and methods

The objectives of this work were:

- An alternative approach to study the changes in the quantitative and, especially, qualitative expression of $\beta 1$ integrins (CD29) and tetraspanins (CD9) in PC during the different stages of monoclonal gammopathies
- To establish a correlation between phenotypic findings and adhesive and integrin or tetraspanin activation capabilities
- To find a biomarker of disease progression

PC were obtained from BM aspirates, pleural fluid (PF) or cerebrospinal fluid (CSF). PC were identified as CD38⁺⁺CD138⁺⁺ cells by flow cytometry (FC). To study by FC constitutive levels of CD29 and CD9 antigens, CD29 clone MAR4 and CD9 ALB6 or M-L13 clones were used. To evaluate the activation state of CD29 and CD9 molecules,

monoclonal antibodies (MoAb) that selectively react with conformational epitopes, CD29 clone HUTS21 and CD9 clone PAIN13 were used.

The divalent cation Mn^{2+} was used as a stimulus for the activation of CD29 and the adhesive properties of $\beta 1$ integrins and to measure its effect on the PAIN13 expression. Adhesion assays were performed in tissue culture plates precoated with fibronectin (FN) or BSA as negative control. Biotynilated purified PC were seeded and cell adherence was quantified using a colorimetric assay. Adhesion inhibition assays were performed by using blocking MoAb.

Results

Constitutive (CD29 MAR4) and activated (CD29 HUTS21) levels of $\beta 1$ integrin were gradually decreased as the disease progressed, with maximum levels of expression in MGUS patients, and low levels of CD29 MAR4 and almost complete loss of CD29 HUTS21 in PC from EMD patients. Moreover, there was a strong correlation between results obtained with the cytometric method and cation activation or adhesion assays. In fact, purified PC obtained from PF or CSF of EMD patients expressed constitutive low levels of CD29 totally refractory to Mn^{2+} activation, and their adhesion to FN was abolished, showing a biological behavior not described so far. In a group of patients, the $\alpha 4$ (CD49d) subunit was observed to be twice the level of $\beta 1$ subunit in PC, suggesting that the $\alpha 4$ subunit are not all functionally associated with the $\beta 1$ subunit. These PC expressed intermediate to high levels of $\beta 7$ integrin, but $\alpha 4\beta 7$ combination did not restore normal activation or adhesive properties. Finally, PC expressed variable percentages of CD9, especially in MM patients, but these levels correlated with $\beta 1$ fluorescence intensity. Co-expression of CD9 and CD81 tetraspanins amplified CD29 signal in FC analysis, indicating a link between both tetraspanins and $\beta 1$ integrins in PC. PC expressed CD9 PAIN13, a functionally relevant epitope associated in other cells with previous activation of $\beta 1$ integrin. However, in PC CD9 PAIN13 epitope was regulated differently.

Conclusions

Our work has shown that constitutive and active states of CD29 are excellent biomarkers in the progression from MGUS to EMD, an entity with a lack of information regarding its biological characteristics. The contribution to the pathophysiology of the disease was reinforced by functional assays. BM PC also expressed tetraspanin CD9

PAINS13, a functionally relevant epitope that, although usually related with CD29 activation, was differentially regulated with respect to what is described in other cells.

INTRODUCCIÓN

1. Diferenciación de células B: las células plasmáticas

1.1. Origen y generación de las células plasmáticas en ganglio

Las células plasmáticas (CP) representan el estadio madurativo final de los linfocitos B (LB), siendo responsables de la producción de la mayoría de anticuerpos circulantes. Dependiendo del tipo de predecesor del LB, su localización anatómica en los tejidos linfoides, las citocinas del medio, el tipo de antígeno (Ag), la ubicación en la que se establece el encuentro con el Ag y las células accesorias implicadas, pueden generarse diferentes tipos de CP en lo que respecta a vida útil, localización final, expresión de marcadores de superficie celular, factores de transcripción y secreción de inmunoglobulinas (Ig) (1).

Existen dos regiones clave para el desarrollo de las CP:

1. región extrafolicular: área situada fuera de los folículos linfoides (en la primera fase tanto de la vía canónica como de la vía no canónica) y
2. región intrafolicular: área situada en el interior del folículo linfoide, en concreto en el centro germinal (CG) (segunda fase de la vía canónica).

Las CP que surgen de la vía intrafolicular (es decir, aquellas que proceden del CG) son predominantemente de larga vida y capaces de migrar y de alojarse en la MO, mientras que tradicionalmente las de origen extrafolicular se han considerado como CP de corta vida y no migratorias, si bien se ha observado que en respuestas inmunes a antígenos independientes de células T o bajo condiciones experimentales en las que se bloquea la formación de centros germinales, las células B se diferencian en CP de apariencia blástica en áreas extrafoliculares, que ulteriormente pueden convertirse en CP de larga vida (1). Por otra parte, también se ha demostrado que los LB de memoria pueden posicionarse inicialmente en un nicho subcapsular de los ganglios. Allí proliferan rápidamente y se diferencian en CP secretoras de anticuerpos en los focos proliferativos subcapsulares (*subcapsular proliferative foci*: SPF) al ser reactivados por el Ag. Comparados con los centros germinales secundarios “tradicionales”, los SPF manifiestan una “firma” molecular de célula única y un patrón diferente tanto de migración celular como de generación de CP (2).

1.2. Origen y generación de las células plasmáticas en bazo

En el bazo, los LB que primeramente entran en contacto con el antígeno particulado son los que residen en la zona marginal (ZM). Las células B de la ZM generan rápidamente CP de vida corta, independientemente de la ayuda de las células T. En este proceso, STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) es un mediador esencial de la respuesta de anticuerpos mediada por TLR (*Toll like receptor*) (3). Estas células muestran tempranamente signos de los primeros cambios transcripcionales necesarios para la diferenciación a CP, ya que expresan mayores cantidades de Blimp-1 (*B-lymphocyte induced maturation protein 1*) y niveles reducidos de Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*) en comparación con las células B foliculares (B-2) (4)

Las células B-1, al igual que los LB de la ZM, están preparadas transcripcionalmente para montar una respuesta rápida en ausencia de la co-estimulación de células T, generando plasmablastos secretores de Ig que pueden persistir durante varias semanas después de la exposición inicial al antígeno. Este tipo de células responden específicamente a antígenos timo independientes (TI) y pueden cumplir el papel de células presentadoras de antígenos (5).

El tipo de antígeno al que se exponen los LB también puede determinar su destino final. Los antígenos TI-1, como el lipopolisacárido (LPS), actúan independientemente del receptor de células B (BCR) para inducir la proliferación, diferenciación y la consiguiente secreción de anticuerpos. Los antígenos TI-2, tipificados por antígenos multivalentes como los polisacáridos, necesitan señalización a través del BCR. La diferenciación de células B inducida por antígenos TI-2 requiere de segundas señales como la de los TLR, varios de los cuales se expresan en los LB (6).

1.3. Influencia del tipo de antígeno en la generación de CP

La supervivencia y la diferenciación continua de las células extrafoliculares productoras de anticuerpos dependen de la unión de BAFF [factor activador de células B que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)], secretado por las células dendríticas (CD). Los focos formados en la respuesta extrafolicular al antígeno se mantienen inicialmente gracias a un bloqueo en la activación de caspasas apoptóticas que prolonga la supervivencia de las CP en condiciones de estrés del retículo endoplásmico. Posteriormente, estos focos desaparecen tras un proceso de apoptosis (7), no sin antes

generar CP de larga duración durante el proceso (8). La principal producción de anticuerpos que surge de la inmunización con TI-2 está restringida a focos extrafolículos (9).

Cuando los LB reciben colaboración de las células T afines, siguen la vía de diferenciación del CG. Una vez allí, detienen su diferenciación para permitir la maduración de la afinidad y el cambio en el isotipo de Ig. La gran mayoría de Ag generan respuestas de anticuerpos sólo si las células T helper CD4+ están presentes para ayudar a la activación de las células B. En este proceso, es el antígeno quien realiza la selección de clones de células B foliculares. Este tipo de antígeno es conocido como antígeno timo dependiente (TD) (10)

Los antígenos TD, al contrario de lo que se consideró inicialmente, también pueden provocar formación de focos extrafolículos con hipermutación somática de sus LB. En los CG establecen respuestas de larga duración con cambios de isotipo, hipermutación somática, generación de células B de memoria y de CP de larga duración (11).

Cuando un LB folicular es activado por su Ag, puede formar bien un foco extrafolicular o acceder al CG. Tradicionalmente se ha considerado que la vía elegida por un LB dependía de la fuerza de la interacción entre su BCR y el Ag específico: interacciones de alta afinidad generan una diferenciación extrafolicular temprana, mientras que las de baja afinidad dirigen la entrada del LB hacia al CG (12). Sin embargo, posteriormente se determinó que los CG son mucho más indulgentes al permitir la retención de células que expresan receptores no solo de baja sino también de moderada afinidad, incluso cuando existe competencia por un mismo epítipo (13). A pesar de estos hallazgos, son muchas las evidencias que acreditan que las CP derivan exclusivamente de una reacción clásica de CG (14).

Una vez que los LB foliculares son activados por el antígeno TD, se aumenta la expresión de CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) en su membrana, atrayéndolas a la interfaz situada entre las áreas de células T y B, zona en que la expresión de CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor type 5*) garantiza la ubicación estable de las células B. Al mismo tiempo, las células T que han sido activadas por un péptido derivado del mismo antígeno, previamente presentado por las CD en el área de las células T, regulan positivamente CXCR5 y migran hacia el folículo (15). De este modo, la migración coordinada de células

B y T con afinidad por el mismo antígeno, aumenta la probabilidad de un encuentro en la interfaz y pueda iniciarse una respuesta inmune productiva.

La producción de IL-21 (interleucina 21) por las células T es esencial para la formación de focos de células secretoras y actúa principalmente sobre las células B en el interior del CG, siendo un mediador fundamental para su diferenciación. La IL-21 se ha identificado como la citoquina definitoria de las células T-foliculares auxiliares (Tfh) (16).

CD40 y CD154 (CD40L) encarnan otra interacción molecular necesaria para la inducción de la proliferación y diferenciación de los LB, tanto en los focos extrafolículos como en los centros germinales por activación del NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) mediado por TRAF (*TNF receptor-associated factor*) (17).

1.4. Programa genético en la diferenciación de CP: papel multifuncional del factor de transcripción Blimp-1

La proteína Blimp-1, codificada por el gen *Prdm1* (*PR domain zinc finger protein 1*), es considerada el “regulador maestro” de la diferenciación de las CP ya que sustenta el programa genético que promueve su formación. El modelo más aceptado de la diferenciación de las CP se elabora en un contexto de antagonismo mutuo entre dos conjuntos de factores de transcripción: los que derivan hacia programas de expresión génica de LB maduros, como Pax5 (*Paired Box 5*) y Bcl6, y los que determinan el programa de CP, como Blimp-1 y el factor regulador de interferón 4 (*interferon regulator factor 4*: IRF4). De hecho, Blimp-1 silencia en células B varios genes responsables de la presentación de antígeno o del switch en el proceso de recombinación, a la vez que favorece la expresión génica de proteínas relacionadas con la secreción de las inmunoglobulinas. A su vez, la vía predeterminada de diferenciación de las CP requiere que la actividad de Pax5 se reduzca mientras se induce la expresión de Blimp-1, cuya expresión es fundamental para la diferenciación total de las CP. La inducción de Blimp-1 probablemente ocurre después de la inducción de IRF4 como resultado de una señal de diferenciación. Dicha señal puede emplear la inducción de IRF4 mediada por NF- κ B. Tras la inducción de Blimp-1, el programa de expresión génica de células B maduras se extingue y se produce la diferenciación de CP (18).

Bcl6, Bach2 (*Broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2*) y MTA3 (*Metastasis Associated 1 Family Member 3*) son genes expresados en el CG que regulan negativamente la diferenciación de las CP, ya que funcionan como represores transcripcionales inhibiendo la actividad de Blimp-1. Pueden suprimir la diferenciación en el CG e incluso permitir la regresión a estados madurativos previos cuando se elimina DEPTOR (*DEP domain-containing mechanistic target of rapamycin (mTOR)-interacting protein*), dando a este último un papel fundamental en el mantenimiento de la diferenciación de la CP (19). Por otra parte, STAT3, OBF-1 (OCT-binding factor-1) y OCT2 (*Organic cation transporter 2*) integran señales proporcionadas por las células T y las citocinas para promover también la diferenciación de las CP (20).

1.5. Capacidad migratoria de los plasmablastos

1.5.1. Salida de los plasmablastos desde los órganos linfoides secundarios a sangre periférica

Aunque los plasmablastos son células capaces de sintetizar y secretar anticuerpos, su proceso de maduración no concluye hasta que migran a órganos de alojamiento final, tales como la MO o el intestino. En la primera fase de este proceso migratorio, los plasmablastos abandonan los órganos linfoides secundarios. Los mecanismos moleculares implicados en la salida o entrada de los plasmablastos en un órgano se conocen solo parcialmente. En un modelo murino y en la primera fase de este proceso migratorio, la $\beta 2$ integrina (CD18) expresada en los plasmablastos es esencial para interactuar con su ligando ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) (CD54), expresado fuertemente en los cordones medulares del ganglio (la pulpa roja en el caso del bazo), un lugar de salida idóneo para abandonar los órganos linfoides secundarios (1). Es en este punto donde comienza la vía hematológica en la diseminación de los plasmablastos. En concreto y en este modelo de ratón, la primera oleada de plasmablastos aparece en sangre periférica aproximadamente una semana después que las células B hayan tomado contacto con el antígeno y se hayan diferenciado a células productoras de anticuerpos (21, 22). Esta dinámica temporal es similar en humanos, donde los plasmablastos específicos tras la vacunación aparecen mayoritariamente en el día 6 o 7, declinando de forma rápida (23).

En el proceso de migración también interviene la señalización mediada por la esfingosina-1-fosfato (S1P). De nuevo en un modelo murino, se ha demostrado que la

ausencia del receptor para S1P en las células B, denominado S1P₁ (*Sphingosine-1-phosphate receptor 1*) no impide la generación de plasmablastos en el bazo o en las placas de Peyer, pero sí su salida a sangre y su alojamiento en la MO. A su vez, los plasmablastos circulantes expresan mayor cantidad del receptor S1P₁ que aquellos que permanecen en los órganos linfoides secundarios, sugiriendo que la expresión diferencial de S1P₁ es un punto de control en el proceso de retención *versus* salida a la circulación de los plasmablastos de los órganos linfoides secundarios (24).

1.5.2. Transmigración de los plasmablastos a MO (y otros territorios): contribución de las moléculas de adhesión y quimioquinas

El destino definitivo de las CP es la MO o, también, diferentes áreas mucosas, especialmente la lámina propia del intestino. Las vías que utilizan los plasmablastos para entrar en la MO permanecen en gran medida desconocidos. Presumiblemente, los plasmablastos ingresan en la MO a través de venas sinusoidales, pero los mecanismos que median su migración no se han dilucidado en detalle. Posibles candidatos involucrados en este proceso parecen ser la selectina CD62L y la molécula CD22 (25). La integrina $\beta 1$ activada, la forma con alta afinidad por sus ligandos, parece jugar también un papel relevante en la capacidad migratoria de los plasmablastos a la MO, ya que en ratones knock-out para la cochaperona Mzb1 (*Marginal Zone B And B1 Cell Specific Protein*), esencial en el proceso de activación de la integrina $\beta 1$, los plasmablastos migran de forma defectuosa al microambiente medular (26).

Además de la presencia de ciertas moléculas de adhesión, el proceso de migración desde la SP hasta la MO está guiado por la expresión de receptores de quimioquinas en la membrana de los plasmablastos y por un gradiente de concentraciones de las quimioquinas correspondientes. En concreto, el eje CXCR4 C-X-C (*chemokine receptor type 4*) / CXCL12 (*C-X-C Chemokine Ligand 12*) es uno de los principales factores que garantizan el alojamiento y el mantenimiento de las CP en la MO. Es necesario recalcar que la quimioquina CXCL12, producida por las células del estroma, puede interactuar con el sulfato de heparina y algunas proteínas de la matriz extracelular (MEC), hallazgos que sugieren que CXCL12 se encuentra inmovilizado en la MO en lugar de fluir libremente (27). La importancia de CXCL12 en la fisiología de las células secretoras de anticuerpos es doble, ya que no solo desempeña un papel en el alojamiento

de los plasmablastos en la MO, sino que también promueve la adhesión y la migración a través del endotelio de la MO, ayudando posteriormente a culminar el proceso de maduración hacia CP y la retención en la MO, en estrecho contacto con las células estromales (28).

Mientras que los plasmablastos circulantes se alojan en la MO siguiendo un gradiente de concentración de CXCL12 dependiente de la expresión de CXCR4 en los plasmablastos IgG, la migración al intestino de los plasmablastos IgA es guiada por los receptores de quimioquinas CCR9 (*C-C Chemokine Receptor 9*) y CCR10 (*C-C Chemokine Receptor 10*). Los plasmablastos IgA pueden alojarse no solo en el intestino, sino también en otros tejidos que expresen CCL28 (*C-C chemokine ligand 28*), como la mucosa respiratoria o la oral. Aunque las células que expresan IgA provenientes de mucosas podrían ser atraídas por CXCL12, se desconocen los mecanismos exactos subyacentes que permiten su aporte al total de CP residentes de MO. Sin embargo existen hallazgos que apuntan a diferencias de expresión génica en S1P₁ y la integrina VLA-5 (*Very Late Antigen 5*) como mecanismos potenciales (26).

Una vez alojadas en la MO, las CP pueden migrar hacia otros huesos o hacia el bazo, mostrando un patrón en el que se alternan cortos períodos de alta motilidad promovidos por APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) y por CXCL12 y su receptor CXCR4, con largos intervalos en el que las CP están detenidas debido a un fuerte anclaje al microambiente medular promovido por CD49d (VLA-4) (29).

Por otro lado, las CP que carecen de Shp1 (proteína tirosina fosfatasa 1) exhiben una activación aberrante de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) debido a la señalización desregulada de Src- (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) y PI3-quinasa (fosfatidilinositol-3-kinasa) manifestando una migración atenuada *in vitro* y una localización deficiente en la MO cuando se reconstituyen *in vivo*. La interrupción de la interacción $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 reafirma este defecto (30). Otro factor que interviene de forma decisiva en la migración de los plasmablastos a la MO es el factor de transcripción c-Myb (*Myeloblastosis transcription factors*), ya que en su ausencia no se detectan en SP ni en MO CP IgG+ específicas tras infección o inmunización, siendo incapaces de responder a un gradiente de CXCL12 (31).

2. La médula ósea y su microambiente

2.1. Fisiología de la MO

La MO es un tejido blando ubicado en las cavidades centrales de los huesos axiales y los huesos largos. Consiste en islas de tejido hematopoyético y células adiposas rodeadas por senos vasculares intercalados dentro de una red de hueso trabecular. Provee los elementos básicos para la producción, regulación y mantenimiento de las células hemáticas, con una producción promedio diaria de 500 mil millones de células sanguíneas maduras (32). Representa el 5% del peso corporal y es además considerada como uno de los órganos reticuloendoteliales más importantes (33). Otras de sus funciones son el transporte de oxígeno, la defensa contra elementos invasores, la hemostasia y la eliminación del material anómalo o senescente, con la participación de sus elementos celulares y los de la sangre periférica. La MO de los huesos largos (p. ej., fémur) y de los huesos planos (p. ej., parietales) es tributaria de una gran cantidad de vasos nutricios que proporcionan, desde la circulación general, nutrientes, hormonas, oligoelementos, entre otros factores, y a la vez permiten la salida de los elementos formes de la sangre recién generados (34). En los huesos largos, las arterias longitudinales centrales dan lugar a arterias radiales que a su vez se ramifican en arteriolas cerca del endostio donde se anastomosan con un plexo de senos venosos. Los sinusoides venosos consisten en una capa de células endoteliales planas con poca o ninguna membrana basal y se extienden hacia la cavidad central donde se fusionan en un gran seno central. Además, poseen numerosas fenestras y es posible que sean los principales lugares de salida de leucocitos desde la MO a la circulación periférica. La médula no dispone de drenaje linfático (35).

Macroscópicamente se distinguen dos tipos de MO: la MO amarilla, compuesta principalmente por células adiposas, y la MO roja constituida por el conjunto de células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) y células progenitoras de las que surgirán los diferentes linajes o series celulares medulares (serie mieloide, serie linfoide, serie eritroide, serie megacariocítica) en diferentes grados de diferenciación hasta llegar a células maduras (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos T y B, células NK (*natural killer*), eritrocitos, plaquetas y células dendríticas) (36).

2.2. El “nicho” en el microambiente de la MO: interacciones

Si bien el concepto de nicho surge en el campo de la ecología para describir la sumatoria de los requerimientos del hábitat que le permite a una especie persistir y prosperar, describe perfectamente la serie de interacciones necesarias para garantizar una hematopoyesis mantenida en condiciones de normalidad. Estas islas de tejido están sujetas a una dinámica de interacciones dependientes de los factores transcripcionales propios de las HSC y de la composición celular y molecular del entorno, generando lo que se conoce como nicho medular, que será el que pautará el destino y la diferenciación final de la célula hematopoyética.

Las HSC y las células progenitoras están soportadas por un entramado de células estromales que proporcionan contacto célula-célula. El entramado posee dos funciones principales: proveer un sustrato adhesivo al cual puedan unirse las células en división y diferenciación y producir factores de crecimiento hematopoyéticos (37).

Existen dos tipos principales de nichos donde pueden ser encontradas las HSC: un nicho endóseo donde las HSC están en proximidad con un subconjunto de osteoblastos fusiformes N-cadherina positivos; y un nicho vascular revestido por células endoteliales sinusoidales y derivados de células estromales mesenquimales (38).

Al igual que las HSC y las células progenitoras necesitan de un nicho para permanecer y sustentarse en la MO, las CP dependen del acceso a nichos altamente especializados que les proporcionen el microambiente necesario para garantizar su supervivencia a largo plazo. Este nicho asegura las interacciones de varios tipos de células proporcionando un conjunto de señales de supervivencia superpuestas y parcialmente redundantes.

2.2.1. Componentes celulares

2.2.1.1. Células de estroma

En ratones se han identificado hasta seis tipos celulares con diecisiete subconjuntos de células estromales con perfiles genéticos reguladores de la hematopoyesis, así como subpoblaciones fibroblásticas y osteoblásticas (39). Proviene de una ontogenia no hematopoyética e incluyen una variedad de células endoteliales, mesenquimatosas y neurales (40). Entre ellas, las más relevantes para el mantenimiento

de la supervivencia y la función celular dentro del nicho son las células madre/estromales mesenquimales de médula ósea. Representan apenas entre el 0,001% y el 0,1% de las células nucleadas de la MO. Morfológicamente son células fibroblastoides adherentes con capacidad para producir citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas como IL-6 y CXCL12, que median en la migración a la MO de células que expresan CXCR4, en su retención así como en el proceso de maduración final de las CP (41). Permanecen en estrecho contacto con las CP a través de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29) y $\alpha L\beta 2$ (LFA-1) ya que expresan VCAM-1 (1). Esta función particular parece depender de la tetraspanina CD37, que interviene en la distribución de $\alpha 4\beta 1$ en la membrana, permitiendo así la señalización a través de la vía de supervivencia Akt (*Serine/threonine-protein kinase Akt*) (42)

2.2.1.2. Otros tipos celulares

Otra célula que parece jugar un papel importante en la formación del nicho son las células reticulares abundantes en CXCL12 (CAR) ya que no solo atraen a las CP CXCR4+ / VLA-4+ / LFA-1+ sino también a células hematopoyéticas de otros linajes como monocitos, eosinófilos y megacariocitos, que expresan el mismo conjunto de moléculas de adhesión y por lo tanto se reclutan en la proximidad (43).

Otra células que aportan señales de supervivencia al microambiente altamente complejo del nicho medular incluye eosinófilos, megacariocitos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T, osteoclastos y células adiposas, muchos de ellos productores de APRIL, un factor clave en la supervivencia a largo plazo de las CP (44). Se ha demostrado *in vitro* que los eosinófilos producen APRIL e IL-6 y que favorecen la supervivencia de las CP (45). Aproximadamente el 50% de los plasmablastos recién inmigrados a la MO están en contacto directo con los eosinófilos. También se ha demostrado que los megacariocitos de la MO son productores de APRIL e IL-6, aunque manifiestan una interacción física con las CP menos evidente que la de los eosinófilos (46). Se ha demostrado en modelos murinos que los monocitos Ly6C^{hi} producen APRIL (43, (47) y que los precursores mieloides son una fuente importante de APRIL en humanos (48). En ratones, se ha demostrado que los basófilos apoyan la supervivencia de las CP al producir IL-4 e IL-6 *in vitro* e *in vivo* (49). Adicionalmente, se ha determinado que las CD establecen contactos funcionales con las CP de la MO: la molécula CD80/86 de la superficie de las CD interactúa con el CD28 de las CP de la MO, lo que promueve

su supervivencia mediante la activación de las vías Vav y NF- κ B (50). Las células del estroma reticular (51), los osteoblastos (52), y los osteoclastos (53) también juegan un papel en el mantenimiento de las CP a largo plazo. Incluso las propias CP pueden expresar APRIL generando un bucle autocrino (54).

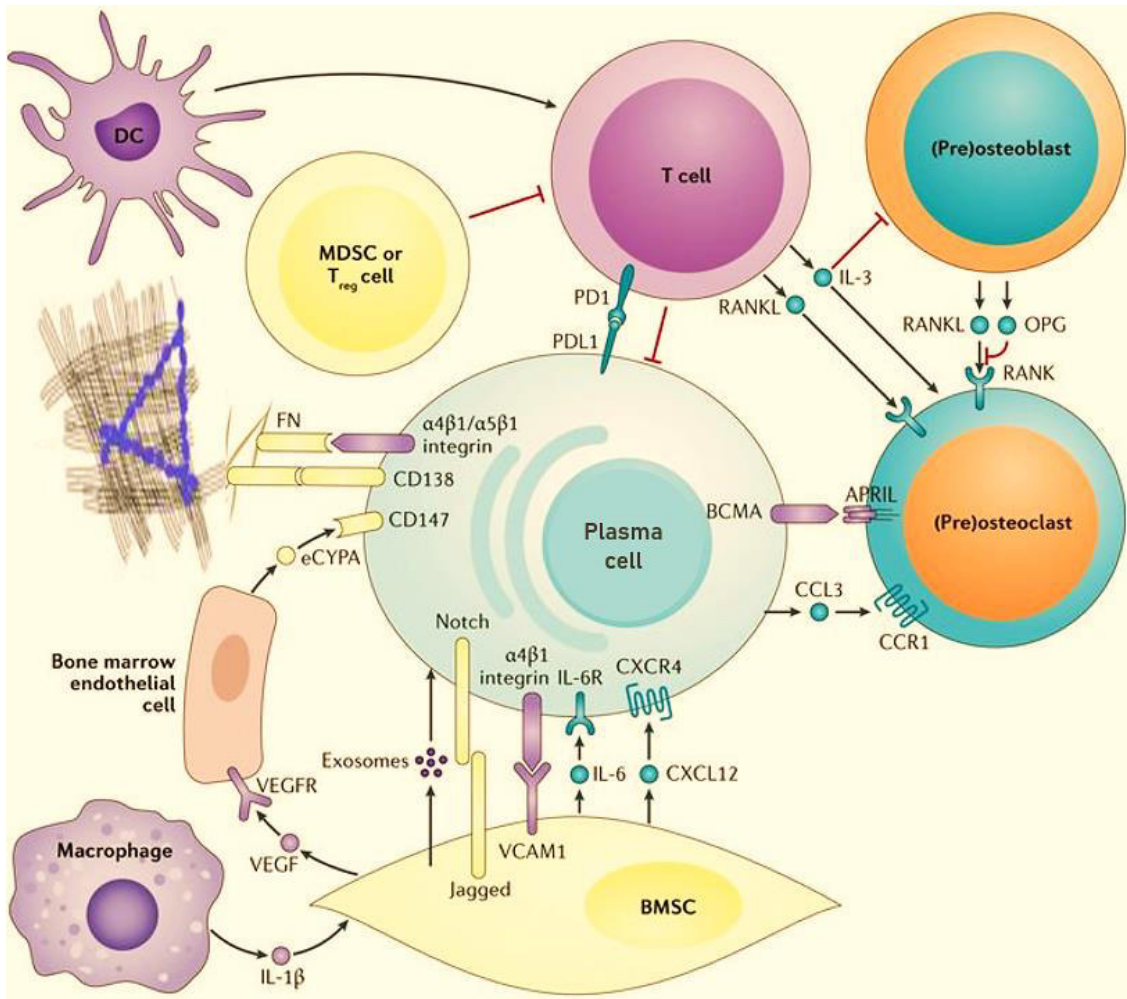


Figura 1. Microambiente de la médula ósea. Adaptado de Shaji K Kumar (2017). Multiple myeloma

2.2.2. Componentes moleculares

2.2.2.1. Factores solubles

El factor de activación de células B (BAFF), APRIL, la quimiocina CXCL12 y la IL-6, han demostrado un papel en el mantenimiento de la supervivencia de las CP en el nicho medular (55). APRIL se puede sintetizar en forma soluble por células que no están en contacto con las CP, aunque podría acumularse en los nichos mediante su retención en el tejido al unirse a proteoglicanos (56). Las citocinas BAFF y APRIL interactúan con

sus receptores TACI (*Transmembrane activator and CAML interactor*) y BCMA (B-cell maturation antigen) y evitan la activación de la caspasa 12 proporcionando una segunda señal de supervivencia junto a la señal proveniente de la activación de las integrinas y su vía de señalización de PI3K, que regula a la baja FoxO1/3a (*Forkhead box protein O1/3a*) y reprime la activación de las caspasas 3 y 7 (57).

A su vez, la fibronectina (FN) producida por las células del estroma, un ligando para la molécula VLA-4 (CD49d) expresada por las CP, y las moléculas CD44 y CD28, también presentes en la membrana de las CP, desempeñan papeles relevantes en la supervivencia de las CP (58).

Otra característica destacable del microambiente medular es que posee una menor tensión de oxígeno, <10 mm Hg, que convierte a este territorio en un medio hipóxico si se le compara con otros órganos (59). Estudios de transcriptómica han demostrado que proteínas del secretoma de las células estromales mesenquimales y las condiciones hipóxicas juegan un papel significativo en la supervivencia de las CP utilizando mecanismos que regulan negativamente la señalización de mTORC1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*) (41).

2.2.2.2. Moléculas de superficie

Tradicionalmente se ha considerado que, en condiciones fisiológicas, las CP de MO se anclan de forma definitiva a su microambiente y que dicho anclaje está mediado por moléculas de adhesión. De hecho, se ha establecido una clara relación entre los denominados nichos de supervivencia de la MO y la inmunidad humoral de larga duración mediada por las CP, en la que factores tanto intrínsecos como extrínsecos participan en la adquisición de una memoria inmunológica que puede mantenerse durante décadas (60). Aunque los estudios respecto al repertorio de moléculas de adhesión que intervienen en la interacción de las CP normales con los componentes del microambiente medular no son tan numerosos como los existentes con las CP tumorales del mieloma múltiple (MM) (entre otros motivos porque las CP en una MO sana no suelen superar el 0,5% de la celularidad total medular), en términos generales se considera que los mecanismos que confieren a la CP normal de MO su naturaleza sésil son similares a los que justifican que el MM sea una enfermedad que se asienta en MO, con un componente circulante anecdótico en la gran mayoría de los pacientes. Numerosos estudios demuestran la importante contribución de las moléculas de adhesión en el asentamiento de las CP en el

microambiente medular, tales como las integrinas $\beta 1$ VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) (CD49d), VLA-5 (CD49e), la $\beta 2$ integrina LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) (CD11a), o el receptor tipo *homing* CD44, así como la molécula de adhesión ICAM-1 (CD54) (61).

2.2.2.2.1. Las $\beta 1$ integrinas (CD29): propiedades y clasificación

Las integrinas son una familia de moléculas de adhesión constituidas por glicoproteínas heterodiméricas transmembrana tipo I, que funcionan como los principales receptores de señalización para la adhesión celular y la conexión de los entornos intra y extracelulares. Las integrinas constan de 8 unidades β y 18 subunidades α que se emparejan de forma no covalente en 24 heterodímeros. Los diferentes heterodímeros se agrupan en subfamilias cuya denominación depende de la cadena beta que los conforme, de manera que, por ejemplo, los heterodímeros que contengan la cadena $\beta 1$ unida a algunas de las subunidades α se denominarán $\beta 1$ integrinas.

La unión de una determinada cadena β a una determinada cadena α dicta: 1) la especificidad de la integrina resultante por uno (o varios) ligandos concretos; 2) modula la formación de complejos de adhesión intracelulares; y 3) regula las etapas posteriores de las vías de señalización intracelular (*downstream signal*).

Estructura de las $\beta 1$ integrinas

Estructura de la cadena $\beta 1$

La proteína $\beta 1$ o CD29 es la cadena más comúnmente detectada en los heterodímeros de integrina, y se ha demostrado que se empareja con una variedad de cadenas α ($\alpha 1$ a $\alpha 12$) para formar 12 tipos de integrinas (62), siendo la cadena $\alpha 4$ (VLA-4; CD49d), la más ampliamente representada en la serie linfoide.

CD29 es una proteína constituida por 798 aminoácidos con 4 *splice variants*: $\beta 1A$, $\beta 1B$, $\beta 1C$ y $\beta 1D$. Posee un complejo dominio extracelular N-terminal constituido por 8 dominios: un dominio PSI (para plexinas, semaforinas e integrinas) en el que se inserta el dominio híbrido, donde a su vez se inserta el dominio βI (63). El dominio citoplásmico de la integrina $\beta 1$, que consta de 30 aminoácidos, comparte homología con motivos NPX / Y que son capaces de unirse a proteínas que contienen dominios PTB. Varias proteínas interactúan con la subunidad $\beta 1$, entre ellas las proteínas talina y kindlina, que son

especialmente importantes para la activación de las integrinas desde el interior de la célula. A su vez, se detecta un motivo HDRK proximal a la membrana que se une a paxilina, FAK (*Focal adhesion kinase*) y Fyn (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*) (64–66).

El dominio β I contiene motivos Asp-X-Ser-X-Ser de secuencia no contigua llamado sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (*metal ion-dependent adhesion site*, MIDAS), esencial para coordinar la unión del ión metálico Mn^{2+} y la posterior unión del ligando. β I además contiene un sitio adyacente a MIDAS (ADMIDAS), que se une a un ion Ca^{2+} inhibitor, y un sitio sinérgico de unión a iones metálicos (SyMBS) que también se une a Ca^{2+} (67).

Estructura de la cadena α 4

La proteína α 4 (VLA-4; CD49d) es la cadena α que con más frecuencia se une a la cadena β 1 en células de linaje linfoide y la que, habitualmente, se expresa más intensamente en CP, por lo que será la cadena α descrita de forma pormenorizada. Es una proteína de 999 aminoácidos, cuyas secuencias más conservadas al compararlas con las otras cadenas α incluyen los residuos de cisteína en las posiciones 19/24, los sitios de unión de cationes divalentes y la región transmembrana (68). Puede generar heterodímeros bien con la cadena β 1, bien con la cadena β 7.

El dominio extracelular de CD49d, consta de cuatro dominios: un dominio propulsor β de siete hélices, seguido por un dominio *thigh* y dos dominios *calf* (*calf*1 y *calf*2). Los sitios de unión a Ca^{+2} se encuentran entre las hélices 4 a 7 del propulsor β (69).

La región transmembrana está constituida por 23 aminoácidos con una homología del 26-39% respecto a la de las otras cadenas α .

Los dominios citoplasmáticos de las cadenas α son muy divergentes y solo comparten la secuencia GFFKR o incluso la secuencia central GFFXR en la región próxima a la membrana (70). El dominio citoplásmico de α 4 contiene sitios potencialmente fosforilables agrupados en la región central de unión a paxilina, y un adaptador del citoesqueleto que puede unirse a talina (71, 72).

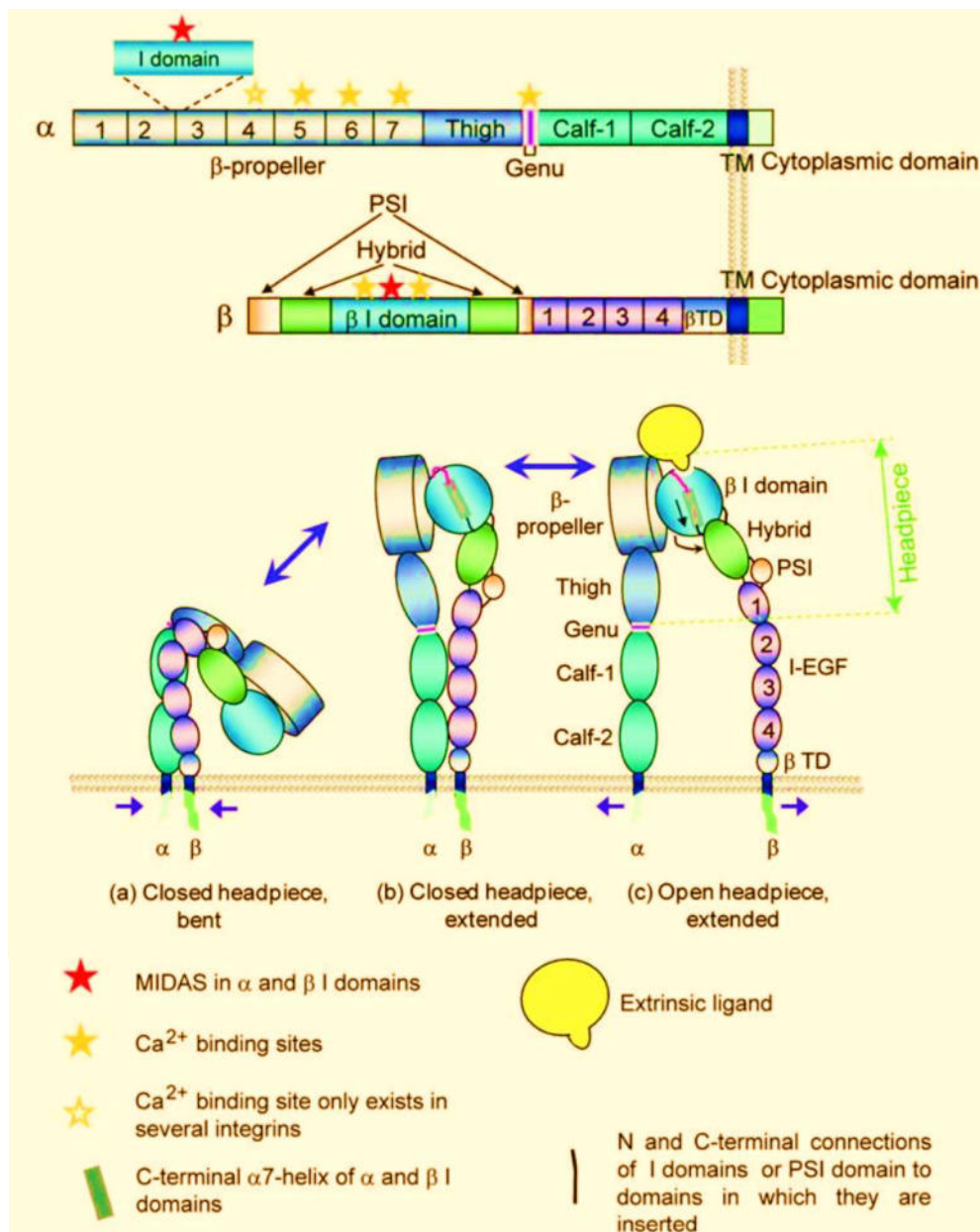


Figura 2. Organización y estructura de las integrinas (adaptado de Zhan, K. (2012). *The regulation of integrin function by divalent cations*)

La integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4 / $\beta 1$; CD49d / CD29): ligandos y distribución

La integrina VLA-4, el dímero constituido por las cadenas $\alpha 4$ y $\beta 1$, es capaz de reconocer diferentes ligandos: a) actúa como receptor de la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1; CD106) y por tanto es una pieza clave en el anclaje, el rodamiento, la adhesión firme y la migración transendotelial de leucocitos a los tejidos inflamados;

b) es receptor para la fibronectina, una glicoproteína secretada por múltiples tipos celulares y que está presente en la MEC (73–75) y c) otros ligandos para VLA-4 son la osteopontina (76), ADAM7 (*ADAM Metallopeptidase Domain 7*) y ADAM28 (*ADAM Metallopeptidase Domain 28*) (una desintegrina y metaloproteasa) (77), el receptor de LPS CD14 (78) y el antígeno luterano del grupo sanguíneo / molécula de adhesión de células basales (BCAM) (79).

El sitio de unión al ligando en muchos tipos de integrinas se establece en una región de intersección del promotor β de la cadena α y el dominio β I de la cadena β 1, siendo la cadena α fundamental para determinar la especificidad del ligando. α 4 β 1 (y también α 4 β 7 y α 9 β 1) reconocen un motivo ácido en sus ligandos, denominado "LDV", que está relacionado funcionalmente con el motivo RGD (Arginina / Glicina / Aspártico). La fibronectina contiene el motivo LDV prototípico en su región del segmento de conexión de tipo III, pero otros ligandos (tales como VCAM-1 y MAdCAM-1 - *Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*-) emplean secuencias relacionadas (80, 81).

Activación de las integrinas

Estados y mecanismos de activación de las integrinas

Las integrinas permanecen en equilibrio entre tres estados: plegado/cerrado (*bent/closed*) de baja afinidad por los ligandos, el estado extendido/cerrado (*extended/closed*) de afinidad intermedia y el estado extendido/abierto (*extended/open*) de alta afinidad. Si la integrina se encuentra en el estado extendido/abierto, se considera que la integrina está activada. En los cultivos celulares y en un buen número de condiciones fisiológicas, la mayoría de los diferentes tipos de integrinas se encuentran en el estado plegado/cerrado, ya que esta forma es favorable desde un punto de vista energético y se recicla más rápidamente que la forma activa (82).

Las integrinas pueden activarse mediante dos tipos de mecanismos: a) la unión de ligandos extracelulares a ectodominios de la integrina, conocida como activación 'de afuera hacia adentro' (*outside-in*) y b) mediante la unión de la cabeza de la proteína talina (un dominio FERM atípico con dominios F0, F1, F2 y F3 a las colas de la β -integrina y los fosfolípidos ácidos de la membrana, conocida como activación "de adentro hacia afuera" (*inside-out*) (83).

Los cationes divalentes juegan un papel esencial para el funcionamiento de las integrinas con implicaciones en su estabilización estructural, en la mediación de su interacción con el ligando y en la modulación estimuladora o inhibitoria de la unión integrina-ligando. En condiciones fisiológicas, es decir, en presencia de 1 mM de Ca^{2+} y 1 mM de Mg^{2+} , las integrinas se encuentran en estado de reposo. Si es eliminado el Ca^{2+} , el Mg^{2+} restante logra inducir la unión del ligando. Adicionalmente, el Ca^{2+} en concentraciones de micromolar puede ser sinérgico con una concentración subóptima de Mg^{2+} activando aún más a las integrinas. De modo experimental, por encima de las concentraciones fisiológicas, el Mg^{2+} es capaz de llevar a las integrinas a conformaciones de alta afinidad (detectadas por AcMo especiales dependientes de la activación) y activarlas notablemente, incluso con la presencia de Ca^{2+} milimolar. La unión integrina-ligando puede ser completamente suprimida al agregar EDTA, al actuar eliminado los cationes divalentes (84). Anticuerpos monoclonales dependientes de activación como HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 reconocen epítopos en una región reguladora de la subunidad $\beta 1$ expresada específicamente cuando el Mn^{2+} induce las conformaciones de activación funcional de unión al ligando, proceso que se ve reflejado en una potente adhesión celular mediada por la integrina $\beta 1$ al colágeno, laminina y fibronectina (85).

La activación fisiológica de la integrina requiere que las señales intracelulares interrumpen las interacciones de los dominios transmembrana (TMD) de las cadenas α y β de la integrina. Se ha verificado que la unión de la talina al dominio citoplásmico de la integrina β es un último paso común en la activación, ya que la unión de la talina interrumpe la asociación TMD (86).

Proteínas asociadas a la activación de las integrinas: talina y kindlina

La talina, una proteína citoplásmica de 270 kDa, posee un dominio FERM N-terminal de 50 kDa (dominio de cabeza de talina o THD) que contiene un sitio de unión de alta afinidad para las colas de la cadena β de la integrina y un dominio de barra de 220 kDa que contiene múltiples sitios de unión para actina y vinculina (87). El THD (Head domain) se divide en subdominios F0, F1, F2 y F3 (88). El subdominio F3 contiene el principal sitio de unión a la cola de la integrina β (89, 90) y a la FAK (91), una tirosina quinasa que se fosforila en respuesta al ligamiento de la integrina, así como al factor de intercambio Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) TIAM1 (*T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*) (92).

La talina induce un reordenamiento alostérico en las integrinas tras su unión a dos sitios en la cola de la cadena β de la integrina. Tal reordenamiento provoca un movimiento, posiblemente de inclinación, movimiento de pistón o lateral, en el dominio transmembrana y citoplásmico de la integrina β que interrumpe las interacciones. Además, el dominio THD de la talina que contiene residuos cargados positivamente también se une a fosfolípidos de membrana cargados negativamente. El cambio en el ángulo de inclinación desestabiliza las interacciones de TMD α - β y cambia el equilibrio hacia una conformación de integrina activada (93).

Del mismo modo, existe evidencia de que la activación de afuera hacia adentro tras la unión del ligando estabiliza un conformero de integrina extendido, lo que nuevamente conduce a una separación prolongada de las ramas receptoras de las subunidades α y β , las regiones transmembrana y los dominios citoplasmáticos (94).

La talina se recluta en la membrana plasmática mediante señales intracelulares como Rap1 y RIAM (molécula adaptadora que interactúa con Rap1). Rap1 es un activador fisiológico de las integrinas con un papel regulador importante en una variedad de funciones celulares dependientes de las integrinas.

Las kindlinas son otra familia de proteínas que se unen a las integrinas, regulando su función. Existen tres tipos de kindlina en mamíferos: kindlina 1, 2 y 3. La desactivación de las kindlinas 1 y 2 inhibe la activación de la integrina $\beta 1$, resultando en una unión celular defectuosa. Se requiere una interacción directa entre kindlina e integrina para la activación máxima de la integrina. Kindlina se une al motivo NPxY distal de la membrana mientras que la talina se une al motivo NPxY proximal de la membrana. De forma similar a la talina, la kindlina se une a la integrina a través de su subdominio F3 (95). En concreto, la kindlina juega un papel importante en el mantenimiento de una conformación adecuada de la $\alpha 4\beta 1$ en reposo para mediar una adhesión celular firme (96).

Señalización mediada por integrinas

Integrinas y adhesiones focales

Las colas citoplasmáticas de las cadenas α y β de la integrina carecen *per se* de actividad enzimática o de unión a la actina del citoesqueleto. En su lugar, actúan como un centro para el ensamblaje de proteínas adaptadoras. Una vez reclutadas en las colas de

las integrinas, las proteínas adaptadoras forman estructuras que se denominan colectivamente adhesiones focales (FA) que son responsables de facilitar la señalización y las propiedades mecánicas de las integrinas.

El análisis de la secuencia de colas de la β -integrina ha revelado sitios de unión preferentes para proteínas adaptadoras. El primero de estos puntos es un motivo HDRK proximal a la membrana, que se ha demostrado que se une a paxilina, FAK y Fyn (64, 66).

Modificaciones post-traduccionales de las integrinas

N- y O-glicosilación

El número y la distribución de los sitios de N-glicosilación en las subunidades de las integrinas (tanto en las 18 cadenas α como en las 8 cadenas β) es muy variable, una característica que contribuye a la diversidad estructural y funcional de las integrinas (97). De hecho, la pérdida o la ganancia de sitios de N-glicosilación tiene implicaciones tanto en la expresión de las integrinas como en su capacidad adhesiva y en la migración (98–101).

La N-glicosilación de un dominio similar al dominio β I de la subunidad β 1 es esencial tanto para la formación de heterodímeros como para la función biológica de la subunidad (99). Se ha identificado un N-glicano único en el dominio β I de la subunidad β 1 que regula negativamente la activación de α 5 β 1: la pérdida del N-glicano en el bucle β 1 β 6- α 7 facilita la activación de la integrina α 5 β 1, lo que indica una regulación negativa por parte de este N-glicano único de la subunidad β 1 (102).

En cuanto a la O-glicosilación, se ha demostrado en la línea celular HBL-8 (derivada de células procedentes del linfoma de Burkitt) que la adhesión a fibronectina mediada por VLA-4 aumenta con el tratamiento de agentes inhibidores de la O-glicosilación (103).

Fosforilación y Metilación

La fosforilación en serinas o treoninas de las colas de integrina por la acción de quinasa como ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*), AKT o isoformas de proteína quinasa C y PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*), puede regular la unión de proteínas adaptadoras (104–110).

Igualmente, se ha demostrado que los niveles de expresión de las cadenas α de las integrinas puede ser dependiente de su grado de metilación. Así ha sido demostrado con CD49d, donde los niveles de metilación se correlacionan inversamente con la expresión de la integrina en pacientes con LLC (Leucemia Linfocítica Crónica) (111).

2.2.2.2. Tetraspaninas

Las tetraspaninas (TSPAN) conforman una familia de proteínas caracterizadas por poseer cuatro dominios transmembrana implicados en la regulación de la transducción de señales y, por tanto, en una amplia variedad de procesos celulares. Poseen una función organizadora, sirviendo de andamiaje molecular a proteínas de adhesión y moléculas de señalización y adaptadoras, en una red de microdominios altamente organizados. En humanos se han identificado 33 tetraspaninas diferentes (112), algunas expresadas de manera ubicua y otras específicas de células o tejido (113). Participan en multitud de procesos fisiológicos como la adhesión celular, la proliferación, la migración, etc (114), pero también en procesos patológicos como trombosis, progresión tumoral o metástasis. Del mismo modo, intervienen en las interacciones virus-huésped (115) mediando tanto la entrada de un virus como el SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) como su liberación (116). Comparten una estructura común compuesta por cuatro dominios transmembrana (TMS 1 a 4) que forman 2 bucles extracelulares, uno pequeño entre TMS 1 y 2 (SEL, *small extracellular loop*) y otro grande entre TMS 3 y TMS 4 (LEL, *large extracellular loop*), y un bucle intracelular (SIL, *small intracellular loop*) muy corto, entre TMS 2 y 3 (117).

La caracterización del LEL de la TSPAN-28 o CD81 muestra la presencia de cuatro cisteínas conservadas que promueven la formación de puentes disulfuro. Estos estudios también demostraron que LEL consta de un dominio conservado formado por un haz de tres hélices y otro variable, que es exclusivo de cada TSPAN y explica la especificidad de las interacciones entre las tetraspaninas con las proteínas con las que interaccionan (118). Se ha determinado que los cuatro dominios transmembrana crean un bolsillo de unión al colesterol que puede adoptar una conformación abierta o cerrada dependiendo de si el colesterol está unido o no y que parece modular la actividad de CD81 en las células (119).

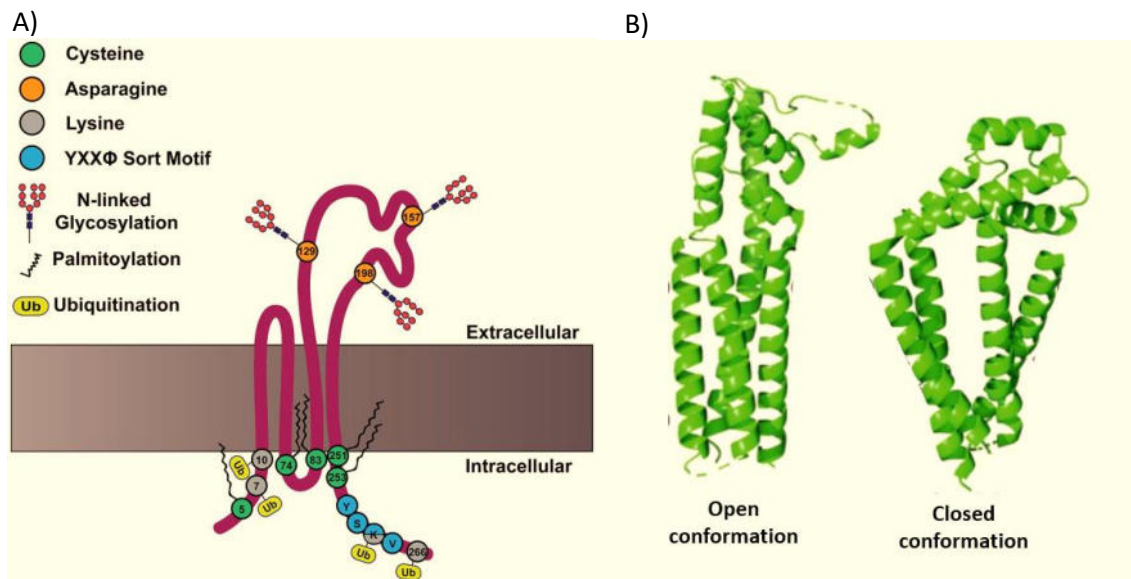


Figura 3. A) Organización y estructura de las tetraspaninas; B) Forma abierta y cerrada (adaptado de Reppert, N. (2022) A conserved sequence in the small intracellular loop of tetraspanins forms an M-shaped inter-helix turn y de Christina M Termini, Jennifer M Gillette (2017) Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling.

La caracterización del LEL de la TSPAN-28 o CD81 muestra la presencia de cuatro cisteínas conservadas que promueven la formación de puentes disulfuro. Estos estudios también demostraron que LEL consta de un dominio conservado formado por un haz de tres hélices y otro variable, que es exclusivo de cada TSPAN y explica la especificidad de las interacciones entre las tetraspaninas con las proteínas con las que interaccionan (118). Se ha determinado que los cuatro dominios transmembrana crean un bolsillo de unión al colesterol que puede adoptar una conformación abierta o cerrada dependiendo de si el colesterol está unido o no y que parece modular la actividad de CD81 en las células (119).

Las TSPAN son conocidas como "organizadores maestros" de la membrana plasmática, formando complejos proteicos funcionales de orden superior llamados "microdominios enriquecidos en tetraspanina (*tetraspanin-enriched microdomains*; TEM) a través de interacciones con las moléculas acompañantes de unión y otras TSPAN (120).

La red de interacciones puede ser clasificada en varios niveles: (1) interacciones intramoleculares que mantienen la estructura de la tetraspanina, (2) interacciones tetraspanina-tetraspanina que fomentan la formación de redes, (3) interacciones

tetraspanina con otra proteína y (4) interacciones de la tetraspanina citosólica que regulan la señalización intracelular (121). La TSPAN tienden a establecer relaciones homotípicas de tipo covalente mientras que las interacciones tetraspanina-tetraspanina heterotípicas son relativamente débiles. En los linfocitos B, los dominios generados por CD81 se encuentran más cerca de moléculas MHC (*Major histocompatibility complex*) clase II y CD19 que de otras tetraspaninas (122).

Debido a que las TSPAN interactúan con moléculas de señalización, se considera que también ejercen una función reguladora de la señalización celular. Cabe destacar las interacciones que establecen con las integrinas, tanto de forma directa como indirecta, participando en la modulación de la propagación de señales e implicando en este proceso a las moléculas de las adhesiones focales (123). Otra interacción destacable se establece entre las TSPAN y la FAK, una tirosina quinasa que regula múltiples vías de señalización celular. Se ha demostrado que varias de las TSPAN interactúan con la FAK sirviendo no solo de andamiaje sino también como reguladoras de su activación (124). De este modo, pérdidas de la expresión de CD9 o de CD51 se traducen en una disminución de la fosforilación de FAK (125, 126).

Tetraspanina CD9

Estructura e interacciones con proteínas

La molécula CD9 o Tspan-29 es un miembro de la familia de las tetraspaninas de 21–24 kDa que, a diferencia de las demás integrantes de la familia, posee un único sitio de N-glicosilación. Estructuralmente es similar a un cono invertido, lo que genera una curvatura de la membrana en las capas lipídicas, lo que le permite situarse en las regiones de alta curvatura de membrana (microdominios) con implicaciones en la remodelación de la misma (127). Se asocia físicamente a la molécula EWI-2, una proteína de superficie de la superfamilia de las Igs que a su vez puede asociarse con integrinas, proteasas, factores de crecimiento e indirectamente al citoesqueleto a través de proteínas ERM (Ezrin, Radixin y Moesin) (128, 129). También puede interactuar con la metaloproteasa CD10, regulando su distribución en la membrana citoplásmica o favoreciendo su liberación a través de exosomas (130). Se ha determinado experimentalmente que buena parte de su funcionalidad reside en su extremo C-terminal (131). A su vez, se han descrito diferentes conformaciones de la molécula CD9 que pueden ser detectadas mediante anticuerpos monoclonales específicos para dichos epítopos conformacionales. En concreto, CD9

expresa un epítopo funcionalmente relevante solo tras su interacción con la integrina $\beta 1$ activada, y más en concreto con la forma activa de la integrina $\alpha 6\beta 1$ (132).

Expresión de CD9 en linfocitos B normales y tumorales y en otras poblaciones celulares

La molécula CD9 se expresa en LB, linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK, granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, plaquetas y células endoteliales. Media diversos procesos de la biología celular como motilidad, proliferación, diferenciación, fusión, adhesión y biogénesis de exosomas, y por tanto, en los mecanismos que llevan a la fusión de espermatozoides y óvulos, el crecimiento de las neuritas, la formación de microtúbulos, infecciones virales, génesis tumoral y metástasis (133–135).

Respecto a las células B normales, la molécula CD9 se expresa en una subpoblación de células del CG que están funcionalmente más diferenciadas y cercanas a la CP, lo que se evidencia por presentar niveles más altos del factor Blimp-1 y más bajos de Bcl-6 y Pax-5 respecto a los LB CD9 negativos. De hecho, las células B CD9+ del CG se diferencian *in vitro* más rápidamente hacia plasmablastos que las células B CD9- en medios con citocinas que inducen generación de CP (136). También se ha descrito que las células B CD9+ poseen un perfil de células B reguladoras secretoras de IL-10, señaladas como marcador de supervivencia a largo plazo en pacientes sometidos a trasplante de pulmón (137). De hecho, esta capacidad reguladora de las células B CD9+ se manifiesta induciendo la apoptosis de células T efectoras (CD3+, CD4+, CD25-) mediante un mecanismo dependiente de IL-10 (138).

Respecto a los linfocitos B tumorales, en linfomas B se ha demostrado que las células B CD9- proliferan más rápidamente que las células CD9+, debido a su mayor resistencia a la apoptosis; que dependen menos de las FDC para su supervivencia y crecimiento y que la inactivación del CD9 por cambios epigenéticos puede estar implicada en los mecanismos que conducen a la transformación del linfoma (139). En el linfoma folicular, la molécula CD9 suele expresarse en menor cuantía que los tejidos normales. A su vez la expresión baja de CD9 se asocia con estadios altos según la clasificación de Ann-Arbor, demostrando que su expresión es un factor favorable para la supervivencia libre de progresión (140). Por el contrario, en la leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Filadelfia positivo (LLA Ph+), la expresión de CD9 se considera de pronóstico desfavorable, dada su asociación con un mayor riesgo de recaída y de

enfermedad refractaria. En líneas celulares de LLA, la eliminación CD9 suprimió la proliferación celular y promovió la apoptosis (141).

2.2.2.2.3. Otras moléculas de adhesión

Otras proteínas de superficie que se expresan habitualmente en las CP manifiestan una notable capacidad adhesiva, entre las que se encuentran:

- a) la glicoproteína CD44, un receptor para el ácido hialurónico (142), un componente ubicuo de la MEC, y en menor medida para el condroitín sulfato, la osteoponina, la serglicina, el colágeno y la FN (143–146). A CD44 se le ha descrito una forma estándar (CD44s) y otras formas variantes (CD44v), desempeñando un papel importante en la adhesión, migración e invasión de las células tumorales. Se ha demostrado que CD44 no solo une sino que también degrada el ácido hialurónico, lo que confiere a las células que lo sobreexpresan un gran potencial invasivo (147). Además, actúa como anclaje a ciertas metaloproteasas (MMP9), favoreciendo la diseminación celular (148). A su vez, se considera que el patrón de expresión de las diferentes isoformas de CD44 puede ayudar a distinguir las CP de los individuos normales y de la de los pacientes con MM en diferentes etapas de la enfermedad (149, 150).
- b) La molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) o CD54 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y es el ligando para las integrinas $\beta 2$ LFA-1 (CD11a) y Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*) (CD11b), importantes en la interacción de los linfocitos con el endotelio (151). A su vez realiza una función coestimuladora al ayudar en la activación de los linfocitos T (152). Su expresión puede ser modulada por citocinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β e IFN γ (153). Aunque no puede ser utilizada para distinguir entre CP normales y tumorales (154), sí que parece ser una diana potencial en inmunoterapia contra las células de MM (155, 156) y un biomarcador de daño endotelial durante los tratamientos quimioterápicos al ser determinado en su forma soluble (157).

2.2.2.2.4. Otras moléculas

Las CP expresan moléculas que, aunque no están encuadradas en los grupos de proteínas consideradas como moléculas de adhesión clásicas, sí que intervienen en

procesos de adhesión celular. CD138, o sindecan-1, es una proteína de 30.5 KDa, primer miembro descrito de la familia sindecan de proteoglicanos transmembrana de tipo I, compuesto por una proteína central glicosilada con fracciones de condroitina y sulfato de heparán. Como los demás miembros de la familia, tienen un solo dominio transmembrana que incluye un motivo gly-xxx-gly (158) al que se le ha propuesto funciones de modulación de la señalización intracelular (159). Se expresa fundamentalmente en células epiteliales, pero está presente en otros tipos de células como CP, células hematopoyéticas de MO y células del estroma. Está implicada en varios procesos como cicatrización de heridas, adhesión celular o endocitosis. Tiene la capacidad de traslocarse al núcleo celular y de regular la supervivencia de las CP (160). Puede unirse a diversos componentes de la MEC y también a integrinas, factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas (161). En modelos murinos se ha encontrado que las poblaciones de CP tumorales con alta expresión de CD138 presentaban un mayor índice proliferativo *in vivo* y que la presencia de esta molécula regula la localización y la supervivencia en el nicho medular, lo que la convierte en una potencial diana terapéutica (162, 163).

La proteína CD38, también llamada hidrolasa de ADP-ribosa cíclica, es una glicoproteína transmembrana tipo II de 46 kDa con una corta cola citoplásmica N-terminal y un largo dominio extracelular de 256 aminoácidos con actividad enzimática extracelular tanto de ADP-ribosil ciclasa como de cADPR hidrolasa que generan metabolitos inductores de la movilización del calcio intracelular (164). CD38 interviene también en la adhesión celular mediada por receptores como la molécula CD31, y en la transducción de señales al regular los niveles citoplasmáticos de NAD (165). CD38 se expresa de forma ubicua en la MO: su expresión es muy alta en CP, mientras que se expresa abundantemente en precursores B, células NK y serie monocítica y de forma baja a intermedia en las series linfocítica y mielocítica (166). Dada su elevada expresión en CP, el antígeno CD38 se ha convertido en una diana farmacológica muy importante en el abordaje terapéutico del MM gracias al uso de anticuerpos monoclonales tales como el Daratumumab (167).

La molécula CD19 es una glicoproteína transmembrana de 95 kDa perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. Posee un solo dominio transmembrana, dos dominios extracelulares similares a los descritos en la Ig y un dominio citoplasmático de 242 aminoácidos altamente conservado con múltiples residuos de tirosina, tres de ellos de gran importancia dada su asociación a quinasas de señalización como PI3K (168, 169).

Puede formar complejos con la tetraspanina CD81, que le sirve de chaperona vía secretora, permitiendo la expresión en la superficie celular de la forma madura de CD19, correctamente plegada (170). Tiene funciones reguladoras tanto positivas como negativas en la señalización mediada por BCR: el acoplamiento de CD19 con el BCR aumenta la liberación de calcio, promueve la actividad de la proteína quinasa activada por mitógenos y por tanto la proliferación celular (171). Se expresa en la práctica totalidad de los distintos estadios madurativos del linaje B y en las células dendríticas foliculares. Se expresa en células B normales y patológicas (tumoral y autoinmune), en la mayoría de las CP normales de MO y de otros territorios y es una importante diana en el tratamiento del linfoma (168).

CD56, también denominada molécula de adhesión de células neurales (NCAM), es una molécula con tres isoformas principales (NCAM-120, NCAM-140 y NCAM-180) (172), todas generadas por corte y empalme alternativo de un solo gen, que difieren en la longitud de su dominio intracelular. El dominio extracelular de CD56 consta de cinco dominios similares a inmunoglobulina que están involucrados en uniones homofílicas, seguido de dos dominios de fibronectina tipo III (FNIII) implicados en procesos de señalización (173). También se expresa en células linfoides como las células NK, en donde se comporta como receptor de reconocimiento de patógenos (174), en linfocitos T gamma-delta, en linfocitos T CD8 + activados y en células dendríticas, siendo un marcador de la función citotóxica de estas células (175). A su vez, también se expresa en células estromales mesenquimales de la MO donde parece jugar un papel en el mantenimiento del nicho medular (174). Puede expresarse de manera aberrante en leucemias mieloides y en mieloma múltiple, con implicaciones pronósticas desfavorables (176, 177).

3. Neoplasias de células plasmáticas

3.1. Clasificación y definición

Por primera vez en varias décadas, la clasificación unitaria de las neoplasias hemato-linfoides conseguida por la WHO (*World Health Organization*) se ha visto truncada, de manera que en el año 2022 se ha asistido a una doble clasificación: la

patrocinada por la propia WHO y la clasificación de la C.A.C. (*Clinical Advisory Committee*).

Las neoplasias de CP son entidades incluidas en el apartado de neoplasias linfoides en la clasificación de tumores hemato-linfoides de la W.H.O. del año 2022 (178). Bajo el epígrafe de “Neoplasias de células plasmáticas y otras enfermedades con paraproteínas”, aparecen las entidades consignadas en la **Tabla 1**.

En la clasificación de la C.A.C., bajo el epígrafe de neoplasias de células plasmáticas, aparecen las entidades consignadas en la **Tabla 2** (179).

Como puede observarse, las dos clasificaciones difieren fundamentalmente en dos aspectos: a) el epígrafe de la C.A.C. excluye desde un principio a las enfermedades de cadenas pesadas, las enfermedades por depósito etc., mientras que el epígrafe de la WHO las incluye; y b) la C.A.C. incluye por primera vez en las neoplasias de CP las anomalías genéticas recurrentes, mientras que la clasificación de la WHO. aún no las considera. Ambas coinciden, sin embargo, en no incluir como entidad a la enfermedad extramedular (EEM), debido muy posiblemente a la heterogeneidad de la misma.

Las características distintivas de las neoplasias de células plasmáticas son:

- (1) confirmación histopatológica o por CMF de la presencia y exceso de CP clonales
- y (2) producción y, en la mayoría de los casos, secreción excesiva de una proteína monoclonal (pico M) o de cadenas ligeras libres (FLC: *free light chains*, no asociadas con cadenas pesadas) en suero y/u orina.

3.2. Mieloma múltiple

El MM es una enfermedad heterogénea con afectación multiorgánica, de morbilidad-mortalidad considerable que, a pesar de los avances terapéuticos, aún es considerada incurable. Representa el 1% de todos los cánceres y aproximadamente el 10% de todas las neoplasias malignas hematológicas. Su incidencia en España se encuentra entre 2,5 y 3,5 casos por 100.000 habitantes, y supone el 1,8% de todas las muertes por cáncer (180). La mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico es de 69 años (181).

Tabla 1. Clasificación de neoplasias de células plasmáticas y otras enfermedades con paraproteínas según la WHO, 2022
Gammapatías monoclonales
Enfermedad por aglutininas frías
Gammapatía monoclonal de significado no determinado IgM (MGUS IgM)
Gammapatía monoclonal de significado no determinado no IgM (MGUS no IgM)
Gammapatía monoclonal de significado renal
Enfermedades por depósito de inmunoglobulina monoclonal
Amiloidosis relacionada con inmunoglobulina
Enfermedad por deposición de inmunoglobulina monoclonal
Enfermedades de cadenas pesadas
Enfermedad de cadena pesada mu
Enfermedad de cadena pesada gamma
Enfermedad de cadena pesada alfa
Neoplasias de células plasmáticas
Plasmocitoma
Mieloma de células plasmáticas
Neoplasias de células plasmáticas con síndrome paraneoplásico asociado (síndrome de POEMS; síndrome TEMPI; síndrome AESOP).

Tabla 1. Neoplasias de células plasmáticas y otras enfermedades con paraproteínas según la clasificación de tumores hemato-linfoides de la WHO del año 2022

Tabla 2. Clasificación de neoplasias de células plasmáticas según la clasificación del C.A.C. 2022
MGUS no IgM
Mieloma múltiple (MM) (mieloma de células plasmáticas):
Mieloma múltiple, NOS
Mieloma múltiple con anomalías genéticas recurrentes:
<ul style="list-style-type: none"> • Mieloma múltiple con traslocación de la familia CCND • Mieloma múltiple con traslocación de la familia MAF • Mieloma múltiple con traslocación de la familia NSD2 • Mieloma múltiple con hiperdiploidía
Plasmocitoma óseo solitario
Plasmocitoma extraóseo

Tabla 2. Neoplasias de células plasmáticas según la clasificación del C.A.C. del año 2022

El MM se define como el hallazgo de $\geq 10\%$ de CP clonales en MO con una cantidad de proteína monoclonal en suero ≥ 30 g/L y con evidencia de daño de un órgano diana. Se consideran eventos definitorios la hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, y las lesiones óseas (CRAB). En el caso de que la proteína monoclonal sea ≥ 30 g/L sin presencia de eventos definitorios, se considera al MM quiescente (MM *smoldering*). El MGUS se define por una cantidad de proteína monoclonal sérica < 30 g/L, CP clonales en la médula ósea $< 10\%$ y ausencia de daño de órgano diana (182). Aproximadamente el 3,3% de los casos presentan enfermedad extramedular (EEM) definida por la presencia (ver más adelante) de plasmocitomas extraóseos, afectación de otros órganos, además de la MO, o por la presencia significativa de CP en SP (leucemia de CP). En un 10%-15% de los casos, se puede manifestar como amiloidosis de cadena ligera con depósito visceral de amiloide (cadenas ligeras mal plegadas) (183).

El diagnóstico por citometría de flujo se basa en la detección de CP con fenotipo aberrante. Muy frecuentemente las CP clonales no expresan CD19 y expresan débilmente CD27 y/o CD45; en aproximadamente el 75% de los casos, las CP expresan CD56 y en un porcentaje minoritario de casos expresan aberrantemente CD28 o CD33; a su vez, puede detectarse expresión asincrónica de CD20, CD117 y/o Igs de superficie (184).

3.2.1. Sistema de estadificación para el MM

La clasificación por estadiaje es una aproximación que permite la identificación de patrones de supervivencia y la elección de las terapias en función de la intensidad con que se manifieste la enfermedad.

Existen 2 sistemas de estadificación para la valoración de los pacientes con MM. El primero se basa en el sistema tradicional de estadificación internacional (ISS, *International Staging System*) de Durie y toma en cuenta factores analíticos como la $\beta 2$ -microglobulina, la albumina sérica, la LDH y las alteraciones citogenéticas como la presencia de del(17p) y/o la t(4;14) y/o la t(14;16) (185).

Los pacientes con R-ISS en estadio I, II y III tienen tasas de supervivencia global a 5 años del 82%, 62% y 40%, respectivamente (185).

Para la estadificación de riesgo del MGUS se tienen en cuenta la presencia de 3 factores: a) una relación anormal de cadenas ligeras libres en suero; b) paraproteína del

tipo IgA o IgM y c) proteína monoclonal sérica >1.5 g/dL. Se considera que el MGUS de alto riesgo tiene una probabilidad de progresión del 50-60% a los 20 años, mientras que es sólo del 5% en ausencia de factores de riesgo (178).

3.2.2. Presentaciones infrecuentes del MM

La enfermedad extramedular (EEM) en el MM, también conocido con MM extramedular, es una presentación poco habitual del MM y es considerada, de manera inherente, como una etapa de alto riesgo con mal pronóstico donde las CP tumorales logran sobrevivir en otros territorios, de modo independiente del microambiente de la MO. Desde un punto de vista temporal, la afectación extramedular puede darse: a) ya en el momento inicial del diagnóstico (EMM primario), afectando sobre todo a la piel; o b) a lo largo de la evolución de la enfermedad (EMM secundario), con o sin recaídas medulares, en cuyo caso puede afectar a hígado, riñones, ganglios linfáticos, mama, pleura, pericardio y SNC, entre otras localizaciones.

Los sitios más comunes de aparición son piel/músculo (24%), pleura (12%), ganglios linfáticos (10%), hígado (9%) y SNC (6%). Tiene una incidencia de 0,5%-4,8% en los nuevos diagnósticos y del 3,4%-14% en las recaídas. Desde el punto de vista genético, esta forma agresiva de progresión de la enfermedad se asocia con adquisición de anomalías cromosómicas secundarias (como deleciones de cromosomas) o eventos terminales (translocaciones cromosómicas secundarias y mutaciones que involucran un mayor número de genes). En la EEM, las CP exhiben frecuentemente mutaciones de p53 y Ras y regulan al alza la expresión de FAK. No se conoce prácticamente nada de los posibles mecanismos etiopatogénicos implicados en la diseminación extramedular en el MM, aunque los candidatos más plausibles son el aumento de la angiogénesis junto a la disminución de la expresión de moléculas de adhesión y otras moléculas involucradas en el *homing* (integrinas, CD44, P-selectina, receptores de quimiocinas como CCR1 (*C-C Chemokine Receptor 1*), CCR2 (*C-C Chemokine Receptor 2*), de CXCR4 y su ligando SDF-1 alfa), así como el tipo de expresión de las tetraspaninas (186–189).

La leucemia de CP es una forma infrecuente y agresiva de discrasia de CP. Puede tener una presentación primaria o secundaria a un MM previamente diagnosticado, pudiendo ser considerada, por algunos autores, una fase leucémica de la EEM. Para su diagnóstico se requiere la presencia de al menos un 5% de CP circulantes o de un número absoluto de CP que supere al menos la cifra de 2×10^9 /L. El 67% de los pacientes se

diagnostican en estadio 3 según el ISS, que equivale a una entidad con una carga tumoral alta (190) y se asocia con una supervivencia a los 4 años del 28% (183).

3.3. Etiopatogenia del MM

3.3.1. Origen del MM y alteraciones genéticas más comunes

Aunque los eventos que conducen a la generación de las CP tumorales no se encuentran completamente caracterizados, sí que existe evidencia experimental de que su origen es el centro germinal del ganglio linfático y que la célula B genéticamente aberrante migra a la MO, donde anida y prolifera. Se ha propuesto que en la segunda o tercera décadas de la vida, tras el encuentro con el antígeno en el CG, comienzan a observarse errores durante la recombinación de cambio de clase y la hipermutación somática del receptor de células B con la participación de la deaminasa inducida por activación (AID: *Activation-Induced Deaminase*) y de la APOBEC (*Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme*) (191). Además, podría existir una predisposición en el CG que aumentaría el riesgo de desarrollar gammapatías monoclonales asociado a varios alelos de riesgo (192). Desde el punto de vista genético, existen alteraciones comunes a las diferentes gammapatías, tales como las translocaciones que afectan a oncogenes y a regiones del gen IgH, la presencia de un cariotipo hiperdiploide y la sobreexpresión de los oncogenes CCND1 (*Cyclin D1*), WHSC1 (*Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate-1*), MAF (*Transcription factor Maf*), MAFB (*MAF BZIP Transcription Factor B*) y CCND3 (*Cyclin D3*). En MGUS, la alteración genética más prevalente es la t(11;14), mientras que en MM es más frecuente la alteración en el número de copias de del(1p), amp(1q), del(13q), del(14q), del(16q), junto a mutaciones de la familia RAS (*Rat Sarcoma Virus GTPase*) (193).

La célula B transformada en el CG migra y se aloja en la MO, donde se diferencia en CP, experimentando entonces una expansión clonal conocida clínicamente como MGUS que, de manera reglada, precede a la aparición del MM (194). La interacción con los componentes del microambiente medular es crucial para este proceso (o para el proceso de expansión clonal) ya que por sí solo los cambios celulares genéticos y moleculares intrínsecos de las CP pueden no ser suficientes para iniciar el proceso que conduce a la acumulación patológica de las CP clonales.

3.3.2. Interacciones de las células de MM con células del estroma y otros tipos celulares

Las células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de MO son células multipotenciales del estroma de la MO con capacidad para diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales, pericitos e incluso células neuronales. Intervienen en el desarrollo óseo, procesos de remodelación y reparación medular e indirectamente son responsables de la hematopoyesis. Se ha demostrado que las CEM de pacientes con MM tienen una capacidad de inmunomodulación alterada que cursa con expresión anómala de CD40/CD154, VCAM1, ICAM-1, LFA-3, HO-1 (*heme oxygenase-1*), HLA-DR y HLA-ABC, sobreproducción de IL-6 y producción alterada de IL-10 (195). También poseen mayor capacidad para producir TNF- α , osteopontina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF: *hepatocyte growth factor*) y factor activador de células B, factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15) y β -galactosidasa asociada a la senescencia. Adicionalmente se han identificado aumentos de la expresión del factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) (por activación de NF- κ B) y de la proteína XBP1s (*X-box binding protein 1*). En conjunto, todas estas alteraciones promueven la proliferación y supervivencia de las CP de MM (196, 197) habiéndose descrito también una desregulación en los genes del CXCL1, CXCL5, CXCL6 y de la IL-8. Se ha propuesto que las señales recibidas por las CP clonales del MM, tanto paracrinas como mediadas por el contacto con las BMSC, serían el evento originario de las anomalías descritas (198). Por último, las células del estroma favorecen también la tumorigénesis mediante la transferencia de factores oncogénicos a las CP de MM contenidos en los exosomas, incluidos IL-6, ligando 2 de quimiocina (motivo CC) (CCL1) y FN (199).

Los osteoblastos, células encargadas de la síntesis de la matriz ósea y por tanto del desarrollo y crecimiento óseo, juegan también un papel en la etiopatogenia del MM en circuitos de retroalimentación que disminuyen la diferenciación de BMSC a osteoblasto, con reducción en el número y función de los mismos y la consiguiente reabsorción ósea. La reabsorción ósea, esencial en la patogenia del MM, está mediada por: a) una regulación a la baja de Runx2 (*Runt Related Transcription Factor 2*) en las BMSC y en los progenitores de osteoblastos; b) un aumento de la producción de inhibidores de la vía WNT (*Wingless e Int proteins*), incluido el inhibidor 1 de la vía de señalización WNT de Dickkopf (DKK1); c) secreción de factores antiosteoblásticos como TGF- β (*Transforming growth factor beta*) y el factor de crecimiento de hepatocitos; y d)

activación constitutiva de la vía NOTCH (*Neurogenic locus notch homolog protein*) (200).

Los osteoclastos, células derivadas de células precursoras monocíticas que median la resorción de la matriz ósea, están sujetos al efecto de distintos factores producidos por las CP de MM que desregulan las vías que mantienen el equilibrio entre la remodelación y la resorción óseas por regulación positiva en RANK-L (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) y negativa del receptor señuelo RANK. A su vez, los osteoclastos pueden reactivar las células latentes de MM por remodelación del nicho endóstico (201).

Los adipocitos de MO también están implicados en el mantenimiento de las CP de MM, ya que influyen en su metabolismo al comportarse como reservorios de energía y como células secretoras de adipocinas y factores de crecimiento. Además, son capaces de regular la remodelación ósea mediante la producción de RANK-L. Finalmente, los adipocitos manifiestan cierta capacidad quimiotáctica respecto a las CP de MM, ya que producen MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)/CCL2 (C-C chemokine ligand 2) y SDF1 α /CXCL12 (202).

Las células endoteliales de la MO no solamente expresan proteínas de adhesión que permiten la entrada de células de MM a los lechos vasculares a través de los capilares, sino que también producen y liberan IL-6 que aumenta la producción de VEGF en las células mononucleares y en las células tumorales, promoviendo, mediante retroalimentación positiva, la vascularización del hueso infiltrado por las células de MM (203). Varios estudios demuestran que CD9 se encuentra implicada en la fisiopatología del MM. A su vez, se ha observado que las CP de MM que están en estrecho contacto físico con las células endoteliales poseen una mayor expresión de CD9, lo que sugiere que podría intervenir en el alojamiento en la MO (204).

Las células del sistema inmune del microambiente de la MO también influyen en la evolución y progresión de la enfermedad. Inicialmente, son capaces de contener a las CP clonales en etapas premalignas, hasta que las células tumorales logran el escape inmunológico por procesos de inmunoección y selección darwiniana de los clones resistentes que han acumulado alteraciones genéticas. Se ha documentado que la infiltración por macrófagos M2 de la MO se asocia con una enfermedad más agresiva, una menor supervivencia del paciente y una peor respuesta al tratamiento, hasta el punto que la infiltración por macrófagos M2 es un biomarcador predictivo potencial para la

resistencia del MM a la terapia con Bortezomib. Las CD de la MO de los pacientes con MM son funcionalmente defectuosas debido a una menor expresión de moléculas HLA-DR, CD40, CD80 y CD86, una presentación deficiente de antígeno y, por tanto, una débil estimulación de la proliferación de células T. También se han descrito defectos en la distribución y la función de las células T, con disminución numérica de células T CD8+ y CD4+, relación anormal Th1/Th2 y alteración de la respuesta T con expresión reducida de marcadores de activación como CD25, CD28 y CD54, defectos de la citotoxicidad, proliferación, producción de citocinas y alteración en la actividad de factores de transcripción como T-bet o en la expresión de PD-1 (*Programmed death 1*), CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) o TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*). Las células NK regulan a la baja o bloquean su receptor NKG2D como mecanismo de evasión de las CP de MM al mantener la expresión de la molécula de HLA y eliminando la expresión de MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*). Adicionalmente, las CP tumorales pueden activar células T_{reg} que disminuyen la actividad citotóxica de las células NK. Por último, las CP de MM pueden atraer LB vírgenes al microambiente y promover su diferenciación a células B_{reg}, células capaces de inhibir la capacidad de las células T CD4+ y CD8+ para eliminar tumores (205).

3.3.3. Interacciones de las células de MM con proteínas de la matriz extracelular

La remodelación de la MEC contribuye a la patogenia y a la progresión de la enfermedad en el MM. Células del microambiente tumoral similares a fibroblastos están involucradas de manera relevante en la patogénesis del MM ya que remodelan diferentes tipos de proteínas: proteínas de la MEC, receptores de estas proteínas y enzimas que modulan a la propia MEC. Este tipo de remodelación no se observa en las células fibroblastoides de MO de individuos sanos. Entre estas proteínas se encuentran: laminina $\alpha 4$, lisil-hidroxilasa 2, prolil 4-hidroxilasa 1, nidogen-2, integrina $\alpha 5\beta 5$, receptor de manosa tipo c2, PAI-1, basigina y MMP-2, además del receptor β de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) y el factor de crecimiento periostina (206).

Por otro lado, un buen número de proteínas de la MEC, algunas de ellas mayoritarias (proteoglicanos, colágeno, FN y laminina), muestran distintos tipos de alteraciones en pacientes con MM.

Proteoglicanos de la MEC como el versican (VCAN) se han relacionado con el desarrollo y progresión tumoral al estar implicado en procesos de adhesión, proliferación, migración y angiogénesis celular, en especial en tumores sólidos. Recientemente, se ha demostrado un aumento de la concentración de VCAN en la MO y en la sangre de pacientes con MM, regulando el medio inflamatorio observado en el nicho del mieloma mediante la interacción de VCAN con el receptor TLR-2/6 expresado en la superficie de los macrófagos, que conduce a la activación de la quinasa del locus 2 de progresión tumoral (Tpl2) (207). Además, las CP de MM disminuyen la secreción de decorina, un proteoglicano rico en leucina, inducida por los osteoblastos cuyo efecto está mediado por CCL3 (*C-C Chemokine Ligand 3*) lo que se traduce en niveles bajos de decorina en pacientes con MM respecto a controles sanos (208).

Glucosaminoglicanos como el hialuronato se acumulan en el microambiente con efectos favorecedores para la angiogénesis, la invasión y las metástasis tumorales. En MM se ha demostrado una expresión elevada del receptor de motilidad mediado por hialuronato, lo que se asocia con un mal pronóstico. La expresión de una variante de empalme natural que carece del exón 4 (-exón 4) se correlaciona con la progresión de la enfermedad (209). A la heparanasa, una endo- β -D-glucuronidasa capaz de escindir las cadenas laterales de sulfato de heparán (HS) produciendo fragmentos de HS de tamaño apreciable, se le ha relacionado con un aumento de la diseminación celular como consecuencia de la escisión del HS y la remodelación de la matriz extracelular y la membrana basal que subyace a las células epiteliales y endoteliales. En el plasma de MO de pacientes con mieloma se detecta una actividad enzimática aumentada de la heparanasa, lo que se ha asociado a un aumento tanto de la densidad de la microvasculatura como de la expresión de CD138 (210, 211)

LAMB1 (*Laminin Subunit Beta 1*), una de las 3 cadenas que constituyen la laminina 1, se ha identificado como un biomarcador potente en relación a la capacidad de adhesión de las células de MM. La baja expresión de LAMB1 en pacientes con MM se asoció de forma significativa a una concentración elevada de β 2-microglobulina y a un R-ISS (*Revised International Staging System*) de alto riesgo (212).

El colágeno y sus fragmentos bioactivos, llamados matriquinas, son marcadores del recambio óseo, y por lo tanto pueden ser utilizados como biomarcadores de la enfermedad. Además, tienen efectos inmunomoduladores vía LAIR-1 (*Leukocyte-*

associated immunoglobulin-like receptor 1), quimiotácticos tras su unión a receptores CXC, y moduladores de la producción de IL-1 β (213, 214)

Glicoproteínas como la vitronectina y la FN se encuentran aumentadas en pacientes con MM como reflejo del proceso de resorción ósea. En concreto, la unión de los exosomas a las CP de MM mediada por FN activa la señalización de p38 y pERK y la expresión de los genes diana DKK1 y MMP-9, dos moléculas que promueven la progresión del mieloma (215). Otra proteína de la MEC como la reelina se asocia con mal pronóstico del mieloma, ya que promueve la proliferación de células de MM tanto *in vitro* como *in vivo* por activación de las vías FAK/Syk/Akt/mTOR y STAT3 (216). La osteonectina, también denominada SPARC (*Secreted protein acidic rich in cystein*), es una proteína que participa en la génesis, invasión, metástasis y angiogénesis de tumores. Se ha demostrado que los niveles séricos de SPARC están aumentados en pacientes con MM, y que aquellos pacientes con una supervivencia menor eran los que mostraban los más altos niveles de esta proteína. De igual forma, en la línea de MM U266, vectores que interfieren en la expresión de SPARC disminuyeron la capacidad de proliferación, migración e invasión de estas células (217).

La osteopontina, una glicoproteína fosforilada, se identificó originalmente como una forma secretada en el hueso y luego se descubrió como una proteína intracelular. Es producida por los osteoclastos y las CP de MM y también ha demostrado estimular la angiogénesis en el MM. Se ha evidenciado que cuando se depleciona del medio o cuando se usan anticuerpos anti-osteopontina, se bloquea la angiogénesis. Además, hay un aumento significativo de la angiogénesis de la MO en pacientes con CP productoras de osteopontina en comparación con los no productoras (218, 219).

3.3.4. Redes de citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles y sus receptores

Otro componente importante del nicho medular que contribuye de manera relevante a la fisiopatología del MM es el componente soluble constituido por citoquinas, quimioquinas y otros factores solubles tales como los factores de crecimiento, así como sus respectivos receptores. Estas moléculas generan bucles autocrinos y paracrinos que se retroalimentan en colaboración con los mecanismos de adhesión célula-célula, que también activan cascadas de señalización intracelulares. Dicha interacción redundante puede inducir vías de señalización como Ras/Raf/MEK/MAPK, la vía PI3K/Akt, la vía JAK (*Janus kinase*)/Stat3, la vía NF κ B, y Wnt, responsables de la supervivencia por

inhibición de la apoptosis, la proliferación y la migración de las CP de MM (220). Hasta el momento, se ha demostrado un aumento en los niveles de factores solubles tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la IL-6, TNF- α (Tumor necrosis factor), BAFF y RANKL, así como niveles plasmáticos más bajos de VEGF y BAFF en el suero medular en comparación con los detectados en el suero de sangre periférica en pacientes con MM. Además, se han observado diferencias entre los niveles de IL-6 de pacientes fallecidos respecto a supervivientes (221).

En el MM se ha propuesto la existencia de un balance alterado entre los componentes inflamatorios y antiinflamatorios del microambiente del nicho medular, donde las citocinas proinflamatorias confieren a las células del estroma características de células estromales inflamatorias (CEi). Las CEi son el resultado de la activación, mediada por NF- κ B, de las células estromales normales, posiblemente mediada por la acción de TNF α o IL-1 β , citocinas aumentadas en pacientes con MM (222). En este sentido, se ha demostrado que las células del estroma de MO responden a niveles bajos de IL-1 sintetizando grandes cantidades de IL-6, probablemente la citoquina más importante en la fisiopatología de la enfermedad. De hecho, el aumento de IL-6 en el microambiente de la MO de pacientes con MM se ha relacionado con la osteólisis que promueve la osteoclastogénesis a través de la activación del eje JAK2/STAT3, dando como resultado una regulación al alza de las moléculas RANKL. A su vez, los elevados niveles de IL-6 se han relacionado con la progresión de la enfermedad ya que, por un lado, al activar la vía de IL-6/STAT3 se estimula la angiogénesis mediada por la síntesis inducida de VEGF y, por otro, estimula las vías Ras, Akt y MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), que promueven la supervivencia de las CP de MM^{4,5}. Por último, la IL-6 también utiliza la vía Wnt/ β -catenina para promover la señalización y el crecimiento celular en el MM.

Junto a la IL-6, se han descrito numerosos factores solubles que interaccionan con las CP tumorales. Así la IL-8, que al igual que la IL-6 y APRIL, promueven la resistencia a la apoptosis, así como la proliferación de las células tumorales, la angiogénesis y la metástasis del tumor y la enfermedad ósea osteolítica por la vía NF- κ B.

IGF-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), también por la vía JAK/STAT, promueve la resistencia a la apoptosis y la proliferación de la CP clonal. VEGF vía Ras/Raf/MEK/Erk (que se encuentra activa en casi la mitad de los MM) mejora la supervivencia, proliferación, migración y angiogénesis (223).

En modelos animales, el TNF α contribuye a la diseminación de las CP de MM mediante la regulación negativa de CD138, conduciendo por lo tanto a un aumento de la carga tumoral (224).

Se ha demostrado que BAFF funciona como un factor de supervivencia de las CP de MM, tanto en líneas celulares como en células primarias, ya que expresan varios receptores de unión a BAFF, como BCMA y TACI. La unión de BAFF a sus receptores provoca la activación de vías canónicas y no canónicas de NF- κ B, con la subsiguiente translocación nuclear de p50/p65 y/o p52/RelB y por tanto, conduciendo a la regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas (225).

Por otro lado, los niveles de IL-17 se encuentran aumentados en los pacientes con MM, y hay correlación de sus niveles con el estadio clínico de la enfermedad. La IL-17 promueve el crecimiento de las CP de MM y la adhesión a las células de estroma (226, 227).

Los niveles de la quimiocina CXCL12 (también denominada SDF-1) están aumentados en la MO de los pacientes con MM, en especial en áreas específicas de la MO colonizadas por las CP tumorales. La interacción con su receptor, el CXCR4, promueve la supervivencia, migración, adhesión y el alojamiento en la MO (228).

El VEGF y HGF son los principales factores solubles responsables de los eventos angiogénicos asociados a MM. El VEGF actúa sobre las vías RAS/RAF/ERK/MAPK para aumentar la permeabilidad vascular, inducir la migración de las células endoteliales y estimular la proliferación y la supervivencia de las CP de MM. El eje HGF/cMet (tyrosine-protein kinase Met) está activo constitutivamente en las células endoteliales de pacientes con MM, desempeñando funciones angiogénicas y de migración. El efecto angiogénico de HGF se produce al aumentar la activación de la vía VEGF/VEGFR2 y por regulación negativa en la síntesis de trombospondina (229).

3.3.5. Proliferación de las células de MM

La proliferación de las CP clonales en la mayoría de los pacientes recién diagnosticados de MGUS o MM no difiere de forma significativa de la observada en las CP normales, ya que se caracterizan por una baja tasa de proliferación, que aumenta a medida que evoluciona la enfermedad. Utilizando la tinción de Ki67 como medida de las células que han entrado en ciclo celular, se estima que la tasa de proliferación suele ser

inferior al 5% en los pacientes con MM, y se considera ligeramente aumentada cuando se sitúa entre el 6% y el 10% de las CP y muy aumentada cuando es superior al 50%. Este aumento de la tasa de proliferación se correlaciona con un curso clínico más agresivo de la enfermedad (230). Por otro lado, las translocaciones cromosómicas y la aneuploidía bloquean la expresión del gen de la ciclina D, promoviendo la transición desde la fase G₀/G₁ a la fase S del ciclo celular, transición que puede acelerarse con la acumulación de mutaciones que se suceden a lo largo del tiempo y el consiguiente aumento del índice proliferativo, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad (200). Esta progresión es debida, por un lado, a la existencia de alteraciones genéticas de clones preexistentes que se seleccionan incrementando su proliferación, y, por el otro, a factores solubles y a interacciones de las células de MM entre sí y con otros componentes celulares del microambiente medular (231). Factores solubles como la IL-6, IL-17, oncostatina-M (OSM), factor inhibidor de la leucemia (LIF), IGF1, VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el TNF- α son secretados fundamentalmente por las células del estroma, también por los osteoclastos, e inducen la proliferación de las CP. La ciclofilina-A, secretada por las células endoteliales, juega un papel importante en la proliferación de las células de MM y su ubicación en el nicho celular. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), el HGF, la angiopoyetina (Ang)-2, el SDF-1 α , la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP), el HGS y la proteína morfogenética ósea (BMP) también se han asociado a proliferación y, por lo tanto, a progresión de la enfermedad (232). Por último, IL-16 estimula la proliferación celular de las células de MM utilizando la tetraspanina CD9 como receptor (233).

Las moléculas de adhesión que median el contacto directo entre las CP de MM con sus homologas o con células accesorias de la MO, promueven la proliferación (y la supervivencia; ver más adelante) de las células malignas. En concreto, la molécula LFA-1 (CD11a) que está implicada en la adhesión homotípica CP-CP parece estimular la proliferación de las células de MM (234).

En los últimos años se ha descrito que los microRNA (miRNA), pequeños ARN no codificantes compuestos por 18 a 25 nucleótidos que regulan la expresión génica al interaccionar con el ARNm, también afectan a varias funciones celulares, entre ellas la proliferación celular, la migración y la apoptosis (235). También pueden desempeñar un papel epigenético regulador en el microambiente tumoral al ser transportados y secretados por los exosomas. En el MM en concreto, se han encontrado diferencias entre los miRNA

de los exosomas secretados por las células del estroma del MM respecto a las células del estroma de controles sanos. Por ejemplo, la formación de miRNA como miR-214-3p o miR-27b-3p por fibroblastos de MO conduce a la progresión del MM y regula negativamente la apoptosis de los propios fibroblastos (236). Asimismo, se ha demostrado que miR-126 regula el gen que codifica para el dominio SET del MM (MMSET). El MMSET aumenta la proliferación de las células del MM al estimular la expresión del oncogén de la mielocitomatosis (c-MYC). Por el contrario, la disminución de la expresión de los miR-146a y miR-135b aumenta la expresión de PELI2 y los genes IRAK1 involucrados en la vía de señalización de IL-1 y, consecuentemente, de la expresión de IL-6 con efectos en el crecimiento de las células del MM. La disminución de la expresión de miR-15a/16 en MM contribuye a la proliferación y supervivencia de las células malignas con el aumento de la actividad de las vías Notch, c-jun y TP53 (237).

Desde un punto de vista clínico es importante conocer el índice de proliferación de las CP malignas ya que identifica pacientes de alto riesgo. Sirve como biomarcador pronóstico e identifica a aquellos pacientes con un tiempo de progresión más corto, comportándose como un factor pronóstico independiente tanto en relación a la progresión como a la supervivencia global de la enfermedad. De este modo, el índice de proliferación complementa la estratificación de riesgo estándar y ayuda a guiar el tratamiento clínico en los procesos premalignos y sintomáticos (238, 239).

3.3.6. Supervivencia / apoptosis en células de MM

Los factores que posibilitan la proliferación de las CP de MM coinciden en buena medida con los que garantizan la supervivencia celular: redes de factores solubles como citocinas, interacciones a través de moléculas de adhesión y exosomas. Entre los factores solubles cabe destacar el papel de la IL-6 por poseer un efecto pleiotrópico sobre muchas de las vías de señalización intracelular (240). También es destacable que la sobreexpresión de BCMA y la activación por su ligando APRIL favorezcan a la vez el crecimiento y la supervivencia de las células de MM mediante la inducción de cascadas de señalización mediadas por la proteína quinasa B (AKT), MAPK y el factor nuclear NF- κ B (241). Adicionalmente, la activación de CD28 en las CP malignas que lo expresan, transduce directamente una señal que favorece la supervivencia y, a su vez, envía señales a las CD al interactuar con sus ligandos CD80 y CD86, de manera que se estimula tanto la actividad de la IL-6 como de la enzima inmunosupresora indoleamina 2,3-dioxigenasa

(IDO) de las CD para promover una mayor supervivencia en el nicho del MM (58). Por último, se ha descrito recientemente que la expresión de la PIM2 quinasa es requerida para la supervivencia de las PC al inhibir la actividad de las caspasas, mientras que la inhibición de la actividad de esta quinasa y la inhibición simultánea de MCL1 actuaron de forma sinérgica en la inducción de la apoptosis de las CP malignas (242).

Además del mantenimiento de la proliferación y supervivencia, las CP de MM han adoptado mecanismos que les permiten evadir la apoptosis y asegurar su supervivencia en la MO. Estos mecanismos incluyen la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas como SDF2L1 (*Stromal cell-derived factor 2-like protein 1*), MYDGF (*Myeloid Derived Growth Factor*), SDF4 (*Stromal Cell Derived Factor 4*), RCN1 (*Reticulocalbin 1*) y TXNDC5 (*Thioredoxin Domain Containing 5*), los factores antiapoptóticos inducidos por hipoxia como SRC y FYN (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*); y la regulación negativa de las proteínas proapoptóticas como BAX (*Bcl-2-associated X protein*), TP53I11 (*Tumor Protein P53 Inducible Protein 11*), BLK (*B-cell lymphocyte kinase*), TRAF2, ITPR1 (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1*) y PRAF2 (*PRA1 Domain Family Member 2*). Se ha demostrado que en las infiltraciones de MO con más de un 40% de CP malignas se detectan niveles elevados de proteínas antiapoptóticas como HYOU (*Hypoxia up-regulated protein*), SDF4, TRAP1 (*Heat shock protein 75 kDa*), la translocasa ADP/ATP SLC25A4 (*Solute carrier family 25 member 4*) e IRF4. Adicionalmente, las células de MM pueden limitar la apoptosis extrínseca inducida por el sistema inmunitario mediante la regulación positiva de las moléculas CD38, CD46, SLAMF7 (*SLAM Family Member 7*) (CS1) y MHC-I (243).

Otro factor que incide en la apoptosis de las CP de MM es la desregulación epigenética mediada por los miRNA. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-17-92 indujo una mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2; o la alteración en la expresión de miR-20a tuvo efectos similares vía PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*)/PI3K/Akt. La sobreexpresión de miR-106b-93-25 impulsó la regulación a la baja de BIM (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*). De hecho, está demostrado que miR-125b se encuentra sobreexpresado en MM y actúa como regulador negativo directo de p53 por unión a la 3'UTR del ARNm de TP53, lo que conduce a una regulación a la baja del nivel endógeno de proteína p53 y por tanto a inhibición de la apoptosis (244). Los genes proapoptóticos BAX, BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) y PUMA

(*p53 upregulated modulator of apoptosis*) también están sujetos al silenciamiento mediado por la hipermetilación de su promotor en las CP malignas (245, 246)

Por otra parte, la expresión y funcionalidad de Fas (CD95) también se ha visto implicada en la prevención de la cascada de eventos apoptóticos en CP de MM. La regulación a la baja de Fas provoca una mayor resistencia a APO010, una forma hexamérica de FasL recombinante, y se ha propuesto que el aumento de isoformas solubles de Fas (sFas) es capaz de bloquear la interacción entre FasL y Fas de membrana y, por tanto, capaz de prevenir la apoptosis en las células cancerosas (247).

Por último, la activación de la integrina $\beta 1$ durante los procesos de adhesión a las proteínas de la matriz extracelular de la MO, como el colágeno o la FN, podría inducir una regulación positiva de la expresión de varias proteínas anti-apoptóticas de la familia bcl-2 por la vía de señalización STAT3 (248).

3.4. Resistencia al tratamiento mediada por el microambiente

Del mismo modo que el microambiente medular en equilibrio es necesario para el mantenimiento y supervivencia de los diferentes linajes hematopoyéticos, un microambiente desregulado asegura la continuidad de las CP clonales, suministrando los requerimientos nutricionales y los estímulos inmunológicos para garantizar su prosperidad, ayudándole a evadir la acción de las terapias farmacológicas. Durante los tratamientos quimioterápicos, las células de MM se alojan en nichos que las protegen de señales pro-apoptóticas, confiriéndoles un perfil de resistencia a los medicamentos (249). Esta resistencia se consigue por dos vías:

1. una mediada por factores solubles como citocinas y factores de crecimiento secretados al medio de la MO, estableciendo interacciones paracrinas de supervivencia y
2. otra mediada por adhesión celular de las CP tumorales a fibroblastos y otras células del estroma, a componentes de la matriz extracelular como la FN o en la formación de sinapsis con células efectoras (250).

Respecto a los factores solubles, todos aquellos factores previamente descritos como inductores de proliferación o inhibidores de la apoptosis se asocian, al menos potencialmente, con resistencia al tratamiento. Por este motivo, solo citaremos el IGF-1, que además de promover el crecimiento facilita las metástasis de las células del MM y les

confiere un perfil fenotípico mesenquimatoso (251); el VEGF, cuya expresión se encuentra aumentada en el MM plasmablastico, una enfermedad histológicamente más agresiva por su alto grado de proliferación (252); el FGF, cuyo eje autocrino con el FGFR está implicado en la supervivencia y progresión de las CP del MM al protegerlas de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (253); TNF- α , que secretado por células mesenquimales del estroma de la MO induce la regulación negativa de TRAF2 y, como consecuencia, resistencia a fármacos inmunomoduladores (254); y la IL-8, que efectúa una regulación positiva sobre la supervivencia, la angiogénesis y la osteólisis en el MM (255).

En cuanto a la segunda vía, en el escenario de la resistencia a fármacos mediada por adhesión celular son de gran importancia las integrinas β 1, β 2, β 3 y β 7, las moléculas de adhesión MUC-1, CD44 e incluso CD138, que, como hemos detallado, poseen efecto regulador positivo de muchas vías de señalización que intervienen en la proliferación y supervivencia de las células de MM (256).

Respecto a las tetraspaninas, se ha demostrado que en pacientes con enfermedad no activa las CP tumorales expresan CD9, mientras que en la mayoría de los casos de enfermedad activa las CP son CD9 negativas. La expresión de CD9 se ha correlacionado con el estadio de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes con MM. Las modificaciones de histonas y la metilación de las regiones CpG del ADN, son eventos epigenéticos clave en la regulación negativa de CD9. Además, a medida que la expresión de CD9 se regula a la baja, las CP de MM se hacen menos susceptibles a la citólisis mediada por células NK (257). En líneas celulares de MM, la expresión de CD9 confiere mayor susceptibilidad a la citólisis mediada por linfocitos T y células NK activadas por IL-2 (258). Del mismo modo, se ha demostrado que la regulación a la baja de CD9 por metilación disminuye la sensibilidad a bortezomib en CP de MM y que la expresión de CD9 aumenta la sensibilidad a bortezomib mediante la inducción de la apoptosis y la inhibición de la adhesión de las CP a las células del estroma de la MO (259). Se han observado altos niveles de expresión de CD9 en vesículas extracelulares derivadas de CP de MM resistentes y en estados agresivos de la enfermedad en pacientes con supervivencia global menor de 2 años (260). Estas características convierten a CD9 en una potencial diana terapéutica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las CP de MO de la mayoría de los pacientes con MM expresan la $\beta 1$ integrina (CD29) en una conformación activa de alta afinidad por el ligando, y que dicha expresión es dependiente de la presencia de Mn^{2+} o VCAM-1 soluble en el plasma medular. Este epítipo conformacional asociado a activación se determina por CF mediante el uso del AcMo CD29 clon HUTS21. Los niveles de expresión de la forma activa de CD29 divide a los pacientes de MM en dos grupos: un grupo mayoritario con un nivel intermedio y un grupo minoritario con un nivel bajo o muy bajo de HUTS21.

Partiendo de estos antecedentes, nuestra hipótesis es que los distintos niveles de expresión tanto de la forma constitutiva como de la forma activa de CD29 pueden caracterizar a las diferentes fases de la enfermedad, desde la etapa pre-maligna del MGUS hasta la etapa más agresiva que se corresponde con la enfermedad extramedular, y que dichos cambios descansan en una expresión disminuida y una activación defectuosa cada vez más acusada que quizá pueda ser contrarrestada por otros tipos de integrinas o por tetraspaninas como CD9 capaces de exhibir conformaciones asociadas a activación.

2. Objetivos

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

1. Determinar los niveles de expresión de CD29, tanto en su forma constitutiva como activa, en las CP obtenidas en diferentes territorios y en las siguientes fases de la enfermedad: en MO, CP de pacientes con MGUS, de pacientes con MM con niveles diferenciados de CD29 sin EEM y de pacientes con EEM; y CP de pacientes con EEM obtenidas de otras localizaciones.
2. Investigar si las variaciones en el nivel de expresión de la forma activa de CD29 coinciden con una respuesta a cationes divalentes y una capacidad de unión a FN cada vez más defectuosas.
3. Valorar si la cuantificación por CF de la expresión de las formas constitutiva y activa de CD29 pueden ser biomarcadores útiles de progresión de la enfermedad.
4. Examinar si la pérdida de CD29 en las CP puede ser compensada con la expresión de otras integrinas que subsanen las capacidades funcionales alteradas.
5. Analizar la expresión de epítomos constitutivos y conformacionales (PAINS13) de la tetraspanina CD9 en las CP clonales de MO y su posible relación con el nivel de expresión de CD29.
6. Explorar a su vez la expresión del epítomo conformacional CD9 PAINS13 en diferentes linajes celulares de MO y su posible asociación con la maduración celular.
7. Estudiar los parámetros que regulan la expresión de PAINS13 en CP y su relación con la activación previa de CD29.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y tipos de muestras

Se analizaron las CP normales y tumorales de muestras de MO, SP, LP y LCR procedentes de pacientes con sospecha de gammapatías monoclonales tipo MGUS, MM, y enfermedad extramedular (EEM), y de aquellos pacientes en seguimiento tras el tratamiento quimioterápico o tras el trasplante con progenitores hematopoyéticos. Como grupo control se seleccionaron muestras de MO de pacientes con anemias o trombopenias periféricas mantenidas en el tiempo y sin causa conocida que no mostraron alteraciones significativas (sin infiltración por células tumorales y sin rasgos displásicos utilizando tanto criterios citológicos como inmunofenotípicos). Las muestras de MO utilizadas fueron el excedente de las obtenidas y utilizadas con fines diagnósticos rutinarios mediante punción-aspirado de la cresta iliaca y recogidos en tubos estériles de 5 ml con heparina de litio. La disgregación celular de los aspirados obtenidos se realizó por aspiración y expulsión repetidas con jeringa de 1 ml y aguja de diámetro inferior a 0,5 mm. Las muestras de SP se extrajeron también en tubos de heparina de litio. Las muestras de LP y LCR fueron obtenidas por toracocentesis y punción lumbar, respectivamente y recolectadas en tubo seco. La totalidad de las muestras fueron procesadas entre 2 y 24 horas después de su extracción.

Se estudiaron las muestras de MO de 18 pacientes con MGUS y 74 pacientes con MM. Muestras de SP de 6 pacientes con LCP, 5 muestras de LP, una de LCR y 14 controles sin gammapatías monoclonales. Los diagnósticos se establecieron según criterios clínicos junto con un análisis integrado de datos genéticos, inmunofenotípicos, citológicos e histológicos.

Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes para la obtención de las muestras de MO y, eventualmente, de otros territorios, según los criterios habituales del comité ético del hospital Ramón y Cajal.

2. Anticuerpos monoclonales (AcMo) y anticuerpos policlonales.

Se utilizaron los siguientes AcMo para el marcaje de las CP en la mayoría de los pacientes: anti-CD27, anti-CD28, anti-CD29 (clones MAR4 y HUTS21), anti-CD38,

anti-CD45, anti-CD49d (clon 9F10), anti-CD49f (clon GoH3), anti- β 7, anti-CD9 (M-L13), anti CD81, rat anti-mouse IgG3-FITC y anti-FAK (clon K73-480) fueron obtenidos de BD Biosciences (San José, CA). Los anticuerpos policlonales anti-Kappa y anti-Lambda se obtuvieron de Dakopatts A/S (Glostrup, Denmark). Los AcMo anti-CD3, anti-CD9 (clon ALB6), anti-CD19, anti-CD56 y anti-CD138 se obtuvieron de Beckman-Coulter (Hialeah, FL). El AcMo CD9 PAINS13 fue donado generosamente por el Dr. Carlos Cabañas del Departamento de Inmunología, Oftalmología y OTR, Facultad de Medicina, Universidad Complutense.

Los AcMo estuvieron conjugados con los siguientes fluorocromos: FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCP-Cy5.5 (complejo de proteína clorofila-peridina cianina 5.5), PE-Cy5 (ficoeritrina-cianina 5), APC (aloficocianina), BV421 (brilliant violet) y V500. Se utilizaron los siguientes AcMo bloqueantes en los ensayos de adhesión: AcMo anti-CD49d (clon HP2/1), AcMo anti-CD29 (clon 4B4), ambos suministrados por Beckman Coulter, y AcMo anti- β 7 (clon FIB504) (Biocompare).

3. Marcaje de antígenos de membrana con AcMo conjugados con fluorocromos

Tras dispensar 30-50 μ L de MO o SP en tubos de 5 mL, se añadieron cantidades óptimas de los diferentes AcMo conjugados con los fluorocromos referidos. Las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Tras este periodo de tiempo, 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, incubándose 10 minutos a TA. Las células se centrifugaron dos veces a 1400 revoluciones por minuto (rpm) con 3 mL de suero salino normal (SS) durante 5 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 μ L de SS para su posterior análisis por CF.

Para la detección de los antígenos de superficie en células de LP o LCR, se realizó el mismo protocolo previamente descrito, pero obviando el uso de la solución lisante y con una incubación con los AcMo 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 analizadas de inmediato en el CF.

4. Marcaje de antígenos de membrana con AcMo no conjugado con fluorocromo (marcaje de CD9 PAINS13)

Tras dispensar 30-50 μL de MO o SP en tubos de 5 mL, se añadieron 10 μL del AcMO puro de ratón anti-humano anti-CD9 (clon PAINS13) (isotipo IgG3) (anticuerpo primario). Tras una incubación de 20 minutos a TA, las células se lavaron 2 veces con PBS-BSA 1% para eliminar el exceso de AcMo no unido. Tras el último lavado, la muestra se incubó con el AcMo rat anti-mouse IgG3 conjugado con FITC (anticuerpo secundario) y con otros AcMo conjugados con fluorocromos frente a distintos antígenos humanos (ninguno de estos anticuerpos fue de isotipo IgG3) durante 30 minutos a TA. Tras esta incubación, se realizaron 2 lavados con PBS-BSA 1% para eliminar el exceso de anticuerpo. 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. Pasados 10 minutos de incubación con el lisante, se realizaron 2 lavados a 1400 rpm con 3 mL de PBS-BSA 1% durante 5 minutos. Por último, las células se resuspendieron en 150 μL de suero salino para el posterior análisis por CF. Se utilizaron controles que aseguraron que el anticuerpo secundario (rat anti-mouse IgG3-FITC) no reconoció ninguno de los anticuerpos conjugados que se añadieron en el cocktail de marcaje: en ausencia del AcMo primario (CD9 PAINS13), el anticuerpo secundario conjugado con FITC no reconoció a ninguno de los AcMo conjugados con otros fluorocromos, ya que no se detectó señal en el canal de fluorescencia correspondiente al FITC.

5. Detección de kappa y lambda citoplásmicas

La detección de los antígenos kappa y lambda citoplásmicos se realizó mediante la permeabilización de la membrana celular con el kit comercial Fix & Perm (Thermo Fisher Scientific). En una primera etapa, se añadieron los AcMo que reconocen los antígenos de superficie. Sin lavar la muestra, se añadieron 2 mL de la solución fijadora durante 20 minutos a TA. Terminado este tiempo, se centrifugó 7 minutos a 1400 rpm, seguido de un lavado con SS. Se añadió entonces 2 mL de la solución permeabilizadora y, paralelamente, 10 μL de un AcMo capaz de detectar el antígeno citoplásmico. Tras

incubar durante 20 minutos en oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS-BSA 1% y se resuspendieron en 300 μ L de SS previo al análisis por CF.

6. Protocolo experimental para la detección de CP por CF

La adquisición de las células se efectuó con el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson) equipado con el software de análisis FACSDiva. Las CP se identificaron como células con características intermedias de SSC (*side scatter*) y una elevada expresión de los antígenos CD38 y CD138. La diferenciación entre CP normales y tumorales, en los casos de MGUS o MM con población normal residual, se realizó en función de la expresión diferencial de varios de los antígenos de membrana: la población policlonal (normal) expresó en la práctica totalidad de los casos el siguiente perfil antigénico: CD38++CD138+CD19+CD56- mientras que las CP tumorales expresaron el perfil CD38++CD138+CD19-CD56+ en la mayoría de las ocasiones. La pérdida en la intensidad de expresión del antígeno CD27, del antígeno CD81 y/o la expresión del antígeno CD28 fueron de utilidad para diferenciar la población tumoral de la policlonal, más aún si la población tumoral no expresaba CD56. Además, en la gran mayoría de las ocasiones la intensidad de expresión del CD38 fue menor en la población de CP clonales.

7. Regulación de la forma activa de la integrina por el plasma medular y el líquido pleural (LP): obtención del plasma y el LP acelular

Para estudiar la contribución de los factores solubles en la regulación fisiológica de la forma activa de la integrina CD29 y del epítipo conformacional PAINS13 en las CP de muestras de MO y LP, se retiró el plasma medular o el LP para así suprimir el posible efecto de los factores solubles contenidos en ellos. Para ello, la muestra completa (células + líquido) del aspirado de MO o del LP se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm con el objeto de separar la fracción celular del plasma medular o del LP. Una vez el plasma y el LP fue retirado y guardado a 4°C, la fracción celular de la MO/LP se resuspendió en PBS frío y se centrifugaron a 1400 rpm durante 7 minutos (se realizan entre 3 y 5 de estos lavados). Posteriormente, 40 mL de las células fueron dispensadas en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano y resuspendidas en: 1) PBS, 2) el propio

plasma autólogo, 3) un plasma alogénico, 4) el propio LP autólogo, 5) en LP alogénico. La cantidad de plasma/LP reañadida a las células guardó una proporción idéntica o muy similar a la relación existente en condiciones fisiológicas (40 mL de células lavadas + 40 mL de plasma) o según conteo celular por mL en el caso del LP.

Transcurrida 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), CD9 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 y la tetraspanina fue determinada por CF.

8. Análisis de la activación de CD9 y CD29 por cationes divalentes.

Para los ensayos de activación de la integrina CD29 y del estudio del epítipo CD9 PAINS13 con cationes divalentes añadidos exógenamente, las CP de muestras de MO, SP, LP fueron lavadas 5 veces con PBS con el fin de eliminar cualquier vestigio de plasma medular o LP. Posteriormente se dispensaron 40 µL de la fracción celular en placas de 96 pocillos de fondo plano y resuspendidas en 40 µL de un buffer HEPES conteniendo el catión divalente Mn^{2+} en un rango amplio de concentraciones (desde 0,01 mM hasta 5 mM). Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Como control positivo se utilizaron células incubadas sin procesamiento y células lavadas como se indicó previamente a las que se les reintrodujo el plasma medular. Como control negativo se emplearon células incubadas en tampón HEPES sin cationes. Una vez terminado el tiempo de incubación y sin lavados previos, las células procedentes de los pocillos fueron marcadas con los AcMo CD38 FITC, CD9 PAINS13, CD29 PE (clon HUTS21), y CD45-PerCP. Tras dos lavados con PBS, se determinó la expresión del epítipo CD9 PAINS13 y la forma activa de la integrina CD29 (epítipo HUTS21) en la membrana de las CP por CF.

9. Detección de la proteína FAK

Las células de MO se obtuvieron tras la lisis de los hematíes con cloruro de amonio al 0,8%, añadiendo 0,5 mL por cada 50 µl de aspirado de MO. Se incubó la muestra con el cloruro de amonio durante 15 minutos, y previa centrifugación a 1400 rpm durante 7

minutos, se procedió a lavar en dos ocasiones con PBS-1% suero de ternera fetal (STF) descomplementado. Posteriormente, las células se resuspendieron en 100 μ l de PBS y se fijaron en una solución que contenía 2 mL de formaldehído (20%), etanol (15%) y metanol (7%) a 37 °C durante 10 min. A continuación, las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 7 minutos y se lavaron dos veces con PBS-1% STF. La permeabilización de las células se realizó tras la adición de 1 mL de metanol al 80% conservado a -30°C. Se incubó durante media hora en hielo. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS-1% STF. Finalmente, se resuspendió el pellet celular en 300 μ l de PBS-1% STF y se procedió al marcaje con el AcMo anti-FAK-PE (clon K73-480, que reconoce la forma fosforilada del antígeno) durante 30 minutos en oscuridad. A la par se realizó el marcaje de antígenos de superficie como CD9, CD29, CD38, CD56 y CD138. Tras dos lavados con PBS/1% BSA, las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS y de inmediato analizadas en el CF.

10. Purificación de CP.

Las CP se purificaron a partir del pellet obtenido tras la lisis con cloruro de amonio, tal y como se explica en el apartado anterior. La selección positiva de las CP comenzó con la incubación de la celularidad total con un AcMo anti-CD138-PE durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con PBS-1% BSA para eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Se añadieron entonces partículas inmunomagnéticas (Becton Dickinson) unidas a un AcMo anti-PE. Las células mononucleares de MO/LP se incubaron en agitación a 4°C y durante 30 minutos con las partículas inmunomagnéticas. Se usaron de 10-20 μ L de partículas magnéticas por cada 1×10^6 de CP. Posteriormente, se realizaron 2 lavados a 1400 rpm con el tampón del kit (BD IMag™ Buffer, Becton Dickinson) durante 7 minutos. El tubo contenedor de las células se posicionó durante 15 minutos en un imán de separación (Cell Separation Magnet, Becton Dickinson). Posteriormente, y sin retirar el tubo del imán, se eliminó el sobrenadante cuidando de no tocar la pared del tubo más próxima al imán. Acto seguido, se apartó el tubo del imán y se añadió 1 mL de PBS 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 enérgicamente en 1mL con PBS y el tubo se volvió a posicionar en el imán, repitiéndose el último paso. Finalmente, se añadió 1mL de PBS

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. Terminado el protocolo se realizó el recuento de células separadas tanto de la fracción positiva como de la fracción negativa. La pureza de las CP de MO alcanzada 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). En el LP, la purificación de las CP alcanzó el 98%- 100%.

11. Ensayos de adhesión.

La determinación de la adhesión de CP a FN (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) se realizó según el procedimiento descrito por Goodwin y Pauli (261). En primer lugar, se incubaron 2 mg de FN a 4°C durante toda la noche en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente, los pocillos fueron bloqueados durante 2 horas con PBS-2% BSA a TA para así reducir uniones no específicas. Las CP purificadas de muestras de MO o de LP fueron previamente biotiniladas a TA durante 20 minutos con NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) en un tampón HEPES/NaCl conteniendo 1mM de Mg^{2+} y 1mM de Ca^{2+} . Tras dos lavados, las CP fueron resuspendidas en tampón HEPES conteniendo 1 mM de Mn^{2+} . Posteriormente se añadieron 10^5 células / 100 μ L a los pocillos para que sedimentaran durante 10 minutos a 4°C. Acto seguido, la placa fue llevada a un incubador de CO_2 durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron muy lentamente a cada pocillo 200 μ l de un medio de flotación de Percoll (densidad 1.10 g/mL) y poco después 50 μ l de fijador (glutaraldehído al 1,4% de concentración final). Se realizaron 3 lavados con PBS para retirar las células no unidas. 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), anti- β 7 (clon FIB504) o con un AcMo irrelevante de ratón (mouse IgG). Como paso final, se añadieron secuencialmente 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 492 nm. Como control negativo de adhesión se utilizó BSA (Sigma-Aldrich) al 5%.

12. Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas se describieron por la mediana y el intervalo de confianza, o la mediana y el rango intercuartílico en función de si cumplían o no la asunción de normalidad. Se empleó la prueba de chi-cuadrado o test exacto de Fisher para la comparación de frecuencias y la t de Student o Mann-Whitney para la comparación de medias o medianas respectivamente. Se utilizó el test de regresión lineal para valorar la correlación entre la molécula constitutiva CD9 y el epítipo CD9 PAINS13.

RESULTADOS

1. Los niveles de expresión de las formas constitutiva y activada de la integrina CD29 como marcador en la progresión de MGUS a MM

Nuestro grupo ha descrito previamente que las CP de MO de pacientes con MM pueden dividirse en dos grupos atendiendo a la diferente expresión de la β 1 integrina (CD29) tanto en su forma constitutiva (detectada con el AcMo anti-CD29 MAR4) como en su forma activada (detectada con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21). Aunque el grupo de pacientes caracterizado por la pérdida de expresión, en ocasiones bastante acusada, de ambas formas de CD29 en sus CP mostraba características biológicas propias de una célula perteneciente a una etapa más avanzada de la enfermedad, una primera y nueva aproximación que podría reafirmar la consideración de la pérdida gradual de CD29 como una alteración asociada al avance de la enfermedad, partía del estudio de CP de individuos sanos como probable ejemplo de célula con niveles intactos, y también más altos, de CD29 y continuaba con las CP clonales en el MGUS, una fase considerada como pre-maligna en el grupo de entidades catalogadas como neoplasias de CP. En consonancia con los datos previos, los resultados confirmaron que las CP de MO de individuos sanos expresaron la forma constitutiva de CD29 con mayor intensidad que las CP clonales de pacientes con MGUS y que estos, a su vez, la expresaban con mayor intensidad que las CP malignas de pacientes con MM (sin separar a los pacientes en los dos grupos antes referidos) ($p= 0,035$) (**Figura 4A**). Por otro lado, también se encontraron diferencias en la expresión de la forma activa de CD29 (epítipo HUTS21) entre las CP de pacientes con MM y las CP de sujetos sanos, tanto en porcentaje ($p= 0,0125$) como en IMF ($p= 0,0031$). A su vez, el porcentaje de CP HUTS21+ fue significativamente mayor en los pacientes con MGUS respecto a los pacientes con MM ($p= 0,019$). Aunque no hubo diferencias significativas en el porcentaje de expresión de HUTS21 al comparar CP normales y CP clonales de MGUS, se observa una tendencia a un porcentaje mayor de expresión de la forma activa de la integrina en las CP de individuos con MO normales (**Figura 4B**). Por lo tanto, en esta primera aproximación se confirma una pérdida escalonada de ambas formas de CD29 entre CP normales y CP clonales de MGUS y entre estas y las CP de MM.

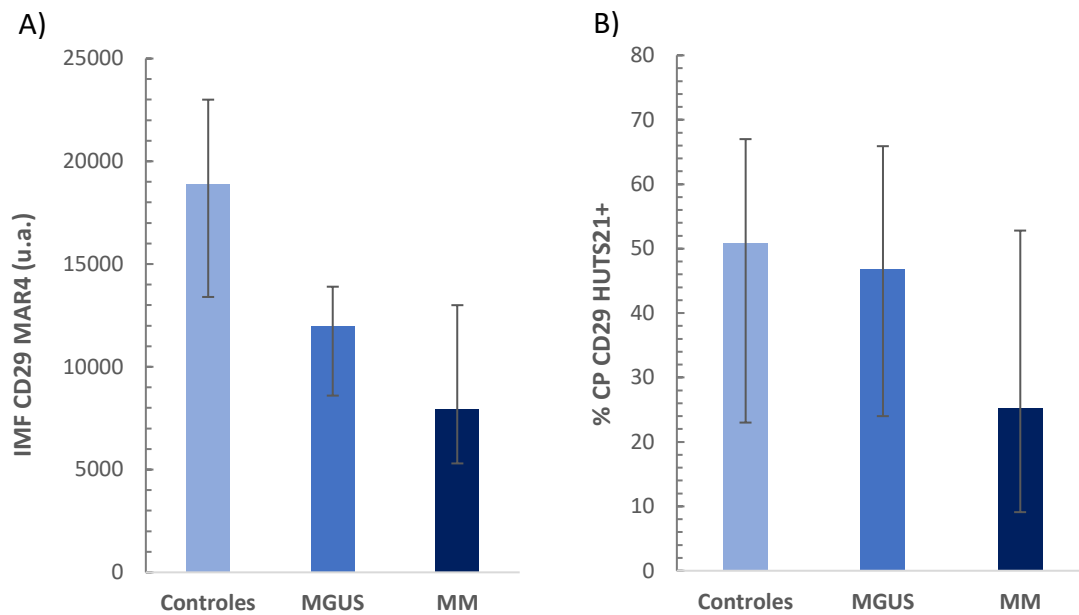


Figura 4. Comparación de la intensidad de expresión (IMF: intensidad media de fluorescencia; expresada en unidades arbitrarias -u.a.-) de la forma constitutiva de CD29 (CD29 MAR4) y del porcentaje de la forma activada de CD29 (CD29 HUTS21). A) IMF de CD29 MAR4 en CP de controles, MM y MGUS. Controles versus MGUS, $p=0,009$; controles versus MM, $p=0,0001$; MGUS versus MM $p=0,035$ B) Porcentaje de expresión de CD29 HUTS21 en controles, MM y MGUS. Controles versus MM $p=0,0125$; MGUS versus MM, $p=0,019$. Controles: $n=14$; pacientes con MM: $n=50$; pacientes con MGUS: $n=18$.

2. Los niveles de expresión de las formas constitutiva y activada de la integrina CD29 divide a los pacientes con MM en dos grupos

Dado que CD29 se expresaba con una cierta heterogeneidad en los pacientes con MM y considerando los resultados antes expuestos en pacientes con MGUS y MM, quisimos corroborar que los pacientes con MM podían dividirse en dos bloques: un bloque con expresión de CD29 constitutivo y activo cercano a las CP de pacientes con MGUS y un segundo bloque de pacientes con una disminución significativa en la intensidad de expresión del epítipo MAR4. En la **Figura 5**, se muestran dos ejemplos representativos de ambos tipos de paciente en los que se establece, una vez más, la relación existente entre la “cantidad” (intensidad) de la integrina constitutiva y “la cantidad” de la forma activada. Las diferencias en la IMF de CD29 MAR4 y en la IMF y el porcentaje de CD29 HUTS21 fueron significativas entre ambos grupos (**Figura 6**).

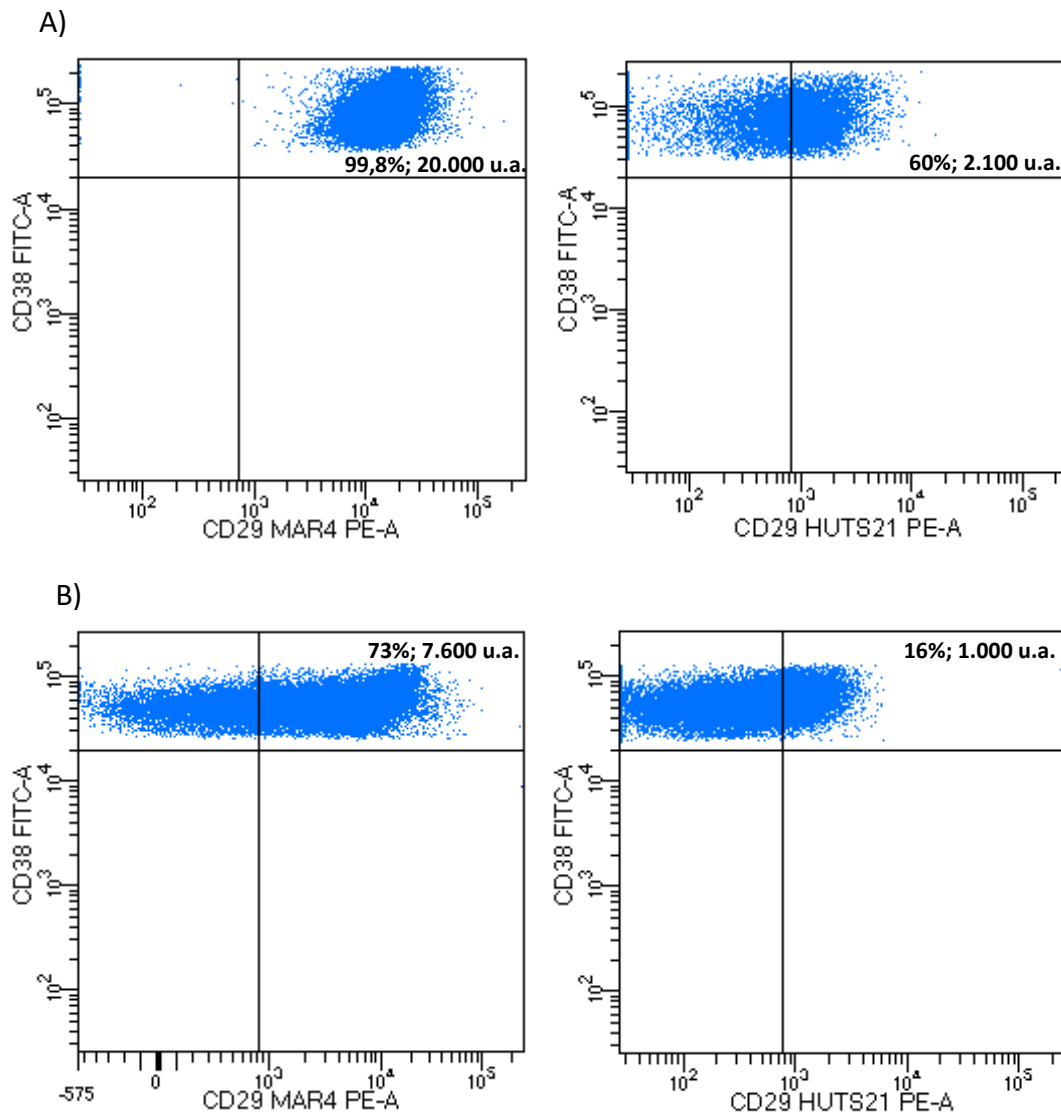


Figura 5. Porcentaje e IMF (u.a.) de la forma constitutiva (MAR4) y activada (HUTS21) de la molécula CD29 en las CP de MO de diferentes grupos de pacientes con MM. A). Ejemplo representativo del grupo mayoritario de pacientes con MM cuyas CP de MO expresan niveles intermedios de la forma constitutiva de CD29 y niveles significativos de la forma activada de esta molécula. B) Ejemplo representativo del grupo minoritario de pacientes con MM cuyas CP de MO expresan niveles bajos de la forma constitutiva de CD29 y niveles disminuidos de la forma activada de esta molécula. En el interior de cada dot-plot se muestra el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD29 MAR4 y CD29 HUTS21.

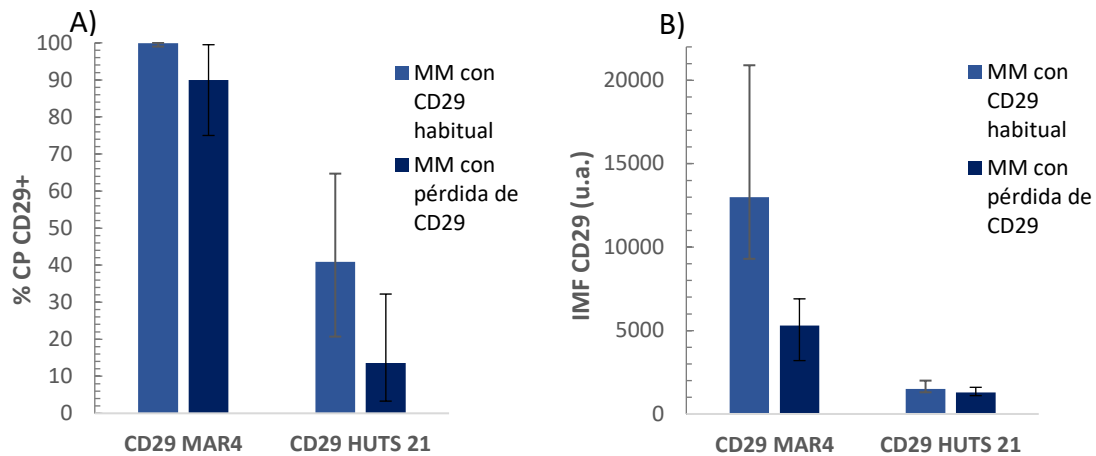


Figura 6. Comparación del porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de la forma constitutiva (MAR4) y activada (HUTS21) de CD29 en diferentes grupos de pacientes con MM. **A)** Comparación porcentual del CD29 constitutivo y activo entre el grupo de MM con expresión habitual de CD29 y el grupo con pérdida de expresión de este antígeno. **B)** Comparación de la expresión en IMF del CD29 constitutivo y activo entre el grupo de MM con expresión habitual de CD29 y el grupo con pérdida de expresión de este antígeno. $n=70$ (35/35). Comparación %CD29 MAR4 $p < 0,0001$; comparación % CD29 HUST21 $p < 0,0001$. Comparación % CD29 HUTS21 $p = 0,0001$; comparación IMF CD29HUTS21 $p = 0,01$.

3. Las CP malignas de MO en pacientes con EEM exhiben una marcada alteración en la expresión, activación y capacidad adhesiva de la integrina CD29

En un estudio previo, nuestro grupo demostró que los pacientes con MM pueden dividirse en dos bloques atendiendo a los niveles intermedios o bajos de la expresión constitutiva de la molécula CD29 en las CP, niveles que correlacionaron con la presencia o ausencia de la forma activa de la molécula y, a su vez, con la mayor o menor capacidad de adherencia al microambiente de la MO. Por este motivo, nuestro objetivo fue comprobar si las CP de MO de los pacientes con EEM expresaban niveles normales o disminuidos de la forma constitutiva y activada de CD29. De los cinco pacientes con EEM en el líquido pleural, en cuatro de ellos se detectó población de CP tumorales en el aspirado de MO: dos de los pacientes con 21% y 32% de CP clonales, compatibles con recaída de la enfermedad, y en otros dos con 0,7% y 0,29% de CP mielomatosas, en coexistencia con CP normales. Cuando se comparó el porcentaje de CP de MO que expresaban la forma constitutiva de la integrina $\beta 1$ (CD29) en los cuatro pacientes con EEM presente en efusión pleural con respecto a los pacientes con MM sin EEM ($n=21$), el porcentaje no difirió significativamente entre ambos grupos 100% (rango: 99,5% – 100%) versus 98,8% (rango: 96,9% – 100%), respectivamente; $p = 0,3$ (Figura 7A). Por

el contrario, la IMF de la forma constitutiva de la molécula CD29 sí que difirió significativamente entre ambos grupos: 2.150 u.a. (rango: 1.260 u.a. – 3.850 u.a.) en pacientes con EEM *versus* 12.300 u.a. (rango: 9.000 u.a. – 20.200 u.a.) en pacientes sin EEM ($p= 0,0001$) (**Figura 7B**). A su vez, se muestra un ejemplo representativo de la expresión de este antígeno en los dos grupos de pacientes (**Figura 8**).

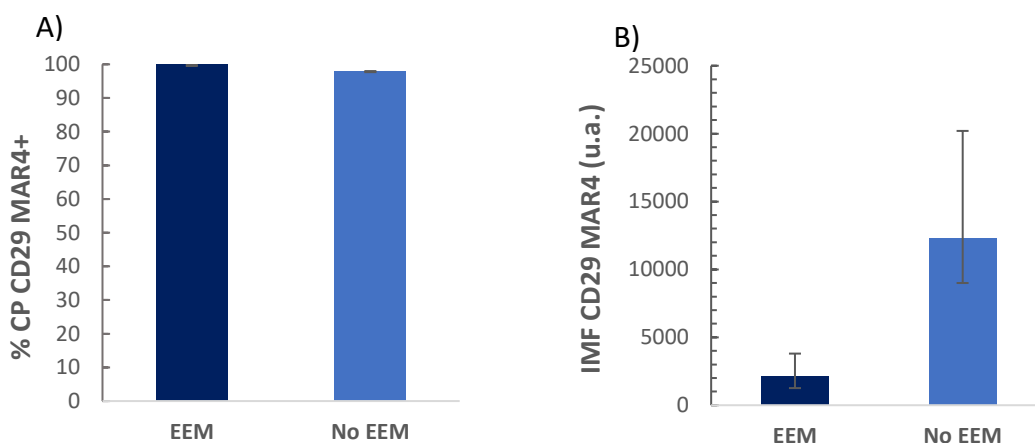


Figura 7. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma constitutiva de las CP de MO en pacientes con EEM y sin EEM; A) Porcentaje de expresión de la forma constitutiva de la forma constitutiva de CD29 (determinado con el Ac Mo anti-CD29 clon MAR4) en las CP de MO de pacientes con EEM y sin EEM. La mediana de expresión no difirió significativamente; B) Intensidad media de fluorescencia (IMF) (expresada en unidades arbitrarias: u.a.) de la forma constitutiva de la molécula CD29 en las CP de las MO de pacientes con EEM y sin EEM. MM con EEM: n=4, MM sin EEM: n=21 ($p= 0,0001$).

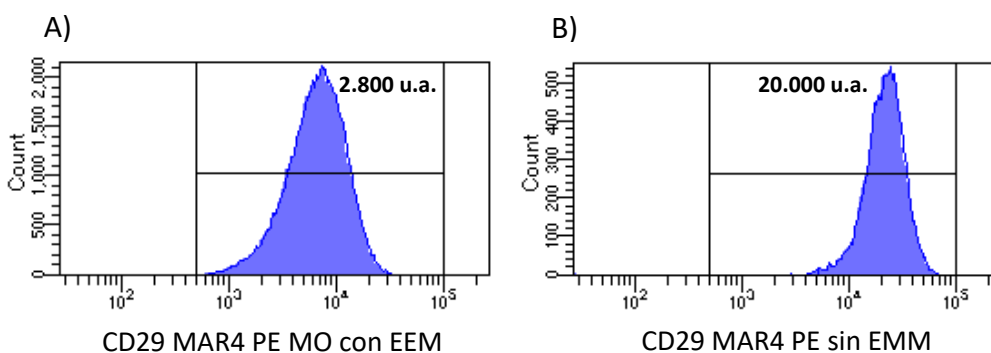


Figura 8. Porcentaje e IMF (u.a.) de la forma constitutiva de CD29 en CP de MO de pacientes con EEM y sin EEM; A) Ejemplo representativo del porcentaje y de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la forma constitutiva del CD29 de un paciente con EEM. B) Ejemplo representativo del porcentaje y la IMF de las CP de un paciente sin EEM.

Atendiendo a estos resultados, quisimos comprobar si existía una asociación entre la disminución de la IMF de la forma constitutiva de CD29, determinado con el AcMo clon MAR4, y la expresión de su forma activa (de alta afinidad por el ligando),

determinada con el uso del AcMo clon HUTS21. En este caso y como se observa en la **Figura 9A**, el porcentaje de células CD29 HUTS21+ fue claramente inferior en las CP de MO de pacientes con EEM con respecto a los pacientes sin EEM (10,2%, rango: 0% - 18% *versus* 44,6% rango: 32,9% - 61%, respectivamente; $p < 0,0001$). A su vez, la IMF de la forma activa de CD29 difirió significativamente entre ambos grupos: 920 u.a. (rango: 0 u.a. - 1.080 u.a.) en pacientes con EEM *versus* 1.460 u.a. (rango: 1.280 u.a. - 1.900 u.a.) en pacientes sin EEM: ($p = 0,02$) (**Figura 9B**). Se muestra también un ejemplo representativo de la expresión del epítipo de activación HUTS21 en ambos tipos de paciente (**Figura 10**).

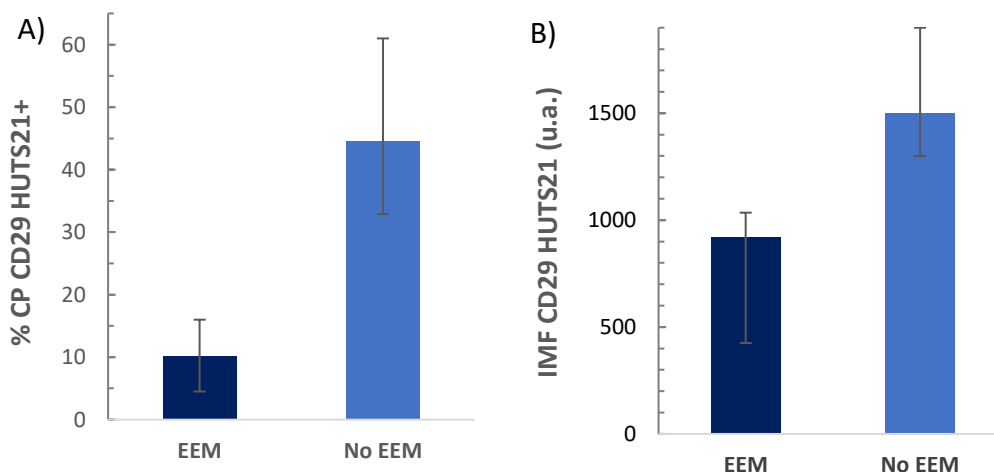


Figura 9. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma activa de CD29 de las CP en MO de pacientes con EEM y sin EEM; A) Expresión porcentual disminuida de la forma activa de la molécula CD29 de la MO de los pacientes con EEM (n=4) respecto a pacientes con MM sin compromiso extramedular (n=21) ($p = 0,0001$). **B)** expresión disminuida en términos de IMF de la forma activa de la molécula CD29 de la MO de los pacientes con EEM (n=4) respecto a pacientes con MM sin compromiso extramedular (n=21) ($p = 0,02$)

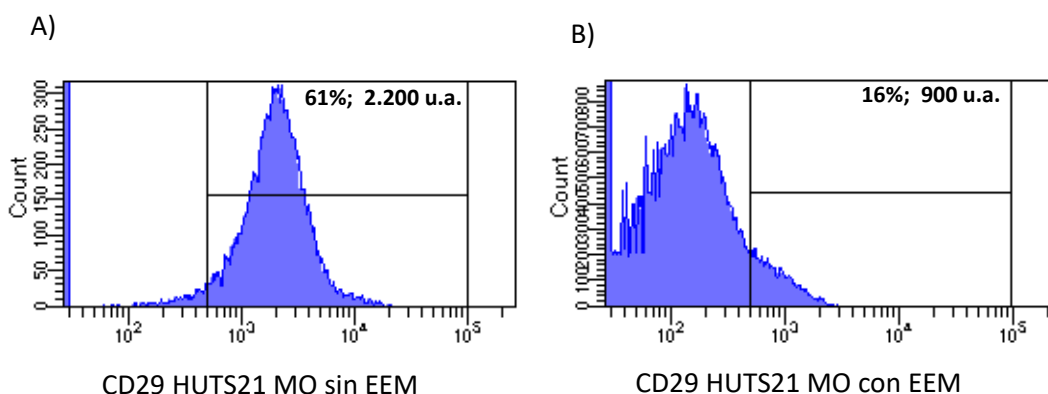


Figura 10. Porcentaje e IMF (u.a.) de la expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO de pacientes con EEM y sin EEM; A) Ejemplo representativo del porcentaje y la IMF de la forma activa del CD29 de un paciente sin EEM. **B)** Ejemplo representativo del porcentaje e IMF de las CP de un paciente con EEM.

La diferente expresión *ex vivo* de la molécula CD29 en las CP de MO, tanto en su forma constitutiva como, especialmente, en su forma activa, en pacientes de MM con EEM respecto a los pacientes sin EEM, nos condujo a evaluar la capacidad de respuesta de las CP de MO de los pacientes con EEM a la adición *in vitro* de Mn^{2+} , el catión divalente más potente para la activación de CD29 y, por lo tanto, para conseguir la conformación de alta afinidad de esta molécula detectada con el clon HUTS21. Para ello, se eliminó previamente el plasma autólogo del aspirado y a continuación las CP de MO se cultivaron en presencia de Mn^{2+} utilizado en un amplio rango de concentraciones (0,02 mM a 2 mM). Tal y como puede observarse en la **Figura 11**, las CP de MO de pacientes con EEM respondieron de manera muy deficiente a la adición exógena de Mn^{2+} , incluso a la máxima concentración de este catión (2 mM). Por el contrario, las CP de MO de pacientes sin EEM respondían de forma óptima, alcanzando el *plateau* de activación máxima de la integrina CD29 a concentraciones de Mn^{2+} que oscilaban entre 0,2 y 0,5 mM.

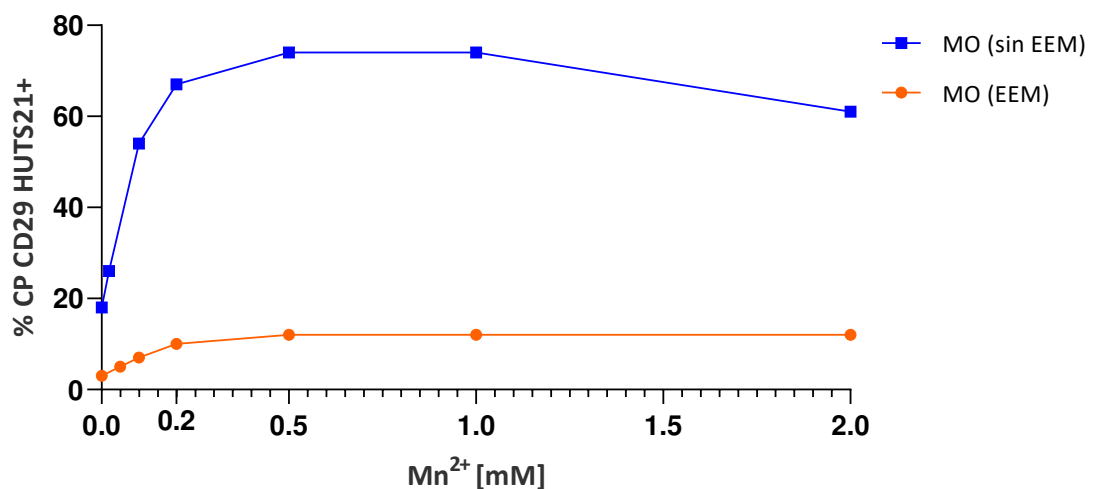


Figura 11. Efecto del Mn^{2+} en el porcentaje de activación de CD29 en las CP de MO de pacientes sin EEM y con EEM; Efecto de diferentes concentraciones del catión divalente Mn^{2+} en la expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO en un ejemplo representativo de un paciente con EEM y en un paciente sin EEM. La forma activa de CD29 se detectó con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21.

Dado que las CP se unen fuertemente a la fibronectina (FN) del microambiente medular utilizando la cadena $\beta 1$ común, o CD29, como molécula principal de anclaje (asociada fundamentalmente a la cadena $\alpha 4$), quisimos determinar si la expresión disminuida *ex vivo* de esta molécula en las CP de MO de pacientes con EEM, así como su refractariedad a la activación con cationes divalentes, correlacionaba con una baja

capacidad de unión a FN. Se realizaron ensayos de adhesión con CP purificadas de MO, en presencia de una cantidad óptima de Mn^{2+} (0,5 mM). La **Figura 12** muestra cómo las CP de MO de pacientes sin EEM se unieron fuertemente a FN, y que tal unión fue inhibida en un 70%-85% tras la adición de anticuerpos bloqueantes anti-CD29 (clon 4B4) o anti-CD49d (clon HP2/1). Por el contrario, las CP de MO de pacientes con EEM se unieron de forma muy deficiente a FN, aunque dicha unión seguía siendo parcialmente dependiente de CD29 y CD49d.

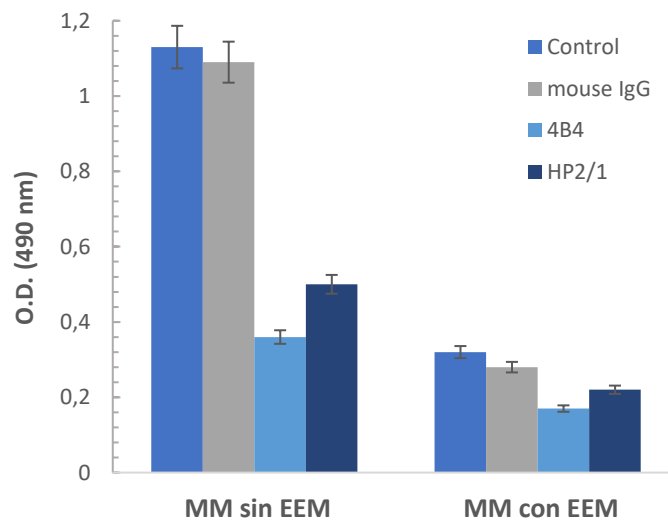


Figura 12. Ensayo de adhesión a FN en CP de MO sin EEM o con EEM. CP purificadas se añadieron a pocillos previamente revestidos con FN en presencia de una cantidad óptima de Mn^{2+} . En los pocillos no se añadió ningún tipo de anticuerpo (control) o se añadió un AcMo irrelevante (mouse IgG) o anticuerpos bloqueantes anti-CD29 (clon 4B4) o anti-CD49d (clon HP2/1). La adhesión a FN fue cuantificada según se describe en Materiales y Métodos. O.D.: unidades de densidad óptica

Todos estos resultados demuestran que en las CP de MO de pacientes con EEM, se establece una evidente asociación entre los niveles disminuidos *ex vivo* de CD29 constitutivo o activado, su refractariedad a responder *in vitro* a factores activantes como el Mn^{2+} y una capacidad reducida de adhesión a FN. Todas estas alteraciones predicen que las CP de estos pacientes puedan escapar potencialmente de su nicho habitual de MO.

4. Las CP malignas ubicadas en áreas diferentes al microambiente de MO en pacientes con EEM mimetizan y acentúan los déficits observados en las células tumorales de MO

Hasta el momento, hay muy pocas publicaciones que esclarezcan los mecanismos moleculares subyacentes a la patogenia de la EEM en el MM. Las alteraciones descritas

en las CP de MO en estos pacientes suponen un punto de partida plausible en la búsqueda de las razones que expliquen el comportamiento de las CP tumorales en territorios distintos a la MO.

Los resultados experimentales se describirán en el mismo orden que los detallados en las CP de MO. Las CP tumorales presentes en el líquido pleural de los 5 pacientes con EEM (en todos los casos las CP clonales representaron más del 80% de la celularidad total viable de la muestra) expresaron la forma constitutiva de CD29 en la práctica totalidad de las CP mielomatosas (99,2%; rango: 99,1% – 100%), de manera similar a las CP de MO de estos mismos pacientes. Sin embargo, la IMF de la forma constitutiva sí que difirió significativamente entre las CP del líquido pleural respecto a su contrapartida de MO: 1.680 u.a. (rango: 1.180 u.a. – 2.350 u.a.) *versus* 2.150 u.a. (rango: 1.260 u.a. – 3.850 u.a.) respectivamente ($p= 0,04$) (**Figura 13B**).

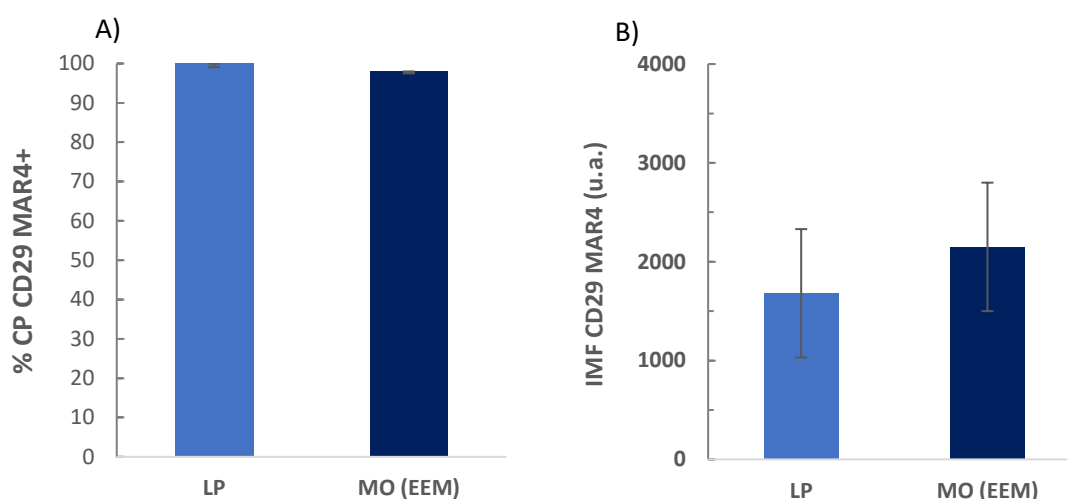


Figura 13. Comparación del porcentaje de expresión y de la IMF (u.a.) de la forma constitutiva de CD29 en CP de líquido pleural (LP) y CP de MO de pacientes con EEM. La expresión de la forma constitutiva de CD29 se determinó por CF con el AcMo anti-CD29 clon MAR4, y se cuantificó en las CP del LP (n=5) y de la MO (n=4) de pacientes con EEM, tanto en porcentaje (A) como en IMF (B). $p= 0,04$

De manera aún más acusada que en MO, las CP malignas del líquido pleural apenas expresaron la forma activa (epítipo HUTS21) de la molécula CD29: 4,1% (rango: 3,2% – 4,9%) con respecto a un 10,3% (rango: 0% – 18%) en MO ($p= 0,04$). A su vez, la IMF de la forma activa de CD29 fue significativamente distinta en ambos territorios: 670 u.a. (rango: 610 u.a. – 720 u.a.) en el LP respecto a 920 u.a. (rango: 425 u.a. – 1035 u.a.) en MO ($p= 0,04$) (**Figura 14B**). En la **Figura 15** se muestra un ejemplo

representativo de la expresión de la forma activa de CD29 en las CP del líquido pleural de uno de los pacientes con EEM.

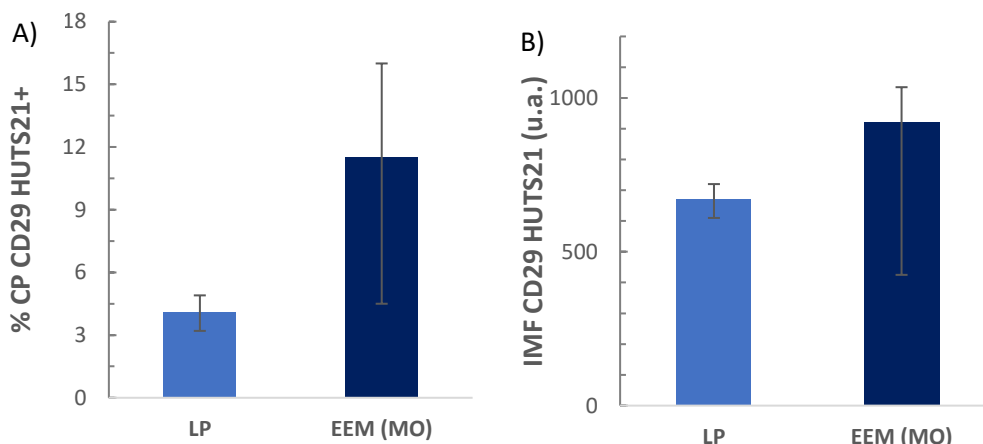


Figura 14. Comparación del porcentaje de expresión y de la IMF (u.a.) de la expresión de la forma activa de CD29 en CP de LP y MO de pacientes con EEM. La expresión de la forma activa de CD29 se determinó por CF con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21, y se cuantificó en las CP del LP (n=5) y de la MO (n=4) de pacientes con EEM, tanto en porcentaje (a) ($p=0,04$) como en IMF (b) ($p=0,04$).

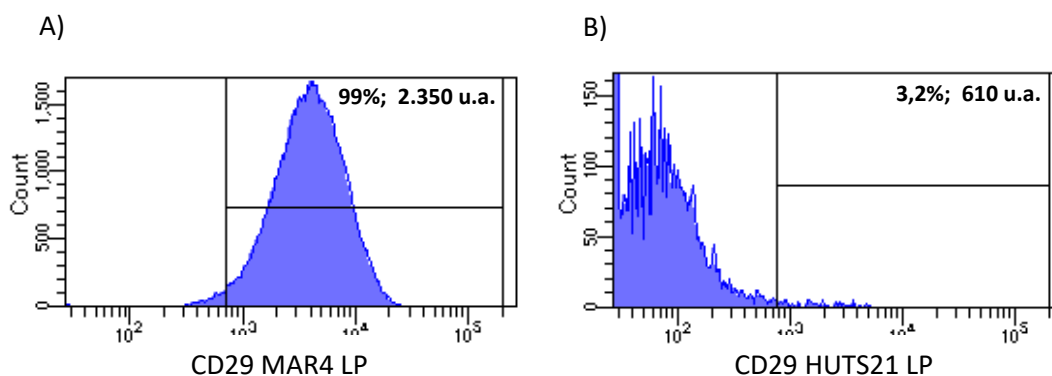


Figura 15. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de la forma constitutiva y activa de CD29 en las CP de LP. A) Ejemplo representativo de la expresión en CP de LP de la forma constitutiva de CD29, determinada con el AcMo anti-CD29 clon MAR4 y B) de la forma activada de CD29, determinada con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21.

La ausencia prácticamente total de la forma activa de CD29 en las CP tumorales del líquido pleural nos llevó a determinar el efecto de la adición *in vitro* de Mn^{2+} . Primeramente, se eliminó el líquido pleural en el que estaban bañadas las células, para a continuación cultivarlas en presencia de Mn^{2+} utilizado en un amplio rango de concentraciones (0,02 mM a 1 mM). Tal y como puede observarse en la **Figura 16**, las CP tumorales del líquido pleural fueron completamente refractarias a la activación

mediada por el catión divalente. Por comparación, se muestra en el mismo gráfico la respuesta deficiente, pero cuantificable, de la expresión del epítipo HUTS21 tras la adición del catión en las CP de MO del mismo paciente, así como de las CP de MO de un paciente con MM pero sin EEM como ejemplo de respuesta óptima al efecto activador del Mn^{2+} .

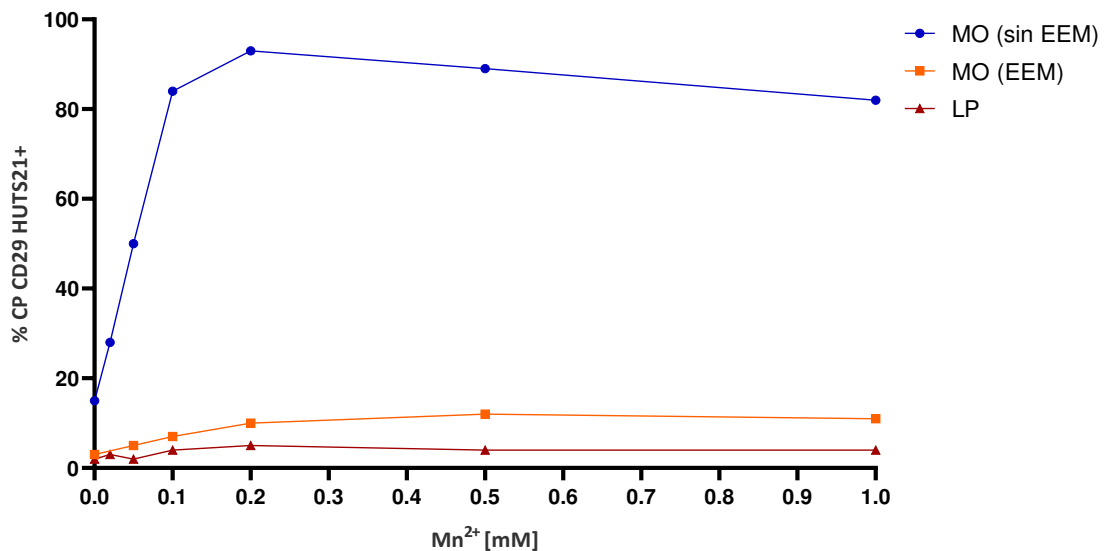


Figura 16. Efecto diferencial del Mn^{2+} en el porcentaje de activación de CD29 en las CP de MO y LP de un paciente con EEM y en MO de un paciente sin EEM. Se eliminó el plasma de la MO y el líquido del derrame pleural para, a continuación, incubar las CP de MO y LP con cantidades crecientes de Mn^{2+} . La expresión de la forma activa de CD29 se determinó con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21.

El uso del Mn^{2+} como agente activador de CD29 responde a la facilidad de su uso y a su elevada potencia para estimular la expresión del epítipo HUTS21. Aun así, quisimos corroborar la incapacidad de las CP del líquido pleural para adquirir la forma de alta afinidad de CD29 utilizando otros activadores. En concreto, utilizamos el plasma alogénico de aspirados de MO de individuos sanos o de pacientes con MM con niveles intermedios de HUTS21 en sus CP. El plasma alogénico no solo contiene Mn^{2+} , sino también otros cationes divalentes o la forma soluble de VCAM-1 (CD106), que están descritos en la literatura científica como activadores de CD29. Como puede observarse en la **Figura 17**, el plasma alogénico no tuvo un efecto significativo como estímulo en la expresión de HUTS21. De manera similar, el uso del LP de pacientes sin evidencia de enfermedad tumoral tampoco tuvo efecto en el cambio de CD29 desde su forma inactiva hasta su forma activa.

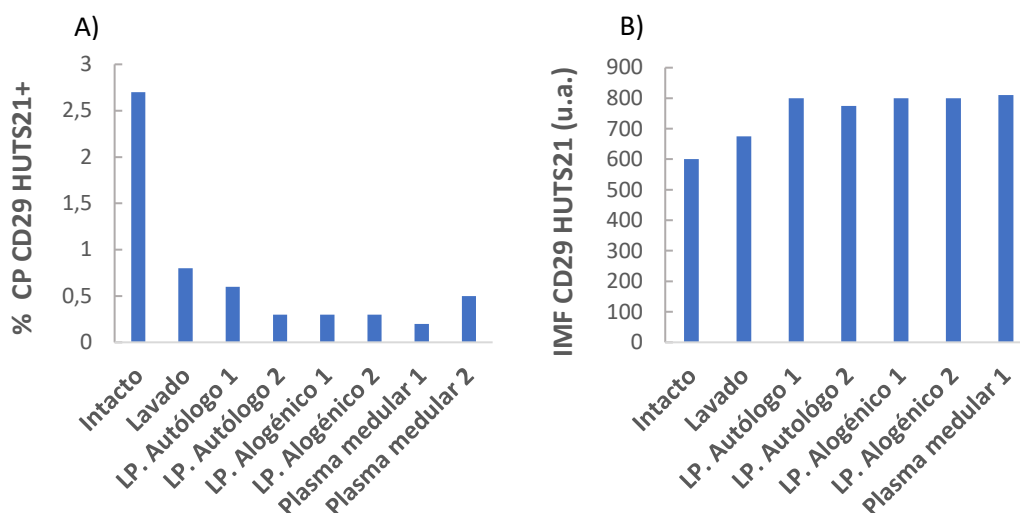


Figura 17. Efecto de otros agentes activadores en la expresión porcentual de la forma activa de CD29 en CP de LP de un paciente con EEM. No se evidencian cambios significativos ni en el porcentaje de expresión ni en la IMF (u.a.) de la forma activa del CD29 al adicionar LP autólogo o alogénico ni al agregar plasma medular de pacientes con MM sin EEM (plasma medular 1) o de un paciente con MO normal (plasma medular 2).

Como era previsible, en ensayos de adhesión a FN, la casi completa ausencia *ex vivo* de la forma activa de la integrina CD29 en las CP malignas del líquido pleural de pacientes con EEM, así como la incapacidad prácticamente total del Mn^{2+} (o de otros activantes) para revertir este estado, se asoció a una casi nula capacidad de las CP malignas del LP para adherirse a esta proteína (**Figura 18**).

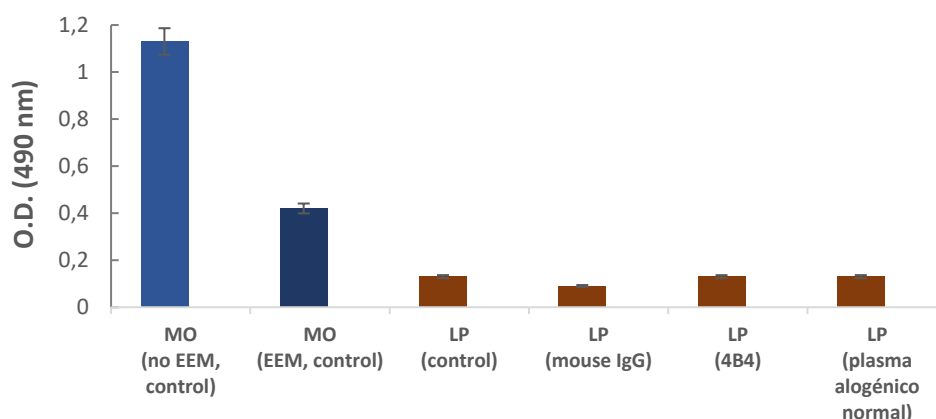


Figura 18. Adhesión a FN de CP de MO de MM sin EEM o con EEM y de CP de LP. CP purificadas de MO o LP se añadieron a pocillos previamente revestidos con FN en presencia de una cantidad óptima de Mn^{2+} . En los pocillos no se añadió ningún tipo de AcMo (control) o se añadió un AcMo irrelevante (mouse IgG) o anticuerpos bloqueantes anti-CD29 (clon 4B4). En el caso de las CP purificadas de LP, se incluyó una modalidad de cultivo en que se añadió plasma alogénico de una MO normal. La adhesión a FN fue cuantificada según se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un ejemplo representativo de las CP de MO de un paciente con MM sin EEM y de CP de MM con EEM, procedentes tanto de MO como de LP. O.D.: unidades de densidad óptica.

Una forma muy poco habitual de EEM en la historia natural del MM es aquella caracterizada por la infiltración del LCR por CP malignas. Se extrajo el LCR a un paciente con MM con síntomas sospechosos de infiltración del sistema nervioso central, confirmándose la presencia de células tumorales por citometría de flujo. Las CP aberrantes no expresaron el epítipo HUTS21 característico de la conformación activa de CD29 a pesar de que el total de las CP expresaban la forma constitutiva de la molécula. Dado el escaso número de células en el LCR, solo pudimos comprobar el efecto de una única concentración de Mn^{2+} (5 mM), comprobando que las CP malignas del LCR eran por completo refractarias al efecto inductor del catión (**Figura 19**).

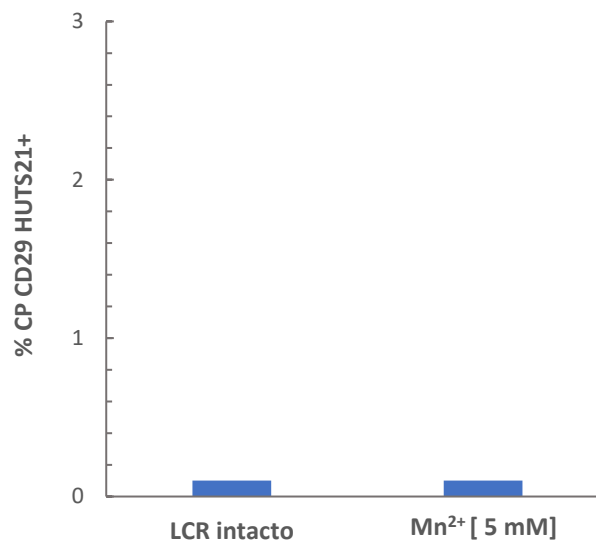


Figura 19. Las CP del LCR no expresan la forma activa de CD29 y son por completo refractarias a la adición de Mn^{2+} . Se muestra el porcentaje de expresión del epítipo de activación HUTS21 de la molécula CD29 en CP de LCR sin (LCR intacto) o tras la adición de Mn^{2+} (5 mM).

5. Niveles de expresión de la forma constitutiva y activa de CD29 en las diferentes etapas de la enfermedad: asociación con la progresión de la gammopatía monoclonal.

El estudio de la expresión en las CP malignas de la molécula CD29 en su configuración constitutiva y activa en nichos diferentes a la MO en pacientes con EEM, cerraba todo el itinerario posible de fases de una gammopatía monoclonal, que comienza con la etapa no maligna representada por las CP clonales del MGUS y finaliza en la fase más agresiva que encarna la EEM. Por lo tanto, nos dispusimos a realizar el estudio

comparativo de la expresión de esta molécula en las 5 etapas que, por orden creciente de malignidad, se corresponderían con CP de MO de pacientes con MGUS, con MM, con MM con disminución de la expresión constitutiva de CD29 sin EEM o con MM con EEM, y por último, las CP de un nicho distinto a la MO en pacientes con EEM. La **Figura 20** muestra la pérdida en ocasiones gradual, en ocasiones abrupta, tanto de la intensidad de expresión de la forma constitutiva marcada por el epítipo MAR4 (**Figura 20A**), como del porcentaje de CP expresando la forma activa marcada por el epítipo HUTS21 (**Figura 20B**). Es interesante observar, por una parte, cómo las CP malignas de la MO de los pacientes con EEM reducen los niveles de ambas formas de CD29 de manera significativa respecto a la etapa anterior de la enfermedad, ya caracterizada por una pérdida notable de esta molécula y, por otra parte, que son ya un claro precedente cuantitativo y cualitativo de lo observado con la molécula CD29 en el microambiente extramedular, fundamentalmente el líquido pleural. Estos datos convierten a la expresión de CD29 determinada por CF en las células clonales de las neoplasias de CP en un biomarcador de progresión de la enfermedad.

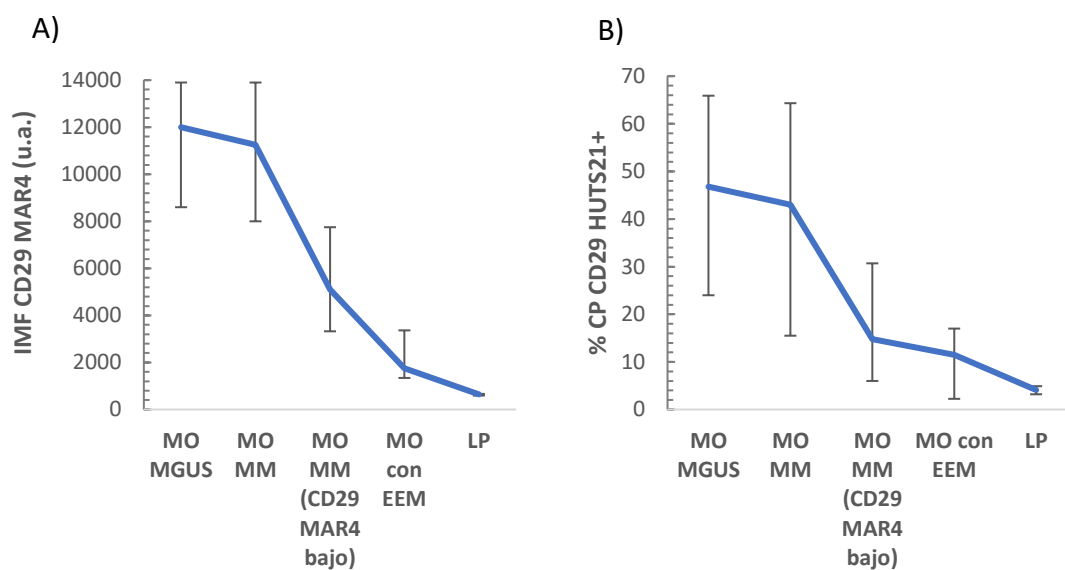


Figura 20. Pérdida progresiva de la expresión porcentual e IMF (u.a.) de CD29 en las diferentes etapas de la enfermedad. A) Pérdida de expresión en IMF (u.a.) del antígeno constitutivo CD29 MAR4 en las diferentes etapas de la enfermedad. MGUS vs MM, $p=0,03$; MM CD29 habitual vs MM con disminución de CD29, $p < 0,0001$; MM vs EEM $p=0,008$; MO de EEM vs LP, $p=0,001$. B) Pérdida de expresión porcentual del antígeno de activación CD29 HUTS21 en las diferentes etapas de la enfermedad. MGUS vs MM, $p=0,01$; MM CD29 habitual vs MM con pérdida de CD29, $p=0,01$; MM vs EEM, $p < 0,0001$; MO de EEM vs LP, $p=0,001$.

6. Niveles de expresión de la forma constitutiva y activa de CD29 y su relación con el estadiaje de la enfermedad.

La clara asociación de la expresión de CD29, en sus dos estados, con las diferentes fases de la progresión de la enfermedad sugería una posible asociación del modo de expresión de esta molécula con los diferentes estadios de la enfermedad según el Sistema de Estadificación Internacional, ISS, que divide a la enfermedad en 3 estadios. No se advirtieron diferencias significativas en el porcentaje o en la IMF de CD29 MAR4 entre los estadios I y II (datos no mostrados). Por el contrario, y como puede advertirse en la **Tabla 3**, las diferencias sí que fueron significativas entre los estadios II y III. Por un lado, la IMF de CD29 MAR4 se redujo claramente en las CP de pacientes en el estadio más avanzado. Sin embargo, resulta mucho más relevante la significación observada al comparar el porcentaje de CP expresando CD29 MAR4 en su membrana. Como ya se ha comentado, CD29 es una proteína muy ubicua en las CP, de manera que el 98%-100% de las CP de la gran mayoría de los pacientes expresan el epítipo constitutivo en su membrana. Sin embargo, en el rango intercuartil del estadio III se observa que el escaso número de pacientes que expresan CD29 MAR4 en un porcentaje inferior al 90% de sus CP se acumuló en el estadio de máximo riesgo de la enfermedad.

Tabla 3. Estadios ISS en MM y expresión de CD29			
	ISS II n= 17	ISS III n= 11	<i>p</i>
% CD29 MAR4	99,8% (96,3% - 100%)	96,9% (78,5% - 98,8%)	0,0420
IMF CD29 MAR4	9.700 u.a. (6.900 u.a. – 14.600 u.a.)	5.400 u.a. (5.000 u.a. – 8.000 u.a.)	0,0198

Tabla 3. Diferencias de expresión de CD29 MAR4 de pacientes de MM en los estadios II y III de la ISS. n=28. Los porcentajes se expresaron como mediana y como rango intercuartílico (entre paréntesis). Las IMF se expresaron en u.a. (unidades arbitrarias).

7. Expresión de FAK en CP clonales de MO

Nuestra aproximación experimental para el estudio de la expresión de la forma activa de CD29 ha consistido, por una parte, en la detección del epítipo HUTS21 por CF, y por el otro en su regulación *in vitro* mediada por cationes, es decir, una vía de señalización *outside-in* (de afuera adentro). Es bien sabido que la activación de CD29

puede realizarse a su vez a través de otro tipo de señalización denominada *inside-out* (adentro / hacia afuera), que consiste en la interacción de un dominio de la proteína citoplásmica talina con el dominio intracitoplásmico de CD29 para inducir el cambio conformacional de la integrina hasta lograr que adquiriera su estado activado de alta afinidad por el ligando. El dominio de la talina que interacciona con CD29 es el mismo dominio que interacciona con la quinasa de adhesión focal (FAK), cuyo estado fosforilado es un paso previo necesario para la activación de CD29. Por este motivo, utilizamos un procedimiento previamente descrito para la detección de FAK, sobre todo en líneas celulares, que modificamos hasta conseguir que la señal obtenida con el marcaje con un AcMo anti-FAK fosforilado fuera suficiente para estudiar sus niveles en las CP.

En primer lugar y tras la fijación celular, optimizamos la permeabilización de las células con una concentración de metanol al 80% que mantuvo, por un lado, la antigenicidad de marcadores clave para la detección de las CP por CF (CD38 y CD138; también CD45) (**Figura 21A**) y, por el otro, la expresión de la forma constitutiva de CD29 (**Figura 21B**), lo que nos permitió asociar la expresión de FAK fosforilada a la mayor o menor intensidad de la integrina. El método no respetó la integridad del epítipo HUTS21 ni de proteínas como CD19. Los resultados son aún preliminares debido a la baja o muy baja intensidad de FAK fosforilada que puede determinarse en las células. Mediante un corte arbitrario sobre la intensidad de expresión de CD29 MAR4, las CP se dividieron en dos subpoblaciones, y sobre ambas se determinó el nivel de expresión de FAK fosforilada. Como puede observarse en el ejemplo representativo de la **Figura 21B**, la subpoblación de CP que mostró una mayor intensidad de CD29 MAR4 expresó FAK fosforilada en mayor cuantía que las CP con menor intensidad de la integrina ($789 \text{ u.a.} \pm 289 \text{ u.a. versus } 678 \pm 234$, respectivamente; $p= 0,03$; $n=6$). En ocasiones y como muestra el ejemplo representativo de la **Figura 21C**, la expresión bimodal del antígeno CD56 en las CP clonales nos permitió comprobar la distinta expresión de FAK fosforilada en la población CD56+ high respecto a la población CD56+ low.

Estos resultados sugieren que es posible detectar la FAK fosforilada en CP como un método que informe de la posible contribución de la vía *inside-out* en la activación de la integrina CD29.

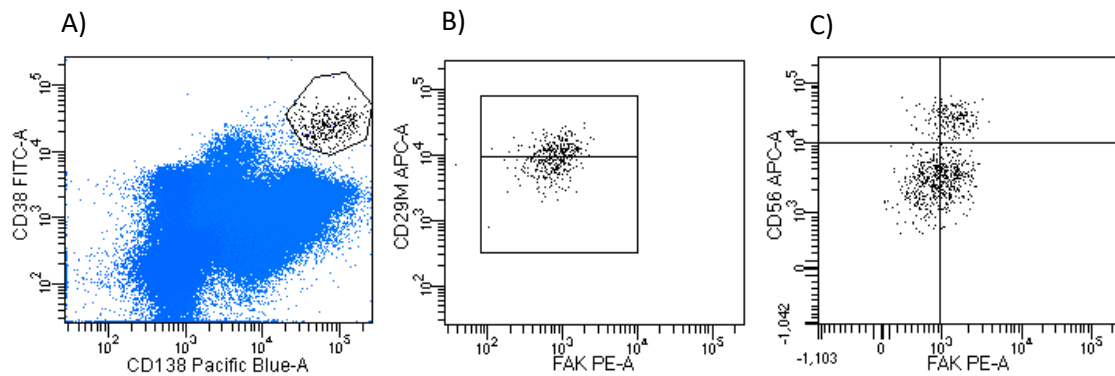


Figura 21. Patrón de expresión de FAK en CP de MO atendiendo a los niveles de expresión de CD29.
A) Expresión de FAK en CP tras permeabilización con metanol tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A)** Las CP fueron detectadas por CF dada su alta expresión de los antígenos CD38 y CD138. **B)** Expresión de FAK en relación al nivel de expresión de CD29 MAR4. **C)** Expresión de FAK según el nivel de expresión de CD56 en las CP de un paciente con MM con expresión bimodal de CD56.

8. Efectos compensatorios en los niveles de expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 7$ en las CP clonales: perfil antigénico y funcionalidad.

La baja expresión de la forma constitutiva y activada de la cadena $\beta 1$ (CD29) se asocia con dos niveles diferenciados de expresión de la cadena $\alpha 4$ (CD49d)

Tal y como hemos descrito en un apartado anterior de resultados, los pacientes con MM pueden dividirse en dos grupos atendiendo a la expresión baja o intermedia en las CP de la forma constitutiva de la cadena $\beta 1$ (CD29), y que esta expresión baja o intermedia correlacionaba con la expresión de la forma activa de CD29 determinada con el AcMo anti-CD29 clon HUTS21. Habida cuenta que suele considerarse que la cadena $\alpha 4$ (CD49d) es la principal cadena que se une a la cadena $\beta 1$ en las CP, supusimos que los niveles de CD49d se corresponderían, aproximadamente, con los niveles de la cadena $\beta 1$. De hecho, al analizar la expresión conjunta de estas dos moléculas, encontramos una relación directamente proporcional en la expresión de ambas, independientemente de que analizáramos la expresión de CD29 MAR4 tomando como punto de partida los dos grupos de pacientes con MM divididos según la expresión baja o intermedia de CD49d, o utilizando la estrategia contraria (**Tabla 4**).

Tabla 4. Comparación de la expresión de CD49d/CD29 MAR4 en CP clonales de MM				
CD49d		CD29 MAR4 IMF < 8.000 u.a. n = 27	CD29 MAR4 IMF 8000 u.a. - 20.000 u.a. n = 35	<i>p</i>
	Porcentaje	98% (88% - 100%)	100% (99,8% - 100%)	0,0027
	IMF (u.a.)	6.100 (4600 - 12.500)	19.800 (15.700 - 30.000)	0,0002
CD29 MAR4		CD49d IMF < 10.000 u.a. n = 26	CD49d IMF 10.000 u.a. - 20.000 u.a. n = 28	<i>p</i>
	Porcentaje	91,8% (75% - 99,5%)	100% (99%- 100%)	0,0002
	IMF (u.a.)	5.100 (3.400 - 6.300)	16.500 (9.200 - 21.000)	0,0000

Tabla 4. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de CD49d y CD29 MAR4 en CP clonales de MM. Expresión porcentual e IMF de la molécula CD49d al comparar por grupos en función de la intensidad de fluorescencia de CD29MAR4 (intensidades bajas y medias). Expresión porcentual e IMF de la molécula CD29MAR4 al comparar por grupos en función de la intensidad de fluorescencia de CD49d (intensidades bajas y medias). Los porcentajes se expresaron como mediana y como rango intercuartílico (entre paréntesis). Las IMF se expresaron en u.a. (unidades arbitrarias).

Ejemplos representativos de las dos situaciones descritas (intensidad intermedia de CD29 se corresponde con intensidad intermedia de CD49d e intensidad baja de CD29 se corresponde con intensidad baja de CD49d) se muestran en la **Figura 22A y B**, respectivamente.

Los resultados obtenidos parecían establecer una correlación perfecta en las CP clonales de MO entre el nivel de expresión de la cadena $\beta 1$ común (CD29) y la cadena $\alpha 4$ (CD49d). Sin embargo, observamos que existía una gran heterogeneidad en los niveles de expresión de CD49d en el grupo denominado CP CD29 MAR4 de intensidad baja, estableciéndose dos grupos: 1) en la mayoría de los casos la previsible baja expresión de CD49d acompañaba a la baja expresión de CD29 MAR4; 2) en una fracción minoritaria pero significativa de casos, CD49d se expresó con intensidad intermedia a pesar de que CD29 MAR4 se expresaba con baja intensidad. Un ejemplo representativo de este grupo de pacientes se muestra en la **Figura 22C**. Este hallazgo sugería que en este grupo de pacientes con gammopatías monoclonales, la cadena $\alpha 4$ (CD49d) podría asociarse con otra cadena β .

Previamente a la búsqueda de otra cadena β que pudiera unirse a CD49d y dada la relación existente entre el nivel de expresión de la forma constitutiva de CD29 y la presencia clara o indetectable de su forma activa, nos dispusimos a identificar si este fenómeno se replicaba al analizarlo con la molécula CD29 HUTS21. Como puede

comprobarse en la **Tabla 5**, encontramos una relación directamente proporcional entre los niveles de expresión de la forma activa de CD29 y los de CD49d.

En las **Figura 23A y B** se muestran dos ejemplos representativos de la proporcionalidad en la expresión de ambas moléculas. Sin embargo, volvimos a encontrar un grupo minoritario pero significativo de casos en los que las CP con un CD29 HUTS21 de baja intensidad expresaban CD49d con intensidad intermedia (**Figura 23C**), reforzando la idea de que CD49d pueda unirse a otro tipo de cadena β diferente a la $\beta 1$.

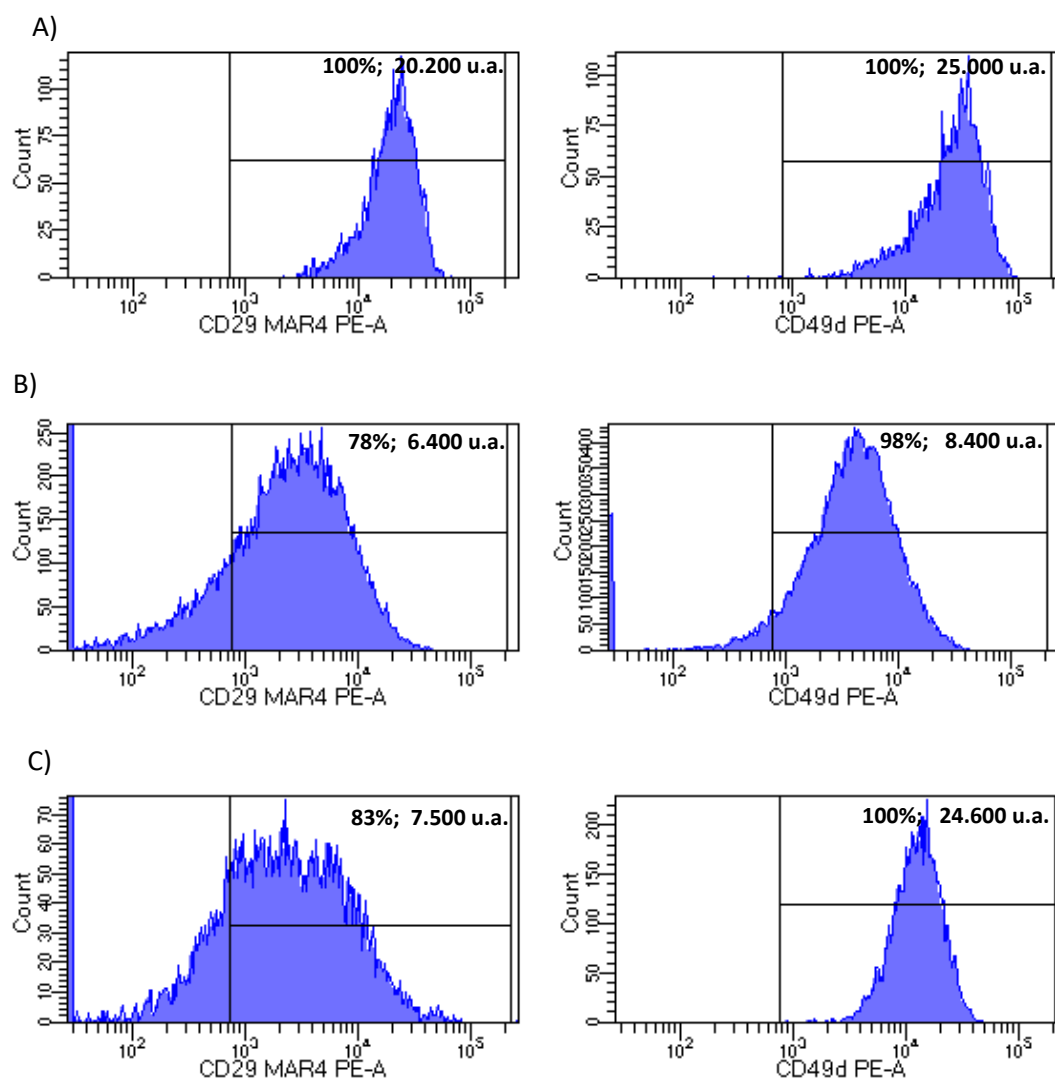


Figura 22. Diferentes patrones de expresión de la cadena $\beta 1$ (CD29) y la cadena $\alpha 4$ (CD49d) en las CP de pacientes con MM. A) Ejemplo representativo de CP de MM con niveles similares e intermedios de CD29 MAR4 y CD49d. B) Ejemplo representativo de CP de MM con niveles similares y bajos tanto de CD29 MAR4 como de CD49d. C) Ejemplo representativo de CP de MM con expresión disminuida de CD29 MAR4 y expresión intermedia a intermedia-alta de CD49d. En el interior de cada histograma se muestran el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD29 MAR4 y CD49d.

Tabla 5. Comparación de la expresión de CD49d/CD29 HUTS21 en CP clonales de MM				
CD49d		CD29 HUTS21 IMF <2.000 u.a. n = 37	HUTS21 IMF > 2.000 u.a. n = 33	<i>p</i>
	Porcentaje	99,1% (97,4% - 99,1%)	100% (99,6% - 100%)	0,001
	IMF (u.a.)	10.100 (5500 - 13300)	16.800 (9.500 - 26.600)	0,0002
CD29 HUTS21		CD49d IMF < 10.000 u.a. n = 26	CD49d IMF 10.000 u.a. - 20000 u.a. n = 28	<i>p</i>
	Porcentaje	16% (5% - 32,9%)	61% (32,3% - 66,5%)	0,0093
	IMF (u.a.)	1.200 (870 - 1.600)	1.700 (1.300 - 2.000)	0,04

Tabla 5. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de CD49d y CD29 HUTS21 en CP clonales de MM. Expresión porcentual e IMF de la molécula CD49d al comparar por grupos en función de la intensidad de fluorescencia de CD29 HUTS21 (intensidades bajas y medias). Expresión porcentual e IMF de la molécula CD29 HUTS21 al comparar por grupos en función de la intensidad de fluorescencia de CD49d (intensidades bajas y medias). Los porcentajes se expresaron como mediana y como rango intercuartílico (entre paréntesis). Las IMF se expresaron en u.a. (unidades arbitrarias).

La baja expresión de la forma constitutiva y activada de la cadena $\beta 1$ (CD29) es compensada en la mayoría de los casos con un incremento en la expresión de la cadena $\beta 7$.

La $\beta 7$ es una de las cadenas β presentes en la membrana de las CP, tanto normales como tumorales. Aunque en las CP una de las cadenas α acompañantes de $\beta 7$ es la cadena αE (CD103), parece que la cadena α principal que se une a $\beta 7$ es la cadena $\alpha 4$ (CD49d).

Sin embargo, hasta el momento no está descrito si las CP muestran un equilibrio en la expresión de $\beta 1$ (CD29) y $\beta 7$ y, en concreto, no se sabe si la expresión de $\beta 7$ equilibra la pérdida de la cadena $\beta 1$ en el grupo de pacientes en que esta cadena está manifiestamente disminuida, ni tampoco si la presencia de $\beta 7$ modifica la regulación de la activación o la funcionalidad de $\beta 1$.

Para contestar a estas cuestiones, comenzamos por realizar un estudio comparativo de los niveles de expresión de las moléculas $\beta 7$ y CD49d en el grupo de pacientes con MM en el que la intensidad de expresión de CD29 constitutivo estaba disminuida. En la **Tabla 6** se establece de forma evidente que la población de CP clonales con intensidad intermedia de CD49d se asociaba a casos de expresión máxima de la cadena $\beta 7$ (tanto en términos porcentuales como en IMF). Dado que CD49d como cadena α solo puede unirse a las cadenas $\beta 1$ y $\beta 7$, resulta evidente que un grupo significativo de pacientes con gammapatías monoclonales que expresan bajos niveles de $\beta 1$ en sus formas

constitutiva y activa logran alcanzar niveles intermedios en la expresión de CD49d por su unión a la cadena $\beta 7$.

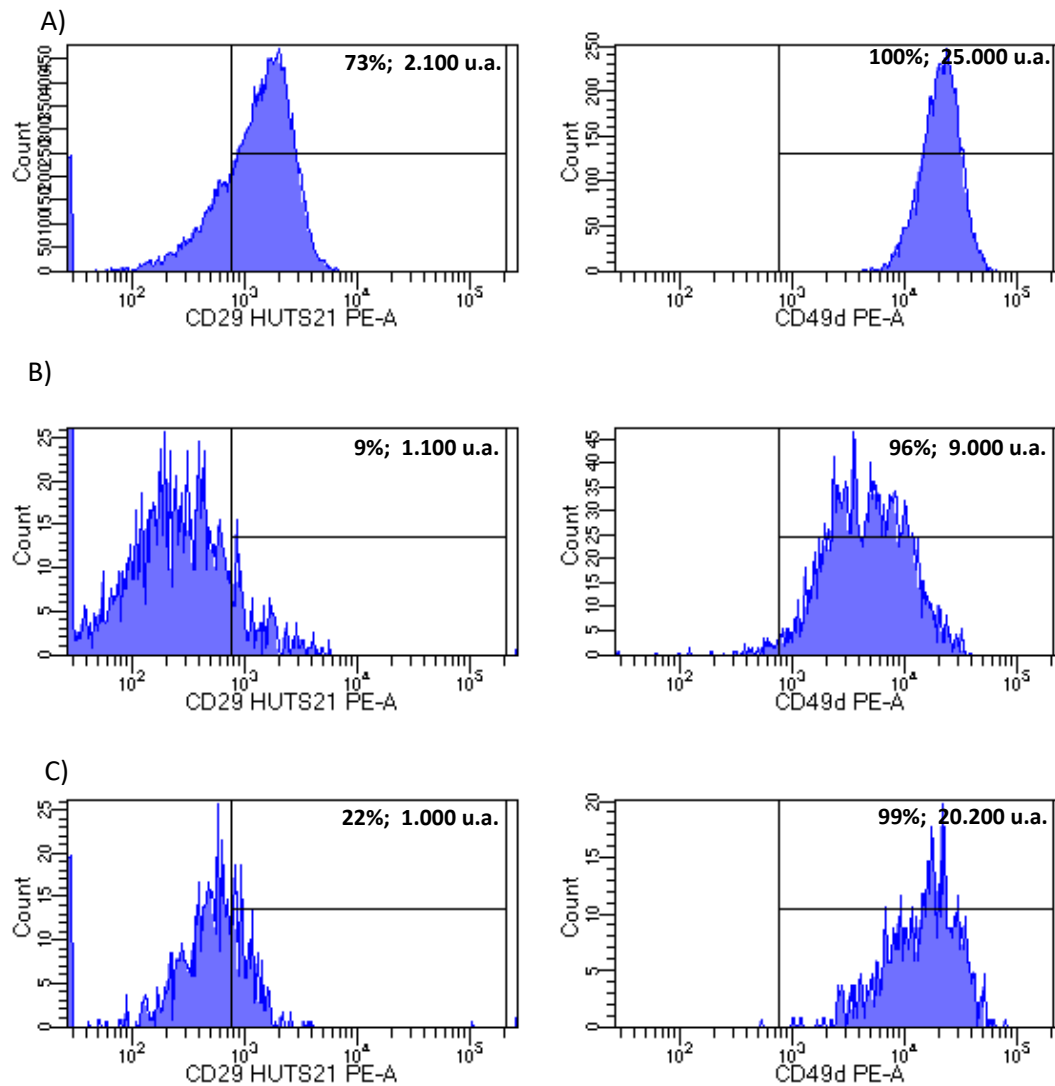


Figura 23. Diferentes patrones de expresión de la cadena $\beta 1$ activada (CD29 HUTS21) y la cadena $\alpha 4$ (CD49d). A) Ejemplo representativo de CP de MO de un paciente con MM con expresión significativa de la forma activada de CD29 y expresión intermedia a intermedia-alta de CD49d. B) Ejemplo representativo de CP de MO de un paciente con MM con baja expresión de la forma activa de CD29 y expresión baja de CD49d. C) Ejemplo representativo de CP de MO de un paciente con MM con baja expresión de la forma activa de CD29 y expresión intermedia a intermedia-alta de CD49d. En el interior de cada histograma se muestran el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD29 HUTS21 y CD49d.

Estos resultados indican que existen diferentes patrones de combinación de CD29 (tanto en su forma constitutiva como activa), CD49d y $\beta 7$ integrina. Los diferentes modelos que se generan atendiendo a la diferente expresión de estas tres moléculas son mostrados en las **Figura 24 A-C**, donde queda patente la heterogeneidad de su expresión.

Tabla 6. Comparación de la expresión de $\beta 7$ /CD49d en CP clonales de MM				
$\beta 7$		CD49d IMF < 10.000 u.a. n = 26	CD49d IMF 10.000 u.a. – 20.000 u.a. n = 28	p
	Porcentaje	43,8% (26,6% - 80,7%)	94,1% (64% - 99,2%)	0,0007
	IMF (u.a.)	2.850 (1.700 - 4.800)	5.300 (3.400 - 11.900)	0,0016
CD49d		$\beta 7$ IMF <8.000 u.a. n = 51	$\beta 7$ IMF 8.000 u.a. – 20.000 u.a. n = 15	p
	Porcentaje	99,6% (98% - 100%)	100% (99,4% - 100%)	0,05
	IMF (u.a.)	9.500 (5.800 - 16.00)	15.500 (13.800 - 23.400)	0,013

Tabla 6. Porcentaje de expresión e IMF (u.a.) de las moléculas $\beta 7$ integrina y CD49d en CP clonales de pacientes con MM. Comparaciones recíprocas entre las moléculas $\beta 7$ integrina y CD49d en función de las intensidades de fluorescencia (intensidades bajas e intermedias). Los porcentajes se expresaron como media y como rango (entre paréntesis). Las IMF se expresaron en u.a. (unidades arbitrarias).

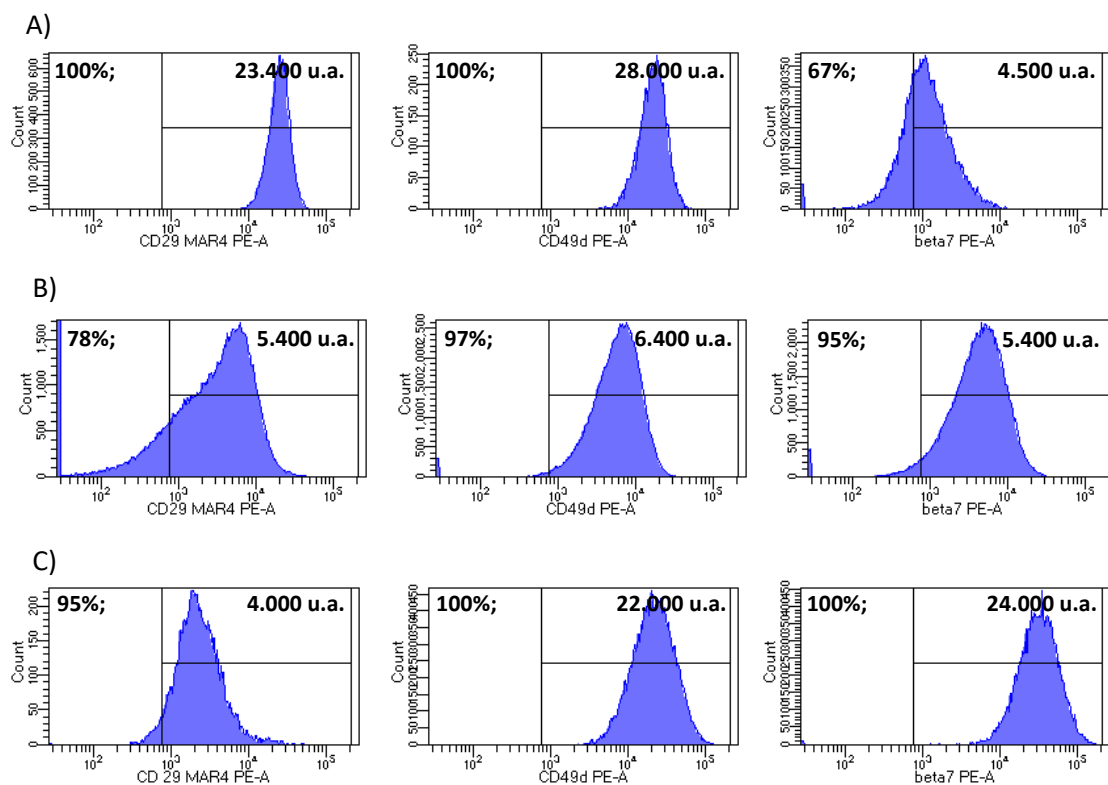


Figura 24. Diferentes patrones de expresión en las CP de MO de pacientes con MM de las moléculas CD29 MAR4 ($\beta 1$), CD49d y $\beta 7$. A) Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión intermedia de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y CD49d, y baja expresión de $\beta 7$. B) Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión baja de las tres moléculas, CD29 MAR4 ($\beta 1$), CD49d, y $\beta 7$. C) Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión baja de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y con intensidad intermedia tanto de CD49d como de $\beta 7$. En el interior de cada histograma se muestran el porcentaje y la IMF (u.a.) de expresión de las tres moléculas.

Posteriormente, quisimos comprobar si esta combinación de presentaciones entre CD49d y $\beta 7$ se reproducía al considerar el nivel de expresión de la forma activa de CD29 como punto de partida. De igual manera a lo descrito con los pacientes que expresaban la forma constitutiva de CD29 con intensidad intermedia, encontramos que las CP de MO que expresaban CD29 HUTS21 con intensidad intermedia expresaban también CD49d con intensidad intermedia y $\beta 7$ con intensidad baja (**Figura 25A**). De hecho, una proporción significativa de los pacientes encuadrados en este grupo mostraban una fracción de sus CP con niveles indetectables de $\beta 7$. En contraste, la expresión baja de CD29 HUTS21 dividió a las CP en dos subgrupos (de una manera similar a lo descrito con la expresión baja de CD29 MAR4): CP con intensidad baja de CD49d e intensidad baja de $\beta 7$ (**Figura 25B**); y CP con CD49d de intensidad intermedia y $\beta 7$ también de intensidad intermedia (**Figura 25C**).

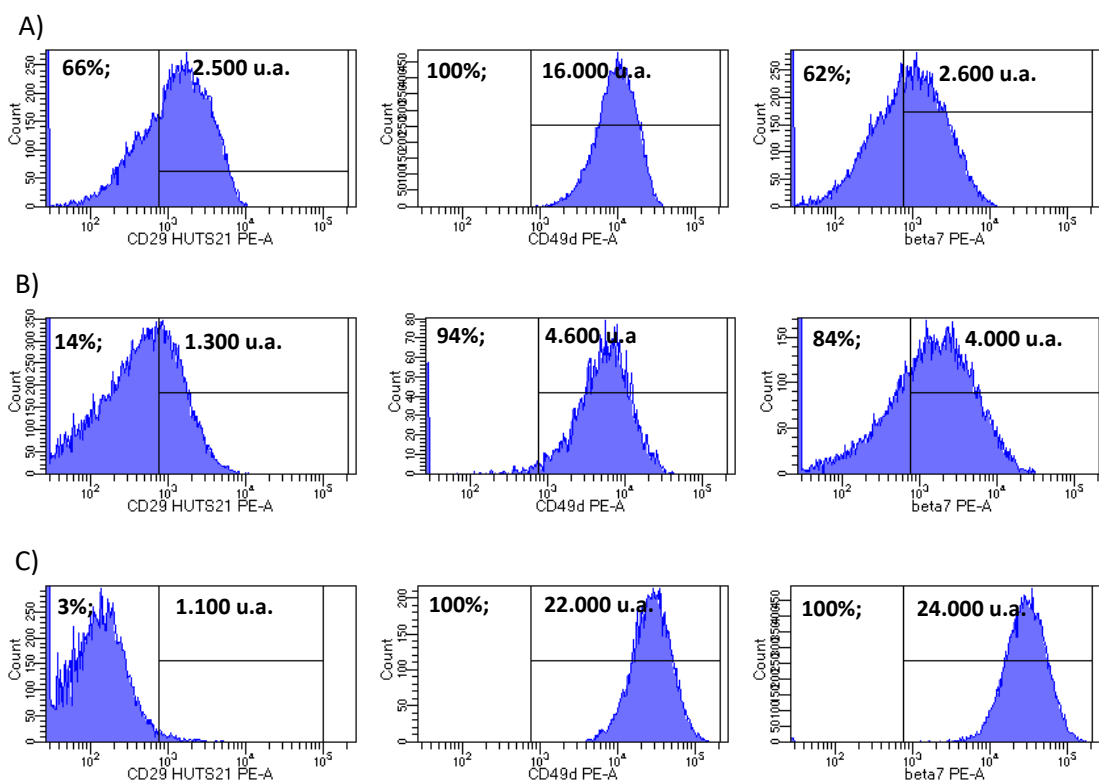


Figura 25. Diferentes patrones de expresión en las CP de MO de pacientes con MM de las moléculas CD29 HUTS21 (forma activa la cadena $\beta 1$), CD49d y $\beta 7$. **A)** Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión intermedia de CD29 HUTS21 y CD49d, y baja expresión de $\beta 7$. **B)** Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión baja de las tres moléculas, CD29 HUTS21, CD49d, y $\beta 7$. **C)** Ejemplo representativo de CP de un paciente con expresión baja de CD29 HUTS21 y con intensidad intermedia tanto de CD49d como de $\beta 7$. En el interior de cada histograma se muestran el porcentaje y la IMF (u.a.) de expresión de las tres moléculas.

En conjunto, estos resultados sugieren un efecto compensatorio entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 7$, en ambos casos orientadas a mantener los niveles de expresión intermedios de CD49d. Con el objetivo de visualizar al máximo estos hallazgos, analizamos las CP de MO con CD29 MAR4 de intensidad baja (definidas como aquellas CP que mostraban una IMF <8.000 u.a.), y las subdividimos en 2 poblaciones: una con CD49d de baja intensidad y otra con CD49d de intensidad intermedia, y al compararlas encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la $\beta 7$ integrina tanto en porcentaje como en IMF como muestra la **Figura 26**.

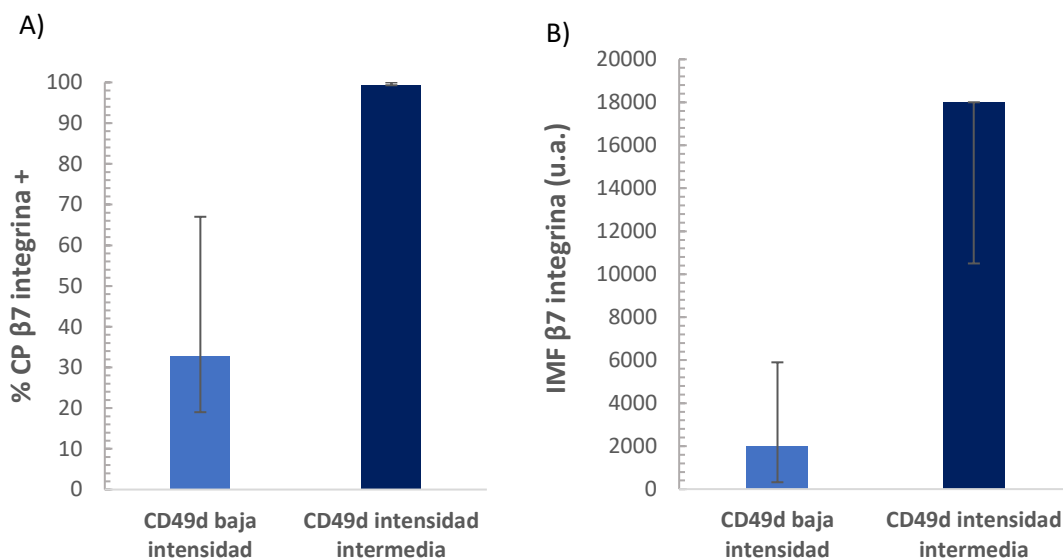


Figura 26. Efecto compensatorio en la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con expresión baja de CD29 MAR4 y con expresión variable de CD49d. **A)** Porcentaje de expresión de la cadena $\beta 7$ en CP con intensidad baja ($n=22$) o intermedia ($n=10$) de CD49d ($p= 0,02$). **B)** IMF (u.a.) de la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP con intensidad baja o intermedia de CD49d ($p= 0,01$). Se representan medianas y rangos intercuartílicos.

De modo similar, al seleccionar la población de CP de MO con CD29 HUTS21 <30% y subdividirla en función de la expresión de CD49d de intensidad baja (<10.000 u.a.) e intensidad intermedia (10.000-20.000 u.a.) encontramos diferencias estadísticamente significativas tanto en porcentaje como en IMF de la $\beta 7$ como muestra la **Figura 27**.

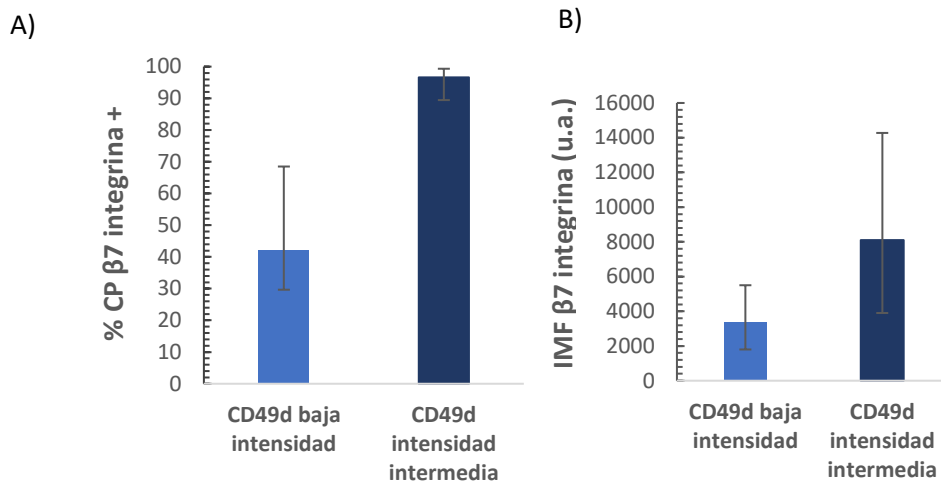


Figura 27. Efecto compensatorio en la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con expresión baja de CD29 HUTS21 ($\leq 30\%$ de CP HUTS21+) y con expresión variable de CD49d. A). Porcentaje de expresión de la cadena $\beta 7$ en CP con intensidad baja ($n=11$) o intermedia ($n=14$) de CD49d ($p= 0,003$). B) IMF (u.a.) de la expresión de la cadena $\beta 7$ en CP con intensidad baja o intermedia de CD49d ($p= 0,01$). Se representan medianas y rangos intercuartílicos.

Por último, utilizamos una aproximación para demostrar el efecto compensador directo de $\beta 1$ y $\beta 7$: al analizar la expresión de la $\beta 7$ integrina en función de la expresión del CD29 MAR4 en la población de CP con intensidad intermedia de CD49d, encontramos una relación inversamente proporcional en la expresión de CD29 y $\beta 7$ integrina (**Figura 28**), es decir, niveles disminuidos de CD29 MAR4 se contrarrestaban con niveles aumentados de $\beta 7$ integrina, demostrando así el efecto compensador a la pérdida de una de las cadenas β .

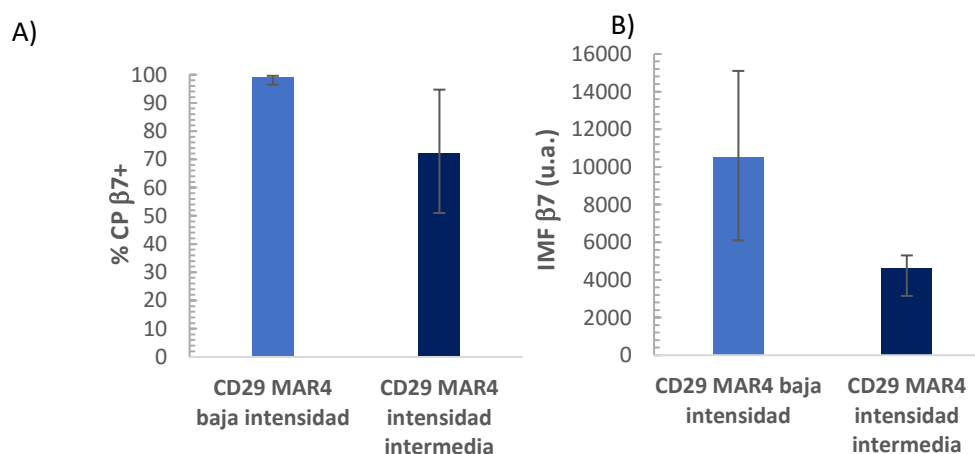


Figura 28. Efecto compensatorio recíproco de la expresión de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y de la cadena $\beta 7$ en CP malignas de pacientes con MM. A). Porcentaje de expresión de $\beta 7$ en CP con intensidad baja ($n=11$) o intermedia ($n=11$) de CD29 MAR4 ($p=0,01$). B) IMF (u.a.) de la expresión de $\beta 7$ en CP con intensidad baja o intermedia de CD29 MAR4 ($p=0,03$). Se representan medianas y rangos intercuartílicos.

Efecto de la expresión balanceada de $\beta 1$ (CD29) y $\beta 7$ en las capacidades funcionales de ambas moléculas.

Una vez determinados los diferentes patrones de expresión de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 7$ en las CP tumorales de MO, los resultados nos instaron a evaluar si el aumento de expresión de la cadena $\beta 7$ en las CP que equilibra la expresión baja de $\beta 1$, conseguía recuperar la competencia de la cadena $\beta 1$ para alcanzar su conformación de alta afinidad tras la adición *in vitro* de Mn^{2+} , el catión divalente más potente para activar la $\beta 1$ integrina. Como se ha descrito en Materiales y Métodos y en otro apartado de experimentos, se eliminó previamente el plasma autólogo del aspirado de MO de 4 pacientes, 2 pacientes con expresión normal de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ y 2 pacientes con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$. La **Figura 29** muestra un ejemplo representativo de un tipo celular y otro: las CP de MO de pacientes con expresión normal de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ respondían de forma óptima y dependiente de las dosis de Mn^{2+} (hasta el 93% de las CP llegaron a expresar la conformación activa de CD29), alcanzando el *plateau* de activación máxima de CD29 a concentraciones de Mn^{2+} que oscilaba entre 0,2 y 0,5 mM. Sin embargo, los pacientes con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$, aunque no fueron refractarios a la adición del catión, no lograron niveles óptimos de activación (la expresión del epítipo de activación HUTS21 no logró superar la barrera del 50% de CP CD29 HUTS21+) y, a su vez, su máximo de activación necesitó de concentraciones superiores del catión (1 mM). Por lo tanto, la presencia de niveles intermedios de $\beta 7$ no logró normalizar la respuesta subóptima a la activación mediada por cationes de las CP caracterizadas por la expresión disminuida de CD29. Esta falta de respuesta óptima a Mn^{2+} en el ensayo *in vitro* tuvo su correspondencia en la baja expresión *ex vivo* del epítipo de activación HUTS21 en las CP de este grupo de pacientes.

El anclaje de las CP a la fibronectina (FN) de la matriz extracelular de la MO se establece fundamentalmente a través de la integrina CD49d/CD29, y en menor medida a través de otras cadenas α que se unen a CD29 o a través de CD49d/ $\beta 7$. Por este motivo, quisimos determinar de nuevo si las dos poblaciones antes descritas de CP clonales (población con expresión intermedia de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ y población con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$) mostraban diferencias en la adhesión a FN.

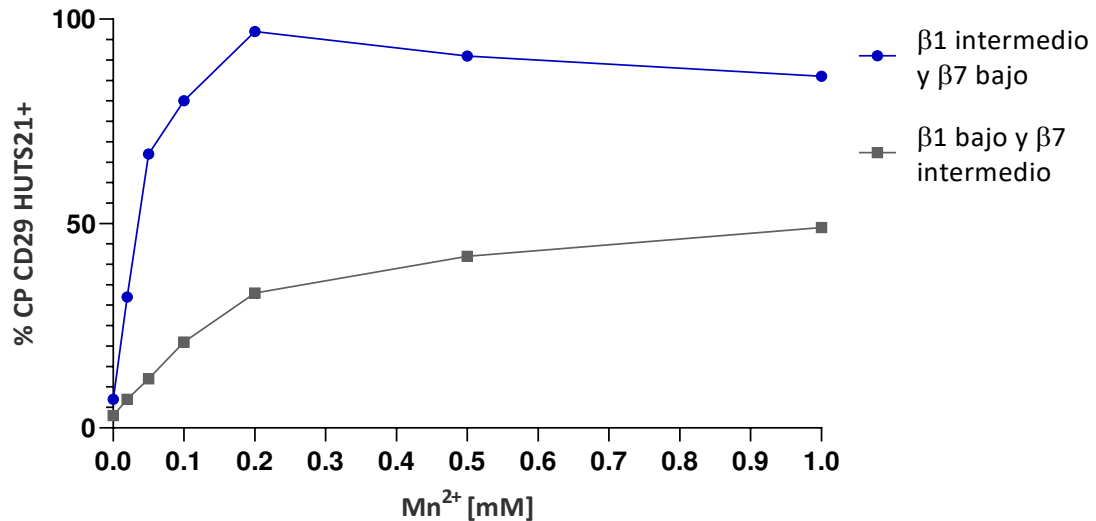


Figura 29. Porcentaje de activación de CD29 (células CD29 HUTS21+) tras la adición de Mn^{2+} en CP expresando diferentes niveles de CD29 MAR4 ($\beta 1$) y $\beta 7$. Efecto de concentraciones crecientes (0,02 mM – 1 mM) del catión divalente Mn^{2+} en la expresión de la forma activa de CD29 en CP de MO con expresión normal de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ y en CP con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$.

Aunque se acaba de documentar que el segundo grupo de CP exhibe una activación subóptima de la $\beta 1$ integrina tras el estímulo con Mn^{2+} , la expresión notable de CD49d/ $\beta 7$ podría neutralizar el déficit que supone una expresión baja de CD29 respecto a la unión a FN. Se realizaron ensayos de adhesión con CP purificadas de MO de ambos tipos de población (**Figura 30**), destacando de inmediato que la capacidad de unión a FN de las CP con CD29 normal y $\beta 7$ bajo era claramente superior a la exhibida por las CP con fenotipo CD29 bajo $\beta 7$ intermedio. De este dato se deduce que, aunque $\beta 7$ aporta opciones de unión a FN en las CP con $\beta 7$ intermedio, no es capaz de igualar el vigor con que se unen a la FN las CP con expresión normal de CD29. A su vez, los resultados indican que aunque los AcMo bloqueantes anti- $\beta 7$ inhibían, en términos relativos, un porcentaje mayor de unión a FN en la población $\beta 7$ intermedia que en la población $\beta 7$ baja, la unión a FN en la población con $\beta 7$ intermedia / CD29 baja era más dependiente de CD29 que de $\beta 7$, ya que el anticuerpo bloqueante anti CD29 (clon 4B4) inhibió más fuertemente la unión a FN que el anticuerpo bloqueante anti- $\beta 7$ (clon FIB504).

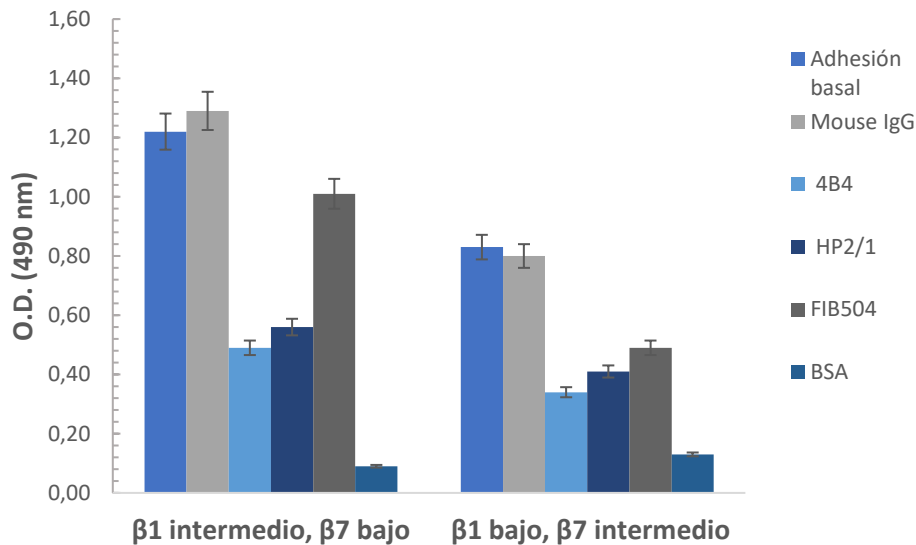


Figura 30. Ensayo de adhesión a FN de CP de MO con expresión intermedia de CD29 constitutivo y baja expresión de $\beta 7$ y de CP con baja expresión de CD29 constitutivo y expresión intermedia de $\beta 7$. CP purificadas se añadieron a pocillos previamente revestidos con FN en presencia de 0,5 mM de Mn^{2+} . Las CP no fueron pre-incubadas con AcMo (adhesión basal), o fueron pre-incubadas con un AcMo irrelevante (mouse IgG), o con anticuerpos bloqueantes anti-CD29 (4B4), anti-CD49d (HP2/1) o anti- $\beta 7$ (FIB504). La unión de las CP a la proteína BSA se utilizó como control de unión inespecífica. O.D.: unidades de densidad óptica.

9. Expresión variable de la tetraspanina CD9 en las CP normales y en las CP clonales de pacientes con MGUS y MM

Existe un gran cuerpo de trabajo experimental que ha demostrado la asociación de tetraspaninas con la $\beta 1$ integrina en microdominios de la membrana, ejerciendo efectos reguladores sobre la adhesión celular. Por este motivo, nuestro siguiente objetivo fue estudiar no solo la mera expresión de las tetraspaninas en las CP, sino también su capacidad funcional en relación a los hallazgos que hemos mostrado respecto a las formas constitutiva y activada de la $\beta 1$ integrina. Y nos centramos inicialmente en el estudio de la tetraspanina CD9 ya que algunos trabajos relacionan la expresión de esta molécula con la susceptibilidad o resistencia de células de MM a diferentes tratamientos.

Tanto las CP normales como las CP clonales de pacientes con MGUS o con MM expresaron CD9 con una enorme variabilidad, pues en los tres grupos podían encontrarse ejemplos en los que la mayoría, una fracción o una minoría de las CP expresaban esta molécula (**Figura 31**). Como una consecuencia lógica de esta variabilidad, tanto los porcentajes como las intensidades de fluorescencia de CD9 no difirieron significativamente en los tres grupos estudiados (**Figura 32**).

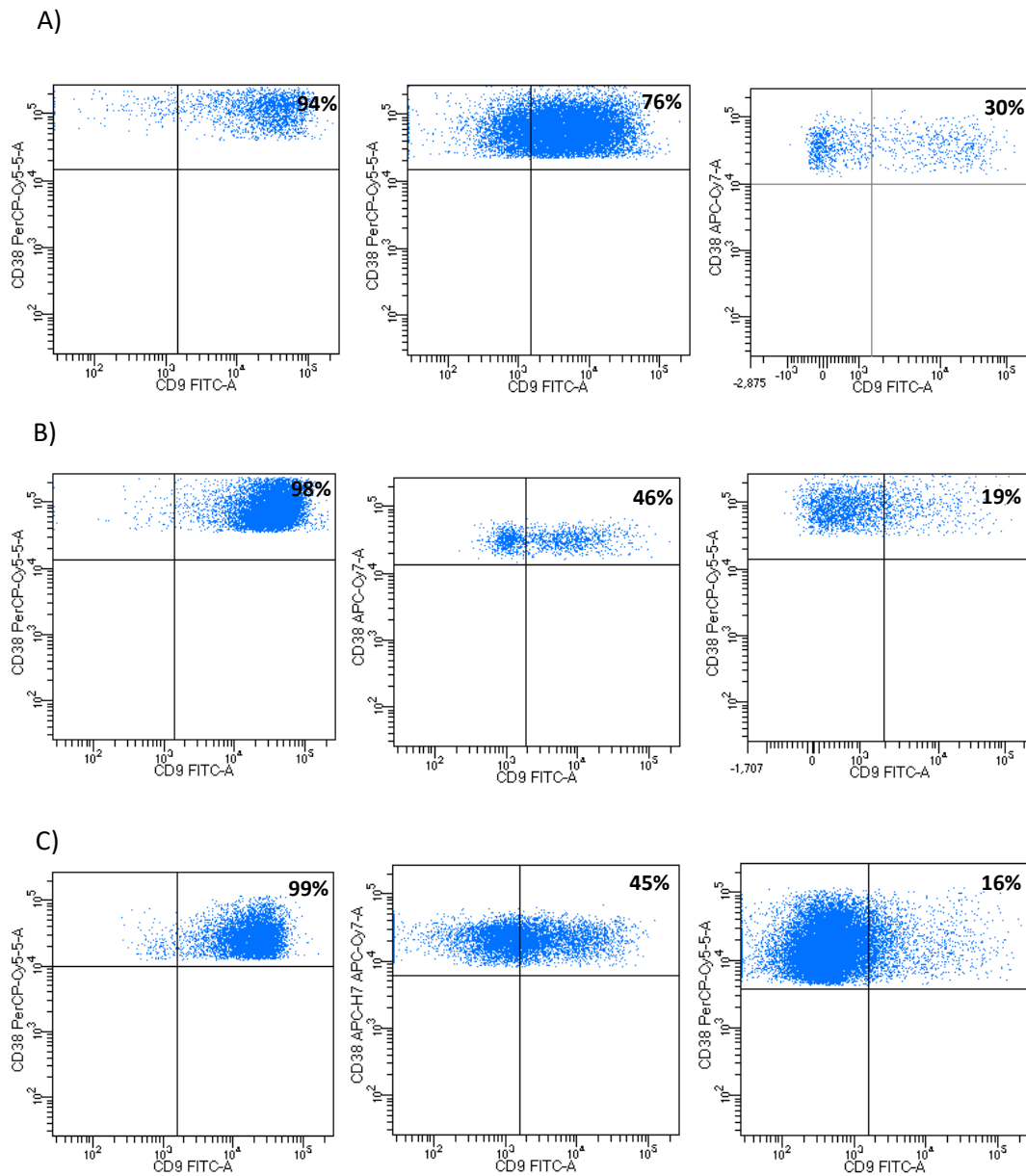


Figura 31. Patrones de expresión de la forma constitutiva de la molécula CD9 en CP de MO. A) Expresión de CD9 (constitutivo) en CP de individuos sanos; B) Expresión de CD9 (constitutivo) en CP de pacientes con MGUS; C) Expresión de CD9 (constitutivo) en CP de pacientes con MM. En el interior de cada dot-plot se indica el porcentaje de expresión de CD9.

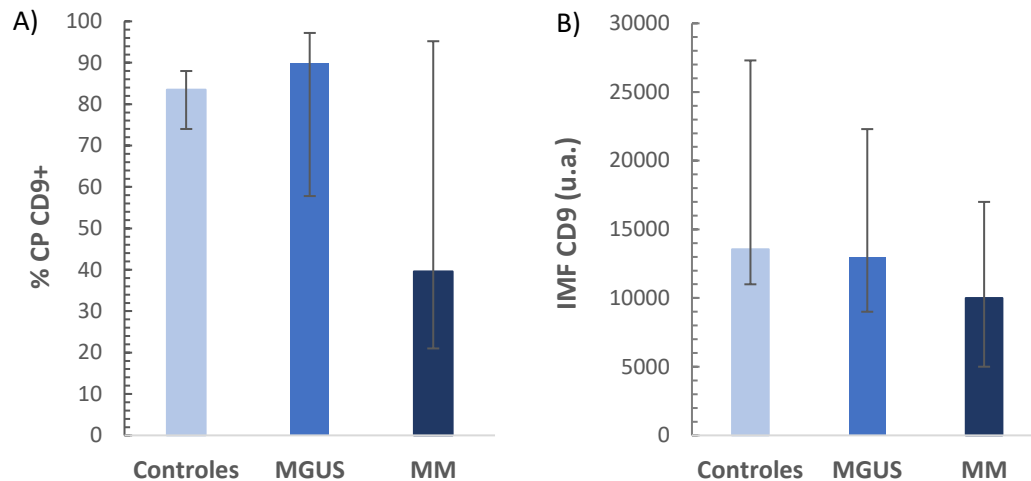


Figura 32. Expresión de la forma constitutiva del antígeno CD9 en CP de individuos sanos y de pacientes con gammopatías monoclonales. A). Porcentaje de expresión de CD9 constitutivo en individuos sanos (controles), en pacientes con MGUS y en pacientes con MM. B) IMF (u.a.) de la forma constitutiva de CD9 en CP de individuos sanos (controles) y en pacientes con MGUS o con MM. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de CP positivas para CD9 constitutivo entre pacientes con MGUS y MM ($p=0,04$). Controles: $n=14$; MGUS: $n=18$, MM: $n=74$.

10. Relación entre la expresión de CD9 constitutivo y la expresión de $\beta 1$ (CD29) en CP de MO

Dada la asociación funcional de CD9 y la integrina $\beta 1$ (CD29) descrita en numerosos tipos celulares, quisimos investigar si ambas moléculas podían encontrarse vinculadas en las CP de MO. La primera aproximación a esta pregunta condujo a una respuesta previsible: dado que en una clara mayoría de los pacientes con gammopatías monoclonales el 95%-100% de las CP expresaron la forma constitutiva de CD29, y que el porcentaje de la forma constitutiva de CD9 en las CP de estos mismos pacientes fue muy variable, tal y como acaba de describirse en el punto anterior, no se observó ningún tipo de correlación en el porcentaje de CP que expresaron una u otra molécula (**Figura 33**). Sin embargo, sí que se detectó un paralelismo entre la intensidad de expresión de CD9 constitutivo y la intensidad de expresión de la forma constitutiva de CD29: si los pacientes se dividían en dos grupos respecto a la intensidad de CD9 constitutivo, un grupo con IMF baja (inferior a 14.000 u.a. de fluorescencia) y un segundo grupo con IMF alta (superior a 21.000 u.a.), la expresión de CD29 constitutivo fue claramente más alta en el segundo grupo ($p=0,017$). Igualmente, se observó una tendencia al aumento del porcentaje de células con CD29 activado en el segundo grupo (**Tabla 7**), aunque dicha tendencia no fue significativa. Por lo tanto, estos hallazgos sugerían una relación no tanto cuantitativa (entendida como mero porcentaje) como cualitativa entre CD9 y CD29.

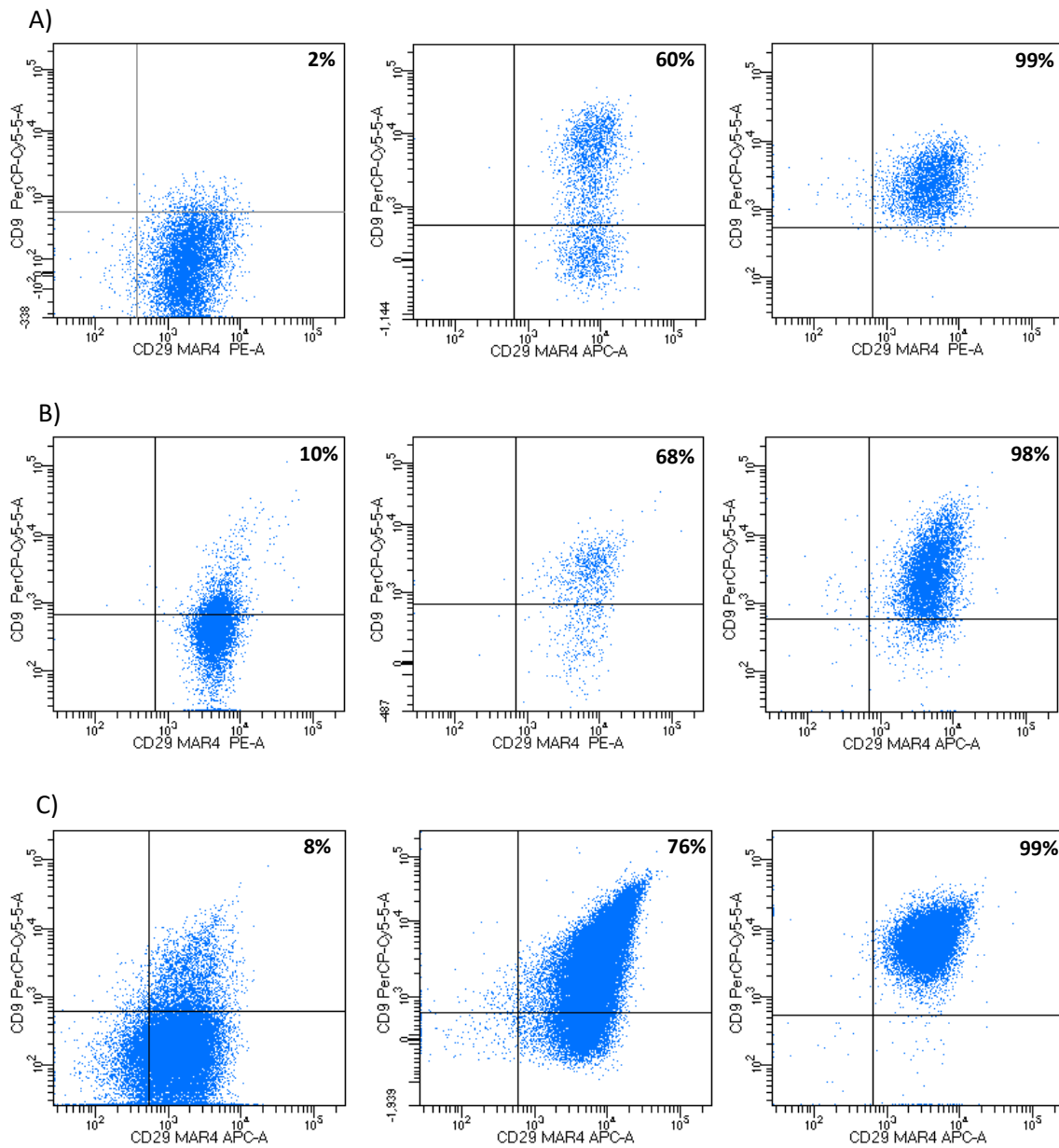


Figura 33. Patrones de expresión conjunta de CD9 constitutivo y de CD29 MAR4 en CP de individuos sanos y de pacientes con gammopatías monoclonales. A) Heterogeneidad de la expresión conjunta de CD9 constitutivo y CD29 MAR4 en CP de individuos sanos; B) Heterogeneidad de la expresión conjunta de CD9 constitutivo y CD29 MAR4 en CP de pacientes con MGUS; C) Heterogeneidad de la expresión conjunta de CD9 constitutivo y CD29 MAR4 en CP de pacientes con MM.

Tabla 7. Relación entre la intensidad de expresión de CD9 constitutivo y los niveles de expresión de la forma constitutiva o activada de CD29			
	CD9 IMF < 14.000 u.a. n = 44	CD9 IMF > 21.000 u.a. n = 13	p
IMF CD29 MAR4 (u.a.)	6.900 (4.000 – 10.500)	10.800 (7.900 – 18.100)	0,017
% CD29 HUTS21	20,35 (4,1 - 45,65)	38,8 (20,25 – 56,55)	0,05

Tabla 7. Diferencias de expresión porcentual e IMF (u.a) de las moléculas CD29 MAR 4 y CD29 HUTS atendiendo a la expresión de CD9 constitutivo.

11. La expresión conjunta de las tetraspaninas CD81 y CD9 amplifica la expresión de CD29 en las CP de MO.

Tradicionalmente, se considera a la tetraspanina CD81 como la más representativa de las tetraspaninas en CP debido a su uso como marcador en la plataforma de diagnóstico inmunofenotípico *Euroflow* (262), ya que CD81 es capaz, en numerosas ocasiones, de distinguir CP normales y tumorales. Sin embargo, y al contrario de lo descrito en este trabajo con la tetraspanina CD9, CD81 de forma aislada no mostró una asociación significativa con la expresión de la $\beta 1$ integrina (CD29), ya sea en su modalidad constitutiva o activada (datos no mostrados). Este resultado descartaba la posibilidad de que la pérdida de expresión de CD81 en las CP, un hallazgo frecuente en pacientes con MM, pudiera estar conectada a la pérdida de expresión de CD29. No obstante, CD81 sí evidenció un papel relevante en el grado de expresión de CD29 siempre que se estudiara en combinación con los niveles observados de CD9 en la membrana de las CP. Tal y como muestra la **Figura 34**, la población de CP que no expresaba ninguna de las dos tetraspaninas (CD9-CD81-) fue la que sistemáticamente expresó con menor intensidad la molécula CD29 en su formato constitutivo (CD29 MAR4), aumentando dicha intensidad conforme la CP comienza a expresar CD9 o CD81, hasta alcanzar el grado de expresión máximo en la población de CP que expresó de forma conjunta CD9 y CD81. Esta gradación en la expresión de la forma constitutiva de CD29 fue particularmente relevante en el grupo minoritario de pacientes con MM en el que una fracción, casi siempre minoritaria, de las CP malignas no expresaron valores detectables de CD29 MAR4. Estos datos muestran un efector amplificador o, al menos, adyuvante, de CD81, respecto a la asociación previamente mostrada entre la expresión de CD9 y CD29 constitutivo,

incrementando de forma acusada la magnitud de la significación de la asociación entre ambas moléculas (**Tabla 8**).

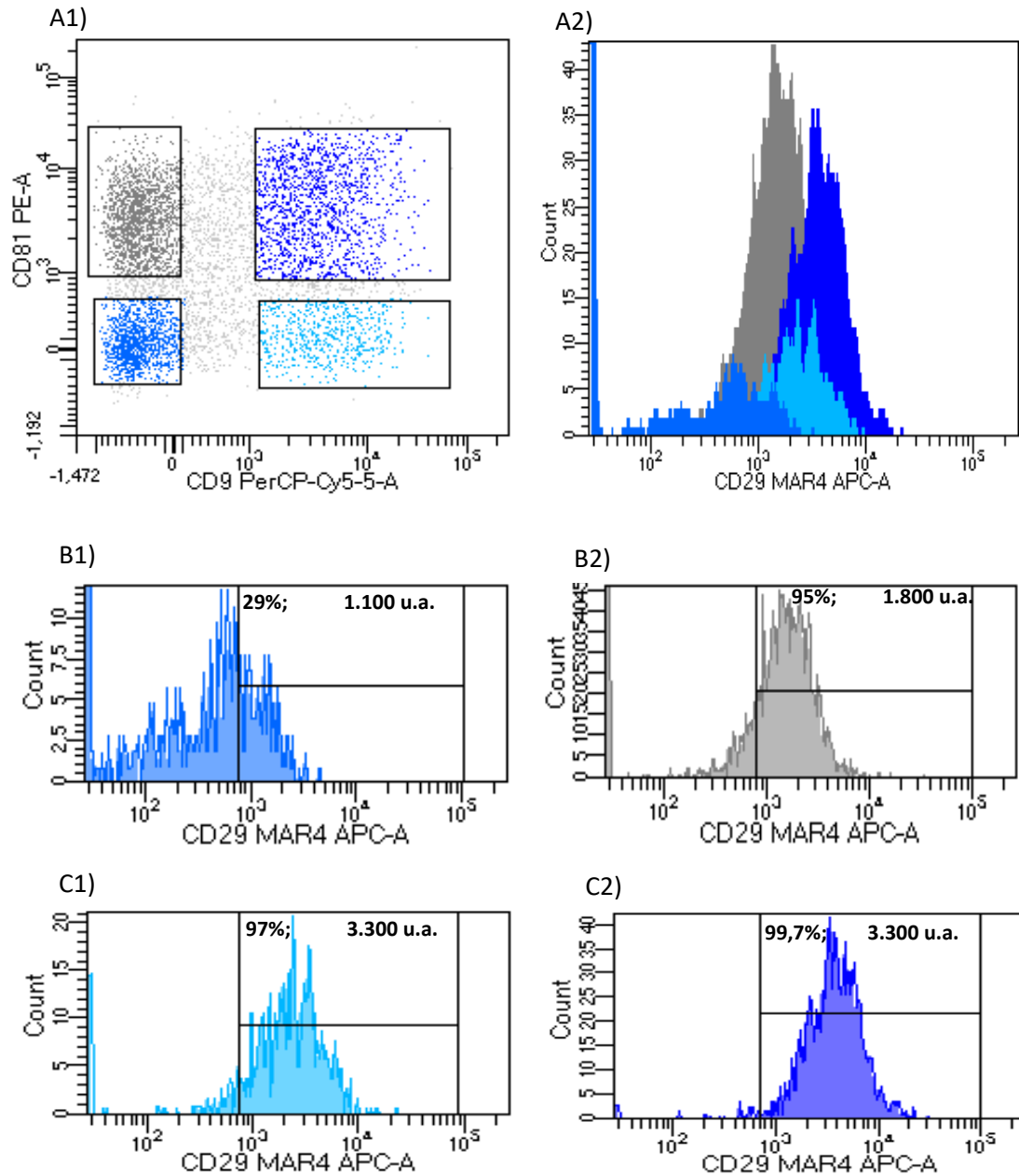


Figura 34. Ejemplo representativo de la expresión de CD29 MAR4 en un paciente con MM atendiendo a los diferentes niveles de expresión de CD9 y CD81; A1) Distribución de subpoblaciones en función de la coexpresión de CD9 y CD81; A2) Histograma uniparamétrico de superposición (“overlay”) de la expresión de CD29 MAR4 en las 4 subpoblaciones de CP indicadas en A1; B1) Expresión de CD29 MAR4 en la población CD81- CD9-; B2) Expresión de CD29 MAR4 en la población CD81+ CD9-; C1) Expresión de CD29 MAR4 en la población CD81- CD9+; C2) Expresión de CD29 MAR4 en la población CD81+ CD9+. En el interior de cada histograma se indica el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD29 MAR4.

Tabla 8. Comparación de la IMF de CD29 MAR4 entre poblaciones de CP atendiendo a la expresión diferencial de CD9 y CD81		
Población: IMF CD29 MAR4 (rango IMF en u.a.)	Población: IMF MAR4 (rango IMF en u.a.)	<i>p</i>
CD81- CD9-: 2.490 u.a. (1.361-3.470)	CD81+ CD9+: 5.500 u.a. (4.615- 7.130)	< 0,0001
CD81+ CD9-: 4.370 u.a. (2.600-5.400)	CD81+ CD9+: 5.500 u.a. (4.615-7.130)	< 0,0001
CD81- CD9+: 3.300 u.a. (1.800-4.080)	CD81+ CD9+: 5.500 u.a. (4.615-7.130)	< 0,0001
CD81- CD9-: 2.490 u.a. (1.361-3.470)	CD81+ CD9-: 4.370 u.a. (2.600-5.400)	0,0001
CD81+ CD9-: 4.370 u.a. (2.600-5.400)	CD81- CD9+: 3.300 u.a. (1.800-4.080)	0,0025

Tabla 8. Comparación de la intensidad de fluorescencia (IMF -u.a.-) del CD29 MAR4 entre poblaciones atendiendo a la expresión diferencial de CD81 y CD9. Se representan medianas y rangos intercuartílicos. (n = 44).

12. La molécula CD9 expresa el epítipo conformacional PAINS13 en las CP de MO. Patrón de expresión del epítipo PAINS13 en otras poblaciones hematopoyéticas de MO.

Los resultados anteriores demuestran que en los pacientes con gammapatías monoclonales que expresaron CD9 en la mayoría de las CP clonales, dicha expresión se asoció de forma significativa a niveles más altos de CD29 constitutivo, en especial en aquellos pacientes que expresaban a su vez CD81. Aunque CD9, tal y como sucede con otras tetraspaninas, se asocia físicamente en la membrana citoplásmica con un buen número de proteínas, destacando entre ellas la $\beta 1$ integrina, la vinculación productiva desde un punto de vista funcional entre ambas moléculas puede ser determinada en células completas mediante el uso del AcMo anti-CD9 clon PAINS13, que reconoce un epítipo conformacional de CD9 dependiente de la activación previa de la $\beta 1$ integrina (132). Debido a la absoluta falta de estudios en la literatura científica respecto a la expresión y regulación de esta forma conformacionalmente relevante de CD9 en células primarias humanas (con la excepción de células T activadas de sangre periférica), nos dispusimos a comprobar si la molécula CD9 de las CP de MO de estos pacientes manifestaba este epítipo funcionalmente relevante, así como su patrón de expresión en el resto de poblaciones hematopoyéticas de MO, considerando su linaje y/o su estadio madurativo.

Para definir la expresión del epítipo conformacional de la molécula CD9, incubamos las células del aspirado de MO con el AcMo de ratón anti-CD9 PAINS13 (de isotipo IgG3) y se reveló con un AcMo de rata anti-IgG3 conjugado con FITC, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Se comprobó la ausencia de señal del anticuerpo secundario (rat anti-mouse IgG3) y la no interferencia del marcaje con otros AcMo, como se muestra en la **Figura 35**.

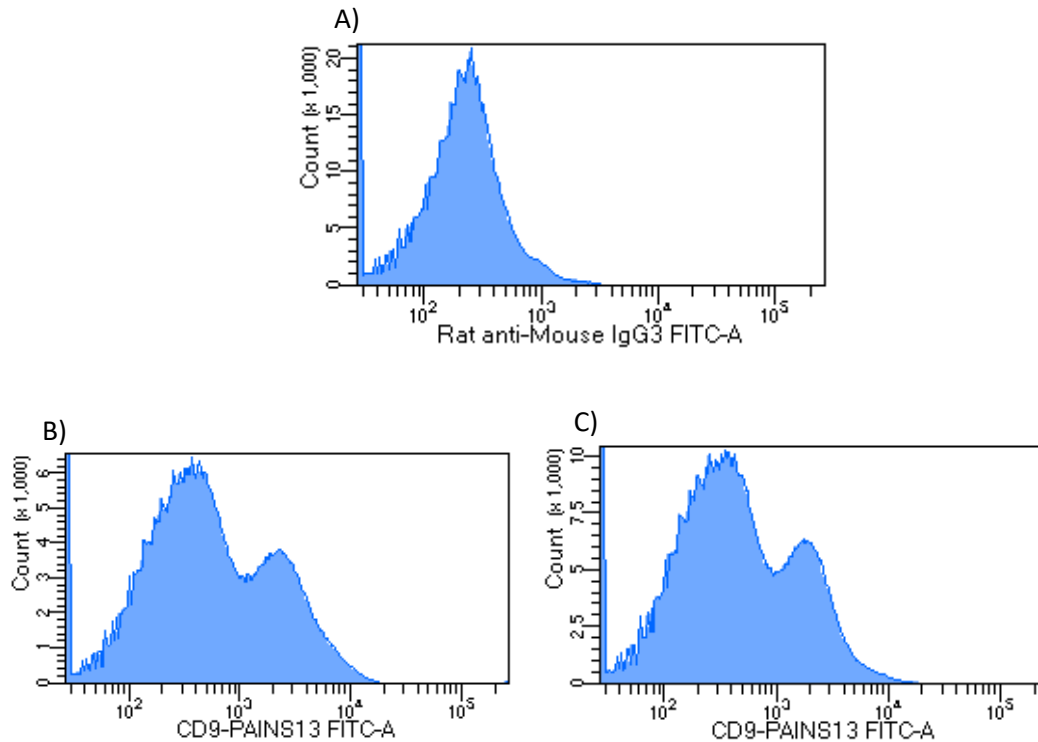


Figura 35. Patrón de expresión de CD9 PAINS13 en las CP de MO. **A)** no adición del AcMo primario PAINS13; sí adición del secundario anti-IgG3 FITC; sí adición de otros AcMo conjugados con otros fluorocromos; **B)** sí adición del AcMo primario PAINS13; sí adición del AcMo secundario anti-IgG3 FITC; no adición de otros monoclonales conjugados con otros fluorocromos; **C)** sí adición del AcMo primario IgG3 PAINS13; sí adición del AcMo secundario anti-IgG3 conjugado con FITC; sí adición de otros AcMo conjugados con otros fluorocromos.

Tal y como muestra la Figura 36, las CP de las gammapatías monoclonales expresaron de forma variable el epítipo PAINS13 (**FIGURA 36A-C**). Dicha variabilidad también se manifestó al comparar la expresión del epítipo conformacional con el epítipo constitutivo de CD9: un grupo de pacientes en que las CP clonales expresaron porcentajes similares de ambos epítipos (**FIGURA 36D**), y un grupo de pacientes en que las CP clonales expresaban un porcentaje del epítipo constitutivo superior al porcentaje del epítipo conformacional PAINS13 (**FIGURA 36E**). Atendiendo a esta heterogeneidad, se dividió a los pacientes con gammapatías monoclonales en dos grupos, dependiendo de

que más o menos del 20% de las CP clonales expresaran CD9 PAINS13, para así comprobar su relación con la expresión de CD9 constitutivo. Como se muestra en la **Tabla 9** y a pesar de la heterogeneidad previamente descrita en la expresión de ambos epítomos, la correlación entre ambos epítomos fue significativa tanto en porcentaje como en intensidad de expresión y, a su vez, la curva de regresión mostró una correlación positiva entre la expresión del epítomo PAINS13 y el epítomo constitutivo (**Figura 37**).

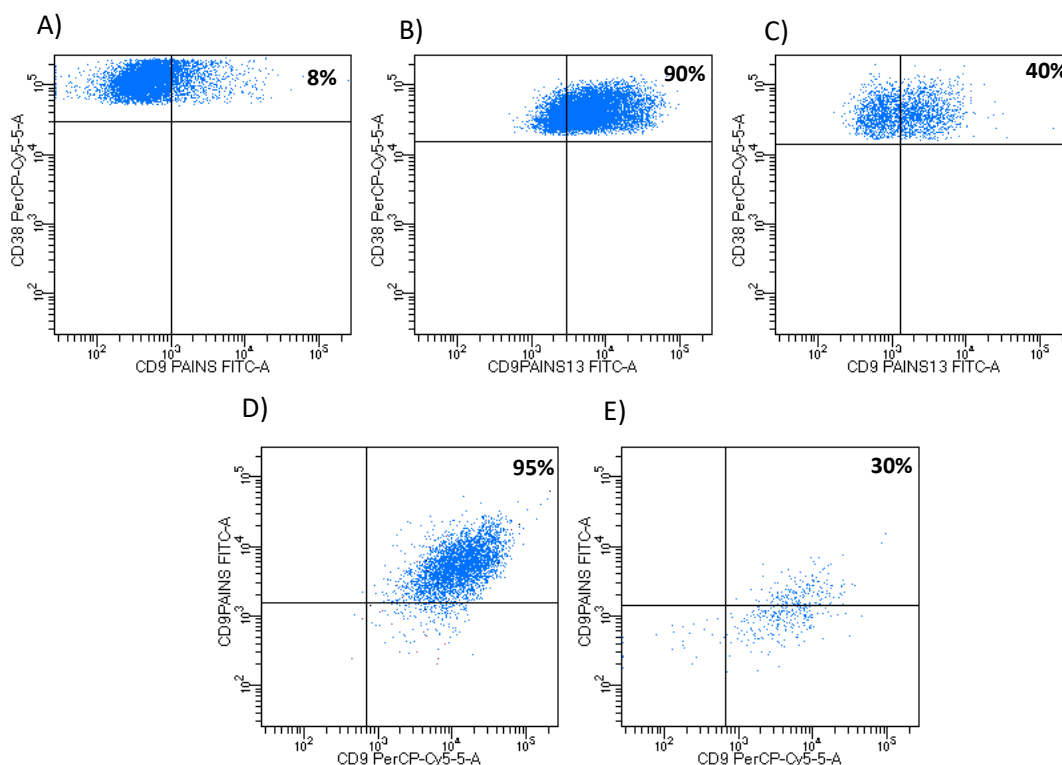


Figura 36. Patrones de expresión del epítomo conformacional CD9 PAINS13 en CP de MO. A – C) Porcentajes muy variables de expresión del epítomo CD9 PAINS13 en CP CD38++ de tres diferentes pacientes con gammopatías monoclonales; **D)** Coexpresión similar del epítomo constitutivo de CD9 (clon M-L13) y del epítomo conformacional CD9 PAINS13 y **E)** Expresión del 100% del epítomo constitutivo de la molécula CD9 (clon M-L13) y expresión parcial de CD9 PAINS13 en dos pacientes con gammopatías monoclonales.

Tabla 9. Correlación entre los niveles del epítomo conformacional CD9 PAINS13 y CD9 constitutivo			
	% CD9 PAINS13 <20 n = 29	% CD9 PAINS13 >20 n = 24	p
% CD9	21,4 (10,9 - 30)	91,4 (39,4 - 97,4)	<0,0001
IMF CD9 (u.a.)	9000 (4.700-12.400)	13.100 (8.000 – 26.300)	0,0227

Tabla 9. Correlación entre los niveles del epítomo conformacional CD9 PAINS13 y CD9 constitutivo. Se indica el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD9. n=53

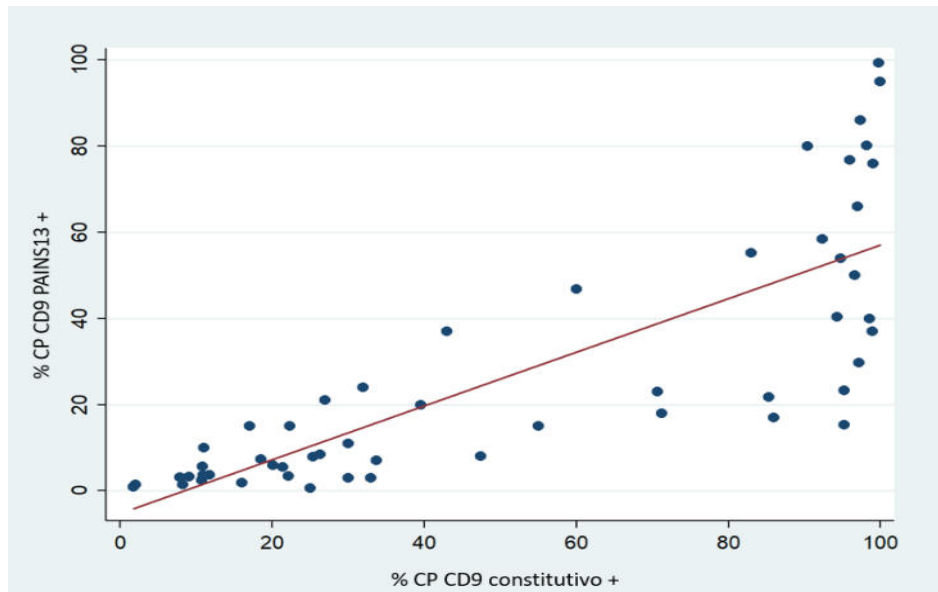


Figura 37. Curva de regresión de los porcentajes de expresión de CD9 constitutivo y CD9 PAINS13 ($p < 0,001$; $r = 0,6$). $n = 53$

Una vez analizada tanto la expresión constitutiva de CD9 como la de su epítipo conformacional PAINS13 en las CP de MO, nos dispusimos a investigar su expresión en dos de los principales linajes celulares de la MO: la serie mieloide / granulocítica y la serie monocítica.

En la **Figura 38** se muestra la estrategia para seleccionar la serie mieloide en el análisis por CF: la totalidad de la serie mieloide / granulocítica se identificó en un primer plot de SSC/CD33 (**Figura 38B**), mientras que en un segundo plot de SSC/CD10 (**Figura 38C**) se separó la población mieloide madura CD10+ (neutrófilos) de las poblaciones mieloides más inmaduras CD10-. A su vez, la población CD10- se analizó en función de la expresión de CD11b (**Figura 38D**), obteniéndose la población de promielocitos (CD11b-CD10-) y la población de mielocitos + metamielocitos (CD11b+CD10-). Las **Figuras 38E-G y 40A** muestran un aumento de la expresión de CD9 claramente asociado a la progresión de la maduración de la serie mieloide: el promielocito, la célula más inmadura, expresó escasamente tanto el epítipo constitutivo como el epítipo conformacional PAINS13 ($16,9\% \pm 7,5\%$ y $5,6\% \pm 4,2\%$, respectivamente); estos porcentajes alcanzaron niveles intermedios en las fases madurativas de mielocito y metamielocito ($32,6\% \pm 17,9\%$ y $32,4\% \pm 17,6\%$, respectivamente), alcanzando su máxima expresión en el neutrófilo, la etapa más madura en esta serie celular ($82,4\% \pm 20,2\%$ y $72,1\% \pm 13,6\%$, respectivamente). Las IMF de ambos epítipos de la molécula

CD9 siguieron una dinámica muy similar, aumentando conforme avanzó la maduración (datos no mostrados)

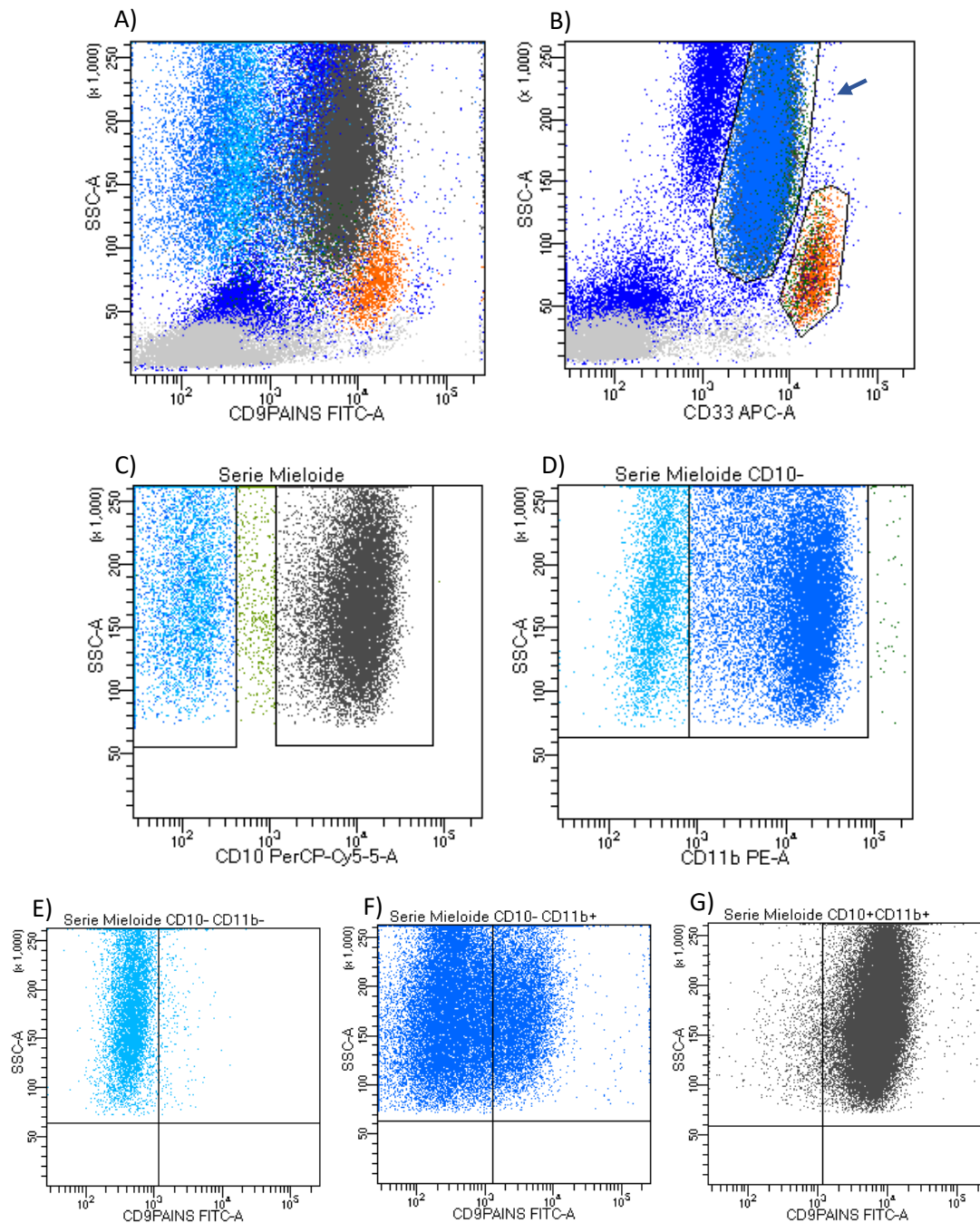


Figura 38. Estrategia para la detección de CD9 PAINS13 en diferentes estadios madurativos de la serie mieloide/granulocítica. A) Expresión del epítipo CD9 PAINS13 en MO total; Se advierte el desdoblamiento de la expresión del epítipo en la serie mieloide / granulocítica y la expresión máxima del epítipo en las células de la serie monocítica (color naranja) respecto de las demás poblaciones medulares; B) Discriminación de la serie mieloide (flecha azul) y monocítica (eventos color azul) por SSC y CD33; C) Discriminación de la serie mieloide en una población CD10+ y en otra CD10-. D) Plot que muestra los distintos niveles de expresión de CD11b en la población mieloide CD10-. E) Expresión del epítipo CD9 PAINS13 en la población CD10 – CD11b- (promielocitos); F) Expresión del CD9 PAINS13 en la población CD10 – CD11b+ (mielocito + metamielocito); G) Expresión de CD9 PAINS13 en la población de neutrófilos maduros (CD10+CD11b+).

La serie monocítica se identificó en un primer plot de SSC/CD33++ (**Figura 39A**), mientras que en un segundo plot CD33++/CD14 subordinado al primero se identificaron monoblastos (CD33++, CD14-), promonocitos (CD33++, CD14+ low) y monocitos (CD33++, CD14+ intermedio) (**Figura 39B-C**). El porcentaje de expresión de los epítomos constitutivo y conformacional de CD9 siguieron una pauta similar al descrito en la serie mieloide, ya que ambos epítomos aumentaban conforme maduraba la célula monocítica: el monoblasto expresó un porcentaje intermedio de CD9 constitutivo y CD9 PAINS13 (76,4% ± 14,3% y 45,5% ± 10,4% , respectivamente), que se incrementó en la siguiente fase madurativa de promonocito (94,5% ± 6% y 81,1% ± 14,9% , respectivamente), alcanzando su valor máximo en el monocito, la etapa de mayor madurez de esta serie (99,1% ± 1,7% y 98% ± 1,6%, respectivamente). Las IMF de ambos epítomos de CD9 siguieron el mismo modelo, incrementándose según progresa la maduración (**Figuras 39D-F y 40b**).

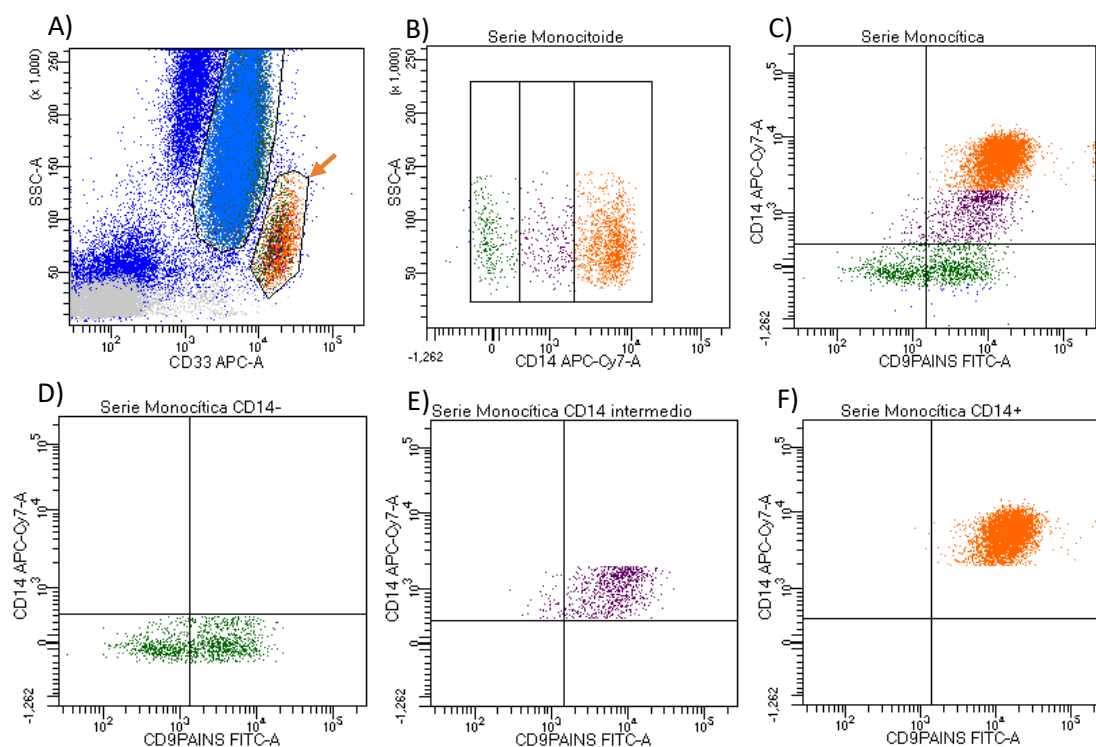


Figura 39. Estrategia para la detección por CF de diferentes estadios madurativos de la serie monocítica y su expresión del epítomo conformacional CD9 PAINS13. A) Ejemplo representativo de la detección de la serie monocítica atendiendo a sus características distintivas de SSC y de máxima expresión del antígeno CD33 (flecha naranja). B) Detección de los diferentes estadios madurativos de la serie monocítica atendiendo a la diferente expresión de CD14; C) Expresión de CD9 PAINS13 en serie monocítica total; D) Expresión de CD9 PAINS13 en monoblastos; E) Expresión de CD9 PAINS13 en promonocitos; F) Expresión de CD9 PAINS13 en monocitos.

Por lo tanto, la expresión de las dos formas de la molécula CD9 y su relación con la maduración celular difiere entre la serie mielo-monocítica y las CP: mientras que las formas más maduras de la serie mielo-monocítica, representadas por neutrófilos y monocitos, exhiben de forma constante porcentajes muy similares, y muy elevados, de ambos epítomos de CD9, las CP, que representan la culminación de la maduración del linaje B, presentan una notable heterogeneidad en la expresión de los dos epítomos de esta molécula.

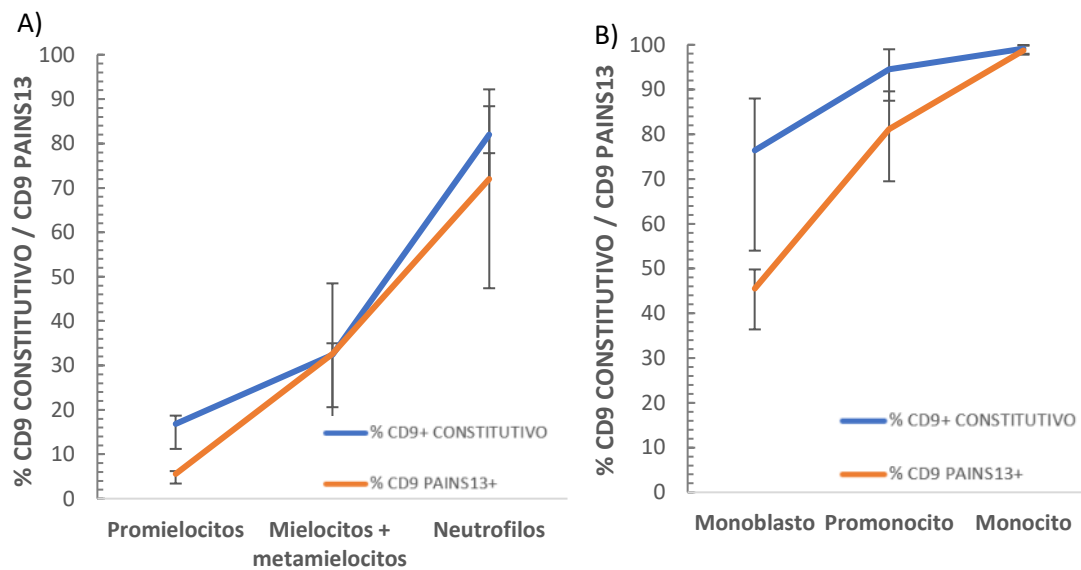


Figura 40. Comparación de la expresión porcentual del CD9 constitutivo y CD9 PAINS13 en diferentes estadios madurativos de la serie mieloide y monocítica. A) serie mieloide B) serie monocítica. (n = 15)

13. Regulación de la expresión del epítomo CD9 PAINS13 en las CP de MO: efecto de la temperatura, de los cationes y de la expresión de CD49f

Tal y como se ha descrito con el movimiento de difusión transversal de fosfolípidos y proteínas en el plano de la membrana, el nivel de asociación de muchas moléculas de la superficie celular es un proceso caracterizado por su dependencia de la temperatura. Dado que esta dependencia es especialmente llamativa en los cambios de conformación de algunas proteínas, analizamos a continuación si la expresión del epítomo PAINS13 en la molécula CD9 de las CP de MO también estaba afectada por este parámetro. Con este objeto, comparamos la expresión del epítomo PAINS13 en las CP de MO a 4°C y a 37°C. Las CP fueron incubadas con su propio plasma autólogo, sin ningún

tipo de manipulación, a las dos temperaturas antes descritas. En la **Figura 41** se muestra un ejemplo representativo de cómo el epítipo conformacional se reguló positivamente a 37°C, ya que la intensidad de expresión del epítipo PAINS13 a esta temperatura aumentaba de media un 30% (n=4) respecto a la detectada a 4°C. Por el contrario, la expresión constitutiva de CD9 determinada con el AcMo anti-CD9 clon ALB6, fue prácticamente idéntica en ambas temperaturas.

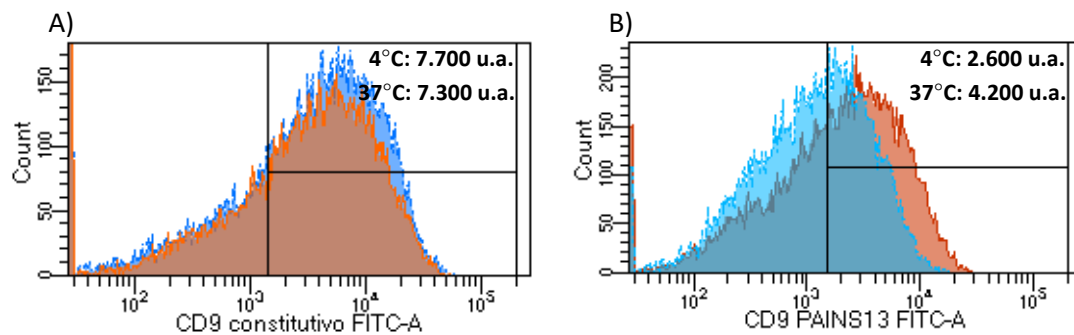


Figura 41. Ejemplo representativo de la regulación por temperatura de la expresión porcentual e IMF (u.a.) del epítipo CD9 PAINS13 (en rojo – expresión a 37°C; en azul – expresión a 4°C; A) Ausencia de efecto regulador de la temperatura en la expresión del epítipo constitutivo de CD9; B) Aumento de la expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 a 37°C respecto a 4°C.

Dado que la conformación de la molécula CD9 detectada con el AcMo PAINS-13, al menos en ciertas líneas celulares y en células T primarias de sangre periférica estimuladas con mitógenos, se ha descrito que depende de la activación previa de la $\beta 1$ integrina con, entre otros, cationes divalentes, nos dispusimos a comprobar el efecto del Mn^{2+} en la expresión del epítipo PAINS13 en las CP de MO. Con este fin, el aspirado de MO se lavó exhaustivamente con PBS para eliminar todo vestigio de los factores solubles contenidos en el plasma medular que pudieran estimular la expresión de PAINS13 en las CP y, a continuación, se incubó con cantidades crecientes de Mn^{2+} . En la **Figura 42A** se muestran dos ejemplos representativos de dos pacientes con MM, uno con expresión “*ex vivo*” elevada de CD9 PAINS13 (caso 1) y otro con expresión baja de este epítipo (caso 2): en ambos casos, la eliminación del plasma medular no afectó a la expresión del epítipo conformacional PAINS13 en la molécula de CD9, y en ambos casos la adición de cantidades ascendentes de Mn^{2+} no modificó el nivel de expresión del epítipo PAINS13. En contraste, el epítipo de activación HUTS21 de la $\beta 1$ integrina (CD29) disminuyó de forma significativa en las CP malignas de MO de la mayoría de los pacientes tras la eliminación del plasma medular y respondió óptimamente a la adición de Mn^{2+} (**Figura 42B**).

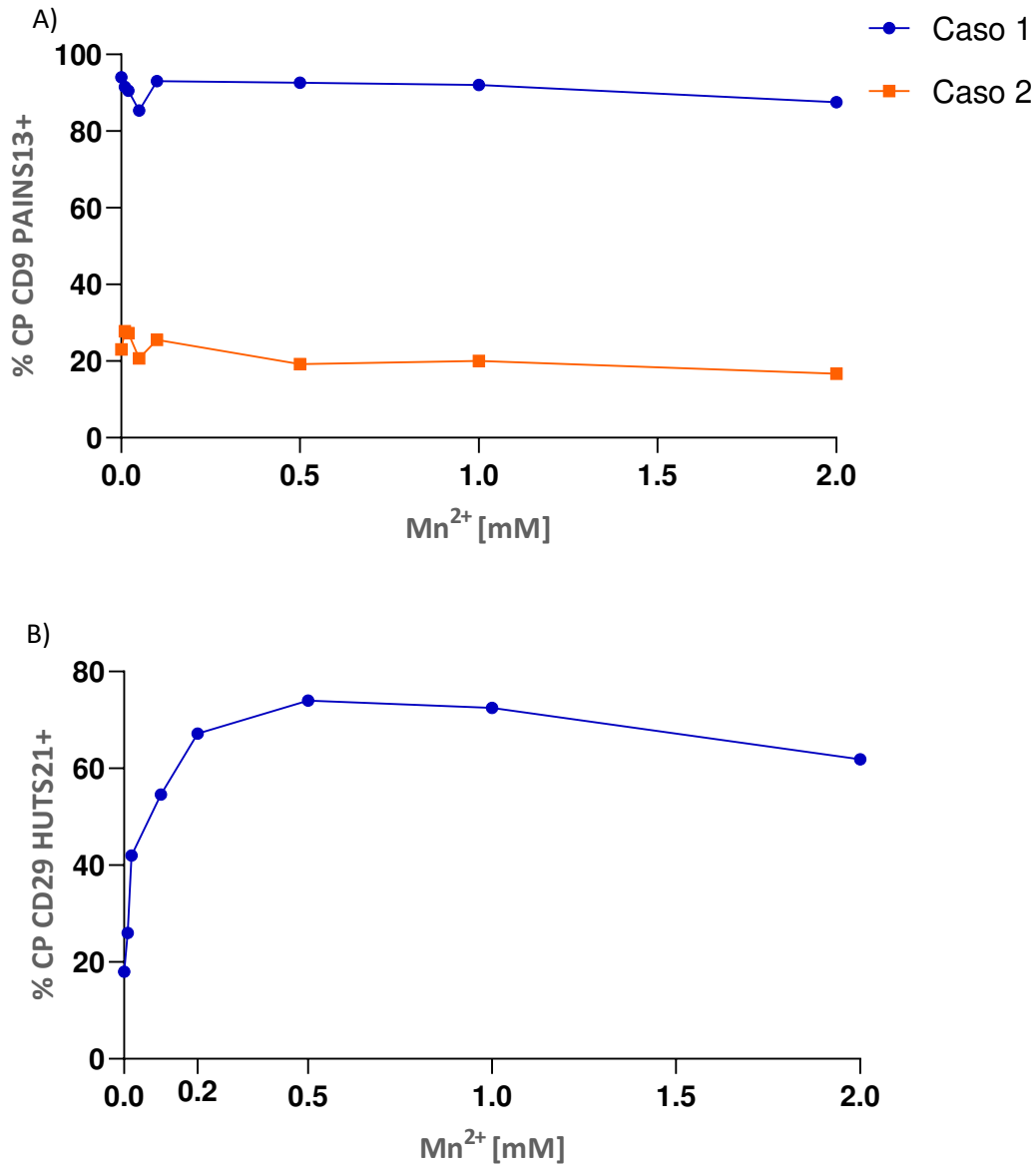


Figura 42. Efecto del Mn^{2+} en la expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 en CP de MM. **A)** Ausencia de efecto del catión Mn^{2+} en la expresión de CD9 PAINS13 en las CP de dos casos representativos de pacientes con MM. **B)** Efecto de la adición de Mn^{2+} en la activación de CD29 (células CD29 HUTS21+) del paciente del caso 1 de esta figura.

Por último y como ya se ha mencionado, la expresión del epítipo CD9 PAINS13 en los modelos celulares descritos hasta el momento depende de la activación previa de $\beta 1$ (CD29), pero, curiosamente, tan solo cuando $\beta 1$ se asocia con la cadena $\alpha 6$ (VLA-6; CD49f), dando lugar a la integrina $\beta 1/\alpha 6$ (CD29/CD49f), y no cuando $\beta 1$ se encuentra unida a $\alpha 4$ (VLA-4; CD49d). Por este motivo estudiamos la expresión de CD49f en las CP de MO de pacientes con gammopatías monoclonales. Como puede observarse en la **Tabla 10**, el porcentaje de expresión de esta molécula en las CP de MO fue muy variable.

Tabla 10. Porcentaje e IMF (u.a.) de la expresión de CD49d y CD49f en CP clonales de MO			
% CP CD49f+	IMF CD49f (u.a.)	% CP CD49d+	IMF CD49d (u.a.)
77,6 (41,8-97,5)	3.800 (2.800-6.000)	99,6 (98,9 -100)	12.350 (6.500-18.000)

Tabla 10. Porcentaje e IMF (u.a.) de la expresión de CD49f y CD49d en CP tumorales de MO. Entre paréntesis se muestra el rango intercuartílico de expresión de los porcentajes e IMF de ambas moléculas. n=72

De hecho, un porcentaje minoritario pero significativo de pacientes evidenciaron un porcentaje de expresión de CD49f inferior al 20% en sus CP (9% de los casos), en contraposición a CD49d, que se expresó en un 95%-100% de las CP tanto normales como clonales de MO. De hecho, tan solo en un 4% de casos el porcentaje fue inferior al 90% de CP CD49d+ y no se detectó un solo caso con un porcentaje inferior al 40%. En este sentido, el modo de expresión de CD49f se asemejaba al patrón de expresión de CD9 PAINS13 mucho más que CD49d. De hecho, CD9 PAINS13 y CD49f manifestaban un patrón de co-expresión en plots biparamétricos claramente compatibles con una expresión similar de ambas moléculas en la membrana de las CP (Figura 43A y B). Esta co-expresión fue estadísticamente significativa al comparar los porcentajes (Figura 44).

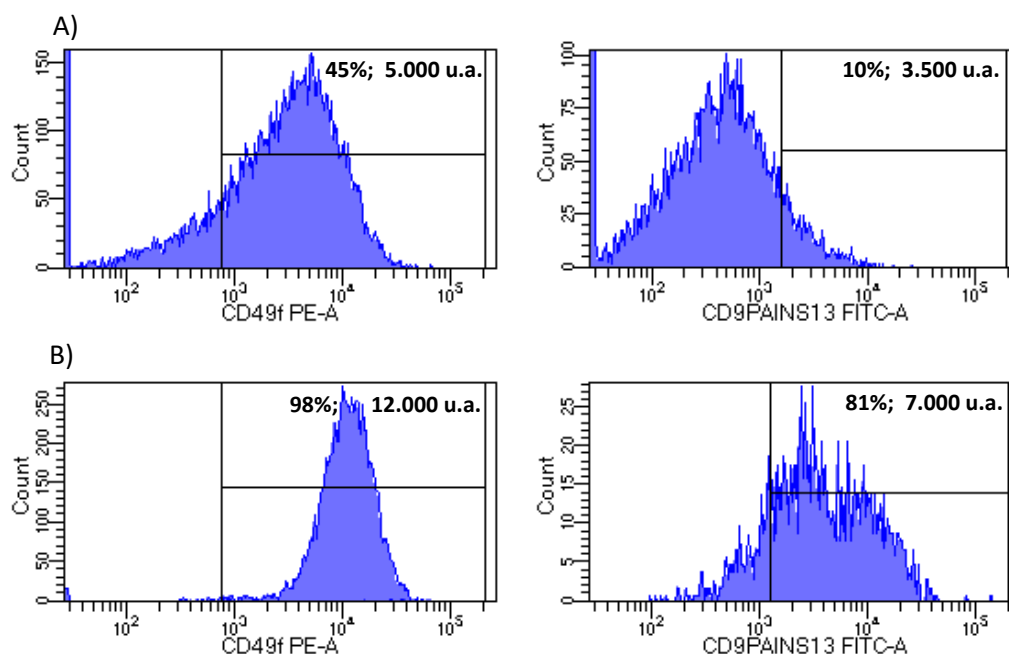


Figura 43. Estudio por CF del paralelismo en la expresión porcentual e IMF (u.a.) de la integrina CD49f y del epítipo conformacional CD9 PAINS13 en dos ejemplos representativos de pacientes con MM: A) porcentajes e intensidades de expresión (IMF) reducidos tanto de CD49f como de CD9 PAINS13 B) porcentajes e intensidades de expresión (IMF) intermedios-altos tanto de CD49f como de CD9 PAINS13

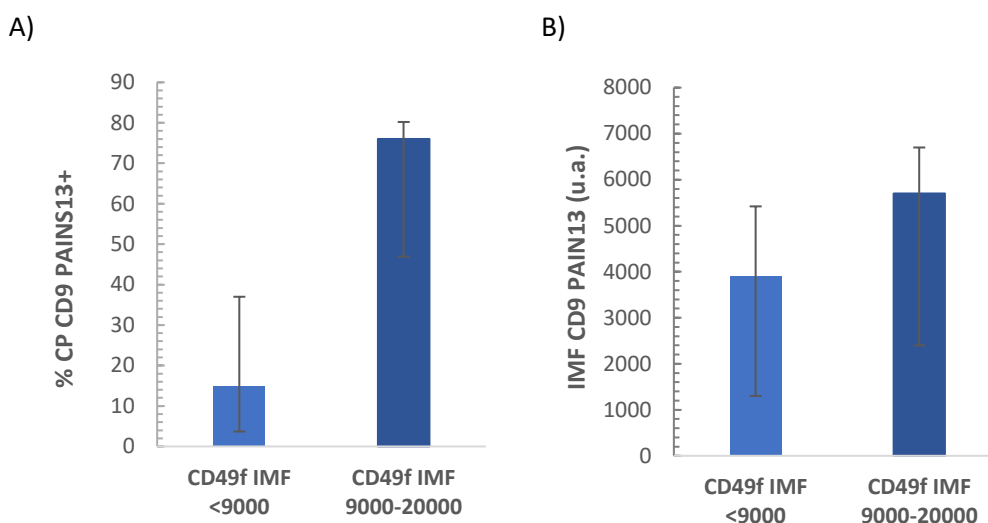


Figura 44. Similitud en la expresión porcentual e IMF (u.a.) de CD49f y CD9 PAINS13. Las CP de pacientes con gammopatías monoclonales se dividieron en dos grupos atendiendo a la expresión baja (<9.000 u.a.) o intermedia-alta (9.000 u.a.-20.000 u.a.) de la integrina CD49f. A) Diferencias en el porcentaje de CP CD9 PAINS13+ según grupos de intensidad de CD49f ($p=0,02$); B) Diferencias en IMF de CD9 PAINS13 según grupos de intensidad de CD49f ($p=0,1$) (IMF CD49f < 9.000 u.a.; $n=60$; IMF CD49f: 9.000 u.a. – 20.000 u.a.; $n=5$)

14. La expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 no depende del nivel de expresión constitutivo o activado de la cadena $\beta 1$ (CD29)

Considerando los datos precedentes de la literatura científica, la expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 indicaba, de forma implícita, la activación previa de la $\beta 1$ integrina, ya que en los tipos celulares que se describen en estos trabajos el epítipo conformacional de CD9 nunca se detectaba si la $\beta 1$ integrina no estaba previamente activada. Además, el anticuerpo CD9 PAINS co-inmunoprecipitaba la forma activa y no la inactiva de la cadena $\beta 1$.

Previamente hemos demostrado que existe una correlación entre los niveles de expresión de la forma constitutiva de CD9 con la forma constitutiva de la $\beta 1$ integrina (CD29 MAR4) pero no con su forma activada (CD29 HUTS21). Sin embargo, por los datos antes citados, no era descartable que sí pudiera existir una correlación entre el epítipo conformacional de CD9 y el epítipo conformacional / activado de la $\beta 1$ integrina (CD29 HUTS21). En la **Figura 45A y B** se muestran ejemplos representativos y en la **Tabla 11** el estudio de significación, que indicaban que no había ningún tipo de correlación entre el porcentaje o la intensidad de expresión del epítipo CD9 PAINS13 y el porcentaje o la IMF de la forma constitutiva de la $\beta 1$ integrina (CD29 MAR4) ($p=0,96$

y $p=0,23$, respectivamente), ni con el porcentaje o la IMF de la $\beta 1$ integrina activada (CD29 HUTS21) ($p=0,71$ y $p=0,96$, respectivamente). Es pertinente recordar que, por el contrario, sí que existió correlación entre la expresión de CD9 PAINS13 y la intensidad de expresión de CD49f. Estos resultados muestran que, en las CP de MO, la adquisición del epítipo conformacional CD9 PAINS13 es independiente del nivel de expresión de la $\beta 1$ integrina (CD29) o de su activación, y a su vez son congruentes, por una parte, con la ausencia de subordinación de la expresión del epítipo PAINS13 a la presencia de cationes en el medio y, por otro, a su asociación con CD49f, una molécula que se expresa de forma muy variable en las CP de pacientes con MM.

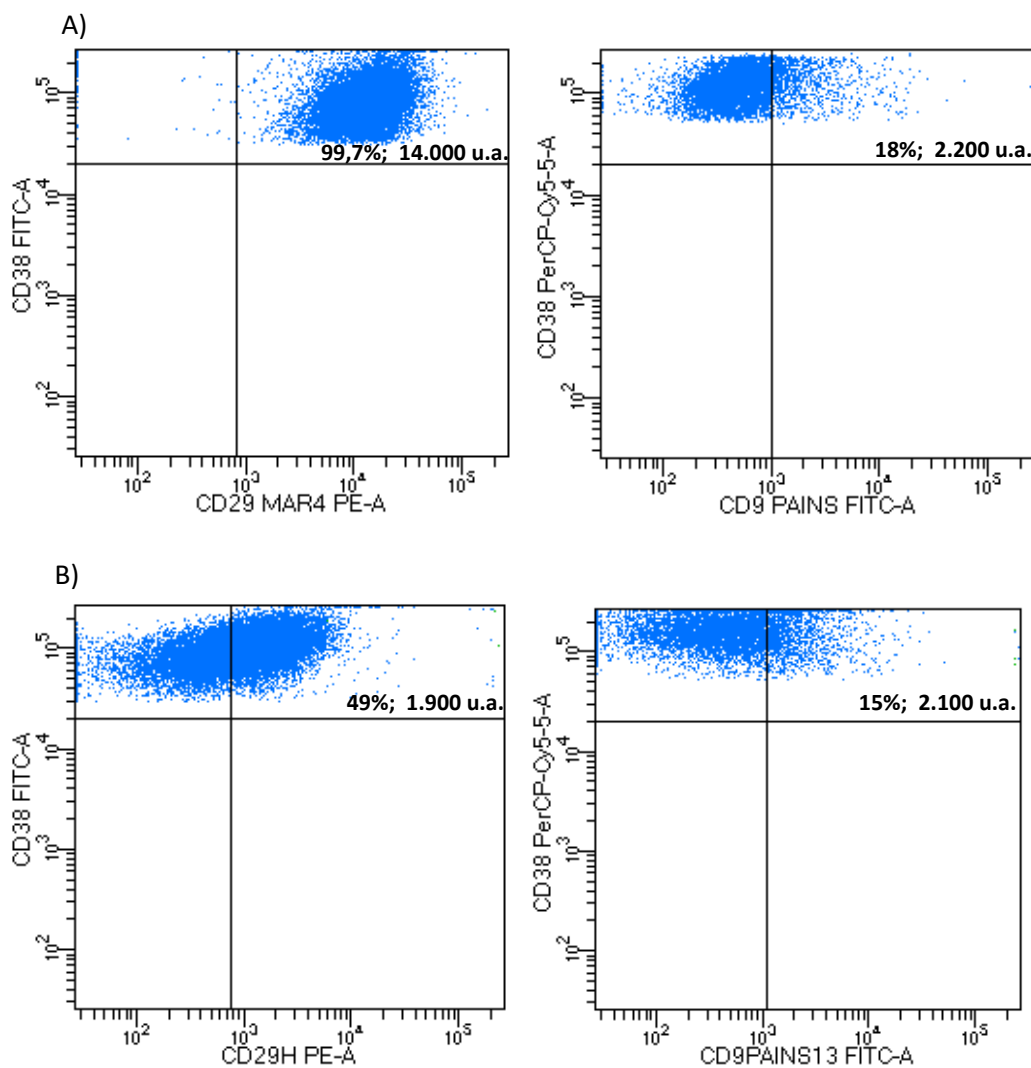


Figura 45. Patrón de expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 dependiendo de los niveles de expresión de CD29 MAR4 o CD29 HUTS21. A) Expresión de CD9 PAINS13 en CP de MM con expresión intermedia de CD29 MAR4. B) Expresión de CD9 PAINS 13 en CP de MM con expresión baja-intermedia de CD29 HUTS21.

Tabla 11. Expresión de CD29 MAR4 y CD29 HUTS21 en CP de pacientes con MM atendiendo al porcentaje de expresión de CD9 PAINS13			
	CD9 PAINS13 < 20 % n = 29	CD9 PAINS13 > 20% n = 24	p
% CP CD29 MAR4+	99,5% (85,5% - 100%)	99% (70% -99%)	0,9664
IMF CD29 MAR4 (u.a.)	7000 u.a. (4.000 u.a. - 10.500 u.a.)	8.600 u.a. (5.400 u.a. - 14.600 u.a.)	0,2354
% CP CD29 HUST21+	20% (7,9% - 46%)	25,5% (11,7% - 53%)	0,7161
IMF CD29 HUTS21 (u.a.)	1.400 u.a. (1.100 u.a.- 1.700 u.a.)	1.500 u.a. (1.200 - 1.800)	0,9619

Tabla 11. Expresión de la forma constitutiva y activada de CD29 en CP de pacientes con MM dependiendo del porcentaje de expresión de CD9 PAINS13. Se indica el porcentaje y la IMF (u.a.) de la expresión de CD29 MAR4 y CD29 HUTS21.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En estudios previos, nuestro grupo ha demostrado que las CP de MO de pacientes con MM expresan la forma activa de la integrina CD29 (263) y que la activación de esta molécula es dependiente de factores solubles contenidos en el plasma medular, tales como los cationes divalentes (en especial Mn^{2+}) y VCAM-1 soluble (264), y se documenta parcialmente la heterogeneidad de dicha expresión en diferentes pacientes. Este trabajo ha abordado el nivel de expresión y la regulación de la forma activa y constitutiva de CD29 en las diferentes etapas de la enfermedad, desde MGUS hasta la fase de EEM, y también la expresión de otras proteínas que puedan reemplazarla en su función y, especialmente, la expresión y regulación de la tetraspanina CD9 y su correlación con los niveles de expresión y activación de CD29.

Al realizar por primera vez el estudio de las formas constitutiva y activa de CD29 desde la etapa de MGUS, considerada como la fase inicial y premaligna de la enfermedad (231), transitando por tres clases distintas de CP malignas en la MO, dos de ellas atendiendo precisamente a los niveles de CD29, y, por último, las CP tumorales de territorios distintos a la MO y correspondientes a la EEM, se detectó una progresiva pérdida de CD29 constitutivo que se acompañó de una pérdida, hasta llegar a la desaparición, de la forma activa. Se establece así una asociación evidente entre pérdida de esta integrina y la progresión de la enfermedad. Es pertinente recordar que son muchos los parámetros que se utilizan para la estadificación de la enfermedad, fundamentalmente clínicos y genéticos (265). Sin embargo, se carece de biomarcadores que anticipen la progresión y permitan tomar decisiones terapéuticas tempranas y oportunas. A nuestro juicio, CD29 se comporta como un excelente biomarcador predictivo de la progresión ya que la determinación combinada de sus formas constitutiva y activa con su expresión a la baja, definen con precisión las diferentes etapas de la enfermedad. A su vez, también mostró correlación con los estadios II y III del ISS del MM. Esta correlación aportó un dato significativo: los casos poco habituales de MM donde el porcentaje de CP no superaba el 90% de células CD29 MAR4+ se acumulaban en el estadio III de la enfermedad. Hay que recordar que este tipo de célula muestra alteraciones evidentes para activar la molécula CD29 y se une pobremente a la FN, además de asociarse con un porcentaje aumentado de CP circulantes, una característica ligada a mal pronóstico (266).

Estos resultados muestran gran interés en los dos extremos de la evolución de la enfermedad (MGUS y EEM), ya que es en estas dos etapas donde un factor predictivo de progresión puede tener un mayor impacto en la toma de decisiones terapéuticas.

Es bien sabido que el MGUS representa una condición pre-maligna clásica con un riesgo bajo de conversión a un proceso maligno, aunque el riesgo de progresión persiste indefinidamente. Entre los factores de riesgo que predicen la progresión de MGUS a MM, el aumento del componente monoclonal en el suero (267) o el porcentaje de CP clonales respecto a la población de CP policlonales (268) parecen jugar un papel relevante. El grupo de MM de la clínica Mayo propuso un modelo predictivo de progresión a MM considerando tres factores: que la cantidad de componente monoclonal fuera $\geq 1,5$ g/L, el tipo de Ig implicada (no-IgG) y la presencia de un *ratio* alterado de cadenas ligeras libres. La condición pre-maligna del MGUS, que puede perdurar durante décadas, lleva implícita evitar que los pacientes con MGUS reciban una quimioterapia / tratamiento innecesario. Sin embargo, sería interesante contar con un cada vez mayor número de biomarcadores que anticipen la progresión del MGUS y que pudieran ser beneficiarios de un tratamiento “anticipatorio”. En este sentido, la presencia y la permanencia de una intensidad media de expresión de CD29 constitutivo y una expresión suficiente de la forma activa indicarían una situación estable con un riesgo muy bajo de progresión a MM. Por el contrario, aunque en el MGUS el porcentaje de casos que expresan niveles alterados de CD29 es claramente inferior al observado en pacientes con MM, sí que se detectó un pequeño porcentaje de pacientes con MGUS que mostraron esta alteración desde el mismo momento de su diagnóstico, sugiriendo una futura progresión acelerada respecto al resto. Lógicamente, se necesita un seguimiento a medio y largo plazo de este pequeño porcentaje de pacientes con MGUS para constatar que la pérdida de expresión de CD29 puede estimular el paso desde MGUS a la condición maligna de la enfermedad. Un planteamiento similar podría aplicarse a los pacientes con MM *smoldering* (quiescente o asintomático).

Es particularmente destacable el resultado obtenido con las CP de MO de los pacientes con EEM, ya que conforman un tipo de CP que reside aún en el nicho medular y donde la expresión de CD29 se ha desplomado, diferenciándose de la anterior categoría de CP, ya caracterizada por una pérdida notable de la integrina. Es decir, una intensidad de expresión muy baja de CD29 en MO puede considerarse un preludio creíble de una futura EEM. La credibilidad de estos hallazgos fenotípicos se amplifica con los resultados

de los estudios funcionales, ya que las CP de MO de los pacientes con EEM mostraron tanto una capacidad de activación de la molécula CD29 tras la adición del Mn^{2+} como una capacidad de unión a FN aún perceptibles pero muy bajas.

A su vez, los resultados obtenidos en los pacientes con EEM son particularmente relevantes ya que es muy escaso el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el comportamiento biológico de las CP tumorales que infiltran tejidos blandos o, en general, territorios ajenos a la MO. Se considera que en los pacientes con EEM debe de haber una alteración en la vía de señalización mediada por CXCR4, dado el papel esencial de esta molécula en el *homing* y la expansión de las células de MM. Roccaro et al, en un modelo basado fundamentalmente en líneas celulares de MM, asocia la EEM a la sobreexpresión de CXCR4 en las células malignas y a un patrón transcripcional que marca una transición epitelial-mesenquimal (269). A su vez, se ha asociado la acumulación en el núcleo de p53 y las mutaciones en esta proteína con la progresión del MM hacia formas más agresivas de la enfermedad como el MM extramedular (270). También se han descrito alteraciones en moléculas de adhesión como CD44 o CD56 (271) asociadas a la evolución del MM hasta su etapa de EEM. Y, más recientemente, se ha demostrado en un modelo murino que la desaparición de VLA-4 en las células de MM mediante la técnica CRISPR/Cas9, redujo la enfermedad medular e incrementó la afectación extramedular (272). Nuestros resultados aportan nuevas claves para la comprensión del comportamiento del tumor, ya que indican que la pérdida continua de CD29, en sus dos estados, a lo largo de la evolución de la enfermedad, culmina con la más acusada de las pérdidas en la forma constitutiva y la desaparición literal de la forma activa en las células del LP. Estos hallazgos correlacionaron con la refractariedad total de la integrina para activarse *in vitro* y con una capacidad adhesiva a FN prácticamente inexistente. Estas alteraciones tan drásticas en la expresión y en la función de CD29 muy probablemente están asociadas al comportamiento biológico tan anómalo que estas células muestran *in vivo*. La primera de ellas se corresponde con el crecimiento en suspensión de las CP aberrantes del LP, la antítesis del comportamiento de una CP clonal o policlonal de MO, donde su fuerte anclaje a varios componentes del microambiente le confiere su naturaleza sésil. A su vez, la pérdida del anclaje a FN de las CP en el líquido pleural posiblemente justifique cambios tan acusados como los que se observan comúnmente en el tamaño de la célula tumoral. De hecho, son bien conocidas las características citológicas de las CP de MM en los pacientes con EEM (273). Aún así,

es muy probable que otros factores influyan en el tamaño de la célula (274) ya que, como observamos en nuestros experimentos, las CP tumorales que se mantienen en la MO no modifican su tamaño o, si lo hacen, no lo hacen de forma tan ostensible (datos no mostrados). A su vez, la pérdida cuantitativa y cualitativa de CD29 es posible que esté también relacionada con cambios en otras funciones celulares esenciales como son las diferentes modalidades de muerte celular y la proliferación (274, 275). En cierto modo, estos cambios tan radicales manifestados por las CP tumorales extramedulares ubican a la EEM en un terreno más próximo a un tumor proliferativo que a un tumor por acumulación.

En la literatura científica, la implicación de las $\beta 1$ integrinas en la progresión del MM puede parecer contradictoria, ya que mientras algunas publicaciones asocian la progresión con la pérdida de CD29, otras demuestran el mantenimiento o incluso la sobreexpresión de estas moléculas de adhesión como un evento importante en la progresión de la enfermedad (277). En realidad, esta paradoja parece apuntar hacia dos hechos diferenciados. El mantenimiento o incluso el aumento de la expresión está en concordancia con la resistencia al tratamiento, ya que la CP que está más fuertemente adherida a los diferentes elementos del microambiente de MO incrementa su resistencia a varios tipos de quimioterápicos (278), lo que conduce a la progresión de la enfermedad entendida como un mayor compromiso óseo (279). Este tipo de comportamiento podría asemejarse al de la extensión local de un tumor sólido (280). Por el contrario, la pérdida de expresión de la integrina conduciría a un comportamiento biológico y clínico asociado a la propagación de las CP a territorios ajenos a su asiento natural (281). Un comportamiento que en los tumores sólidos se asemejaría a las metástasis (282).

Para completar nuestro estudio, modificamos un protocolo de permeabilización ya descrito con el objeto de detectar en CP la proteína FAK fosforilada (283), con la idea de explorar por CF no solo la activación de CD29 por la vía *outside-in* (estímulo con cationes), sino también una proteína relacionada con la activación de las integrinas por la vía *inside-out*. Aunque los resultados son muy preliminares, se evidenció una intensidad de expresión mayor de FAK fosforilada en las CP con la intensidad mayor de CD29 MAR4.

Por otro lado, y respecto a la pérdida cuantitativa de CD29, observamos que un porcentaje significativo de pacientes con MM que expresaban bajos niveles de CD29

mantenían, sin embargo, niveles de expresión normales de CD49d (la cadena α que se une en mayor cuantía a la cadena β 1 en CP), y que estos pacientes expresaban niveles intermedios o altos de la integrina β 7. De los 8 tipos descritos de cadenas β , β 7 y β 1 son las únicas que pueden unir α 4 (CD49d) (284). Este resultado apuntaba hacia un balance en la expresión de ambas moléculas en este grupo de pacientes, de manera que la pérdida cuantitativa de β 1 (CD29) es compensada con una más alta expresión de β 7. En otras palabras, que la expresión génica de la cadena β 1 parece regular negativamente la expresión génica de β 7 (y viceversa). Hay que recordar que la expresión de β 7 y también de β 7 activada en las CP de MM está bien documentada (285, 286), pero no así su posible expresión balanceada respecto a β 1. Por lo tanto, este fenómeno no ha sido antes descrito en CP, aunque sí que está descrito como mecanismo compensatorio de la expresión de ambas cadenas β en tipos celulares muy concretos, tales como los linfocitos T CD4+ de ratón usados como modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental, similar a la esclerosis múltiple en humanos, donde la pérdida del gen de la β 1 (287) integrina se compensa con un aumento de la α L β 2 integrina (CD11a/CD18) y la β 7 integrina, aunque este aumento no tuvo ningún efecto en la imposibilidad que, en este modelo, manifiestan las células T para migrar al SNC. También en cardiomiocitos murinos se ha descrito este efecto compensatorio (288), de manera que la eliminación de la cadena β 1 en los miocitos en ratones knock-out, se tradujo en una clara sobre-expresión de β 7, sin que hubiera ningún efecto en la expresión de la cadena β 3, y con una desaparición casi completa de la funcionalidad del miocito, lo que condujo a una fibrosis cardiaca.

De igual manera que en los dos tipos celulares antes descritos la disminución (o la ausencia) de la cadena β 1 modificó propiedades funcionales de los mismos (cambio en el patrón de alojamiento y fibrosis, respectivamente), en las CP la disminución de β 1 (CD29), tanto a nivel constitutivo como activado, altera su capacidad de activación *in vitro* con cationes y reduce su capacidad de adhesión a FN, tal y como está descrito por nuestro grupo (289). Con los actuales resultados resultaba imperativo un nuevo abordaje experimental que tuviera en cuenta el incremento notable del nivel de la integrina β 7 en una fracción importante de los pacientes con MM que han experimentado en sus CP una *down-modulation* de la cadena β 1, y comprobamos que el aumento de β 7 no fue capaz de restaurar la eficacia activadora del Mn²⁺ ni tampoco la capacidad de unión a FN. Respecto a la activación mediada por cationes, el resultado obtenido fue el previsible ya que, al menos en nuestro conocimiento, en humanos no existen células primarias en las que se

haya demostrado que $\beta 1$ y $\beta 7$ establezcan algún tipo de interacción en la membrana que hubiera podido afectar a la capacidad activante de los cationes sobre $\beta 1$. Respecto a la unión a FN en los ensayos de adhesión, la población de CP de MM con fenotipo $\beta 7$ aumentada $\beta 1$ disminuido se unió a FN con menor potencia que la población de CP con fenotipo $\beta 7$ bajo $\beta 1$ intermedio. Habida cuenta que uno de los ligandos de $\alpha 4\beta 7$ es la FN (290), no era descartable que la elevada expresión de $\alpha 4\beta 7$ en esta población de CP alcanzara un vigor similar al de la población más común de CP con $\beta 7$ bajo y $\beta 1$ intermedio. Y aunque la capacidad bloqueante del anticuerpo anti- $\beta 7$ para inhibir la unión a FN fue, proporcionalmente, bastante mayor en las CP con un nivel más alto de $\beta 7$, la unión total a FN, como ya se ha mencionado, fue significativamente inferior. De hecho, los anticuerpos anti- $\beta 1$ manifestaban un efecto bloqueante superior a los anticuerpos que bloqueaban $\beta 7$. Este hecho es debido, con toda certeza, a la mayor afinidad que muestran las $\beta 1$ integrinas (en especial $\alpha 4\beta 1$) en su unión a FN respecto a las $\beta 7$ integrinas (en concreto, la $\alpha 4\beta 7$ integrina), documentado en multitud de tipos celulares (291).

Los resultados obtenidos con la expresión de las formas constitutiva y activa de CD29 en las CP como marcadores fenotípicos de progresión y su correspondencia como marcadores de funcionalidad (ensayos de activación y de adhesión a FN) nos indujo a explorar la expresión de las tetraspaninas, dada la interacción que la $\beta 1$ integrina establece en la membrana con este tipo de proteínas. Y nos centramos, casi en exclusiva, en CD9, por estar descrito un epítipo conformacionalmente activo (PAINS13) dependiente de la activación previa de CD29 (132).

CD9 en su forma constitutiva se expresó de forma muy variable en las CP normales y en las CP clonales tanto de pacientes con MGUS como con MM. La expresión de CD9 en las CP de MO ya fue descrita por Zandecki et al (292) y otros autores (293). En concreto, la variabilidad fue extrema en el caso de las CP de MM, y este resultado debe ser considerado en el caso de que CD9 quiera ser utilizada, como abogan algunos autores, como potencial diana terapéutica: un grupo minoritario de pacientes expresó CD9 en un porcentaje bajo de CP, mientras que, en otro grupo más numeroso, una población cercana al 50% tampoco lo expresó (259). Por lo tanto, y contrariamente a la terapia con anticuerpos anti-CD38, donde se tiene la absoluta certeza de la expresión del antígeno en la membrana de las CP (294), los AcMo anti-CD9 como futura terapia biológica deberá ir acompañada de un estudio de CF que etiquete a cada paciente dependiendo de la expresión alta, intermedia o baja de este antígeno. En cuanto a la asociación de CD9 y

CD29 en las CP, no hubo correlación porcentual, como cabía esperar dada la expresión cercana al 100% de CD29 y el porcentaje muy variable de expresión de CD9. Sin embargo, sí que se evidenció una correspondencia significativa en la intensidad de ambos antígenos. Como es bien sabido, la tetraspanina CD9 regula la activación de la integrina $\beta 1$ en numerosos tipos celulares (295, 296), de manera que la similitud en la intensidad de ambos antígenos posiblemente sea debido a la necesidad de la interacción entre ambas moléculas en la membrana. En cualquier caso, la correlación entre la intensidad de expresión de CD9 y CD29 se amplificó de forma sobresaliente cuando se incluyó el marcador CD81 en la estrategia de análisis: la expresión de CD29 fue débil en la población de CP CD9-CD81- y máxima en la población CD9+CD81+, con una intensidad intermedia en las poblaciones CD9-CD81+ y CD9+CD81-. Hay que recordar que las tetraspaninas no solo se asocian en la membrana con moléculas específicas tales como CD29, sino que también interaccionan entre ellas dando lugar a complejos multimoleculares que pueden tener una gran importancia en la formación de metástasis (297). Es por lo tanto plausible que en un grupo de pacientes con MM se establezca en la membrana de las CP una fuerte asociación entre CD9, CD81 y CD29, con implicaciones todavía desconocidas.

Las CP clonales expresaron el epítipo conformacional CD9 PAINS13, un epítipo expresado en la molécula CD9 que es dependiente de la activación previa de CD29 (132). Es, por lo tanto, un epítipo que vincula funcionalmente a ambas moléculas. El porcentaje de expresión de CD9 PAINS13 en las CP fue variable, desde aquellos casos en que los porcentajes de la forma constitutiva de CD9 y la forma CD9 PAINS13 fueron similares, hasta casos en que el porcentaje de CD9 constitutivo fue claramente superior al de la forma CD9 PAINS13. Esta forma de expresión no coincidió con el observado en otras poblaciones de MO: la expresión de CD9 PAINS corría paralela a la expresión constitutiva de CD9 tanto en la monopoiesis como en la mielopoiesis, alcanzando prácticamente el 100% de expresión en sus formas más maduras (monitos y neutrófilos, respectivamente) (297, 298). Este patrón de expresión no se reprodujo en las CP, la población más madura de la serie linfóide B. La naturaleza clonal de la población no parece ser la razón, pues este comportamiento también pudo ser visto en CP normales. Es posible que el hecho de que una parte importante de la maduración / diferenciación de la CP se haya producido en otros territorios pueda explicar esta diferencia. Constatamos que PAINS13 se comporta como un epítipo conformacional en las CP, como evidenciaba su

expresión dependiente de la temperatura, y también, de forma indirecta, su probable asociación con la cadena CD49f ($\alpha 6$). Sin embargo, en contraposición a lo descrito en la literatura, la expresión del epítipo conformacional CD9 PAINS13 no pareció depender de la activación previa de la integrina $\beta 1$, ya que no correlacionó con los niveles de expresión del epítipo HUTS21 ni se modificó en ensayos *in vitro* en los que se indujo la activación de CD29. A pesar de este resultado, no se descarta que la activación previa de CD29 sea necesaria para la exposición del epítipo PAINS13 en la molécula CD9, ya que puede ser otro el estímulo activante que actúe por una vía diferente a los cationes. Más probable es que la necesidad de la activación de CD29 como una etapa anterior a la aparición del epítipo conformacional CD9 PAINS13 esté asociado a ciertos tipos celulares y no a otros (300). De hecho, tal asociación se ha descrito solo en líneas celulares (ninguna correspondiendo con una línea de CP) y, en el caso de células primarias, tan solo en células T humanas activadas con mitógenos. Por último, la activación de las tetraspaninas depende con claridad del colesterol y otras moléculas presentes en la membrana citoplásmica, sin que los cationes hayan demostrado un papel relevante en dicha activación (119, 300).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión cuantitativa de la forma constitutiva de CD29 y la cuantía de la activación de esta molécula en las CP de las gammapatías monoclonales disminuye continuamente conforme progresa la enfermedad.
2. Dicha disminución está acompañada por la incapacidad progresiva de CD29 para activarse en presencia de cationes y por una reducción creciente de su unión FN
3. La refractariedad a la activación por cationes y la incapacidad de unión a FN fueron máximas en la EEM, la etapa más avanzada de la enfermedad.
4. La reducción tanto de la expresión de la forma constitutiva de CD29, en términos cuantitativos, como de la activación de esta molécula, pueden ser considerados como biomarcadores de la progresión de la enfermedad.
5. La pérdida de expresión de CD29 en un bloque de pacientes con MM es contrarrestada por un aumento de expresión de la integrina $\beta 7$.
6. Este aumento de expresión de $\beta 7$ no corrigió la incapacidad de CD29 para activarse mediante Mn^{2+} ni mejoró la adhesión a FN.
7. La tetraspanina CD9 en su forma constitutiva se expresa de forma variable en las CP de MO, tanto normales como clonales, correlacionando con la intensidad de expresión de la $\beta 1$ integrina (CD29) en su forma constitutiva.
8. La expresión de la tetraspanina CD81 junto a CD9 amplifica el nivel de expresión de la forma constitutiva de CD29.
9. La molécula CD9 de las CP clonales de MO expresan en porcentaje variable el epítipo conformacional PAINS13.
10. Las formas más maduras de las series granulocítica y monocítica de MO expresaron en su práctica totalidad el epítipo PAINS13, en contraste con la expresión desigual observada en la etapa de máxima madurez del linaje B, la CP, sugiriendo vías distintas de regulación.

11. El epítipo conformacional CD9 PAINS13 en CP de MO es dependiente de temperatura, está asociado a una expresión intermedia-alta de CD49f y no fue dependiente de cationes.

12. La regulación antes descrita del epítipo CD9 PAINS13, así como la absoluta ausencia de correlación entre los niveles de este epítipo y los niveles de la β 1 integrina (CD29) en sus formas constitutiva o activada (epítipo conformacional HUTS21), sugieren mecanismos de regulación distintos en los cambios conformacionales de CD9 y CD29.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lindquist RL, Niesner RA, Hauser AE. In the Right Place, at the Right Time: Spatiotemporal Conditions Determining Plasma Cell Survival and Function. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 3];10:788. Available from: [/pmc/articles/PMC6491733/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3491733/)
2. Moran I, Nguyen A, Khoo WH, Butt D, Bourne K, Young C, et al. Memory B cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes. *Nat Commun* 2018 91 [Internet]. 2018 Aug 22 [cited 2022 Aug 3];9(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05772-7>
3. Chen TT, Tsai MH, Kung JT, Lin KI, Decker T, Lee CK. STAT1 regulates marginal zone B cell differentiation in response to inflammation and infection with blood-borne bacteria. *J Exp Med* [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2022 Aug 4];213(13):3025–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27849553/>
4. Radtke D, Bannard O. Expression of the plasma cell transcriptional regulator Blimp-1 by dark zone germinal center B cells during periods of proliferation. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):3106.
5. Popi AF, Longo-Maugéri IM, Mariano M. An Overview of B-1 Cells as Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Apr 11 [cited 2022 Aug 4];7(APR):138. Available from: [/pmc/articles/PMC4827000/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27849553/)
6. Malkiel S, Barlev AN, Atisha-Fregoso Y, Suurmond J, Diamond B. Plasma cell differentiation pathways in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2018 Mar 5;9(MAR):427.
7. Auner HW, Beham-Schmid C, Dillon N, Sabbattini P. The life span of short-lived plasma cells is partly determined by a block on activation of apoptotic caspases acting in combination with endoplasmic reticulum stress. *Blood* [Internet]. 2010 Nov 4 [cited 2020 Sep 26];116(18):3445–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20651073/>
8. Liu X, Zhao Y, Qi H. T-independent antigen induces humoral memory through germinal centers. *J Exp Med* [Internet]. 2022 Jan 12 [cited 2022 Aug 4];219(3).

Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20210527>

9. Jenks SA, Cashman KS, Woodruff MC, Lee FEH, Sanz I. Extrafollicular responses in humans and SLE. *Immunol Rev* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Aug 4];288(1):136. Available from: </pmc/articles/PMC6422038/>
10. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Aug 4];288(1):64–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12751>
11. Sang A, Niu H, Cullen J, Choi SC, Zheng YY, Wang H, et al. Activation of Rheumatoid Factor–Specific B Cells Is Antigen Dependent and Occurs Preferentially Outside of Germinal Centers in the Lupus-Prone NZM2410 Mouse Model. *J Immunol* [Internet]. 2014 Aug 15 [cited 2022 Aug 5];193(4):1609–21. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/193/4/1609>
12. Paus D, Tri GP, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Apr 17 [cited 2020 Sep 26];203(4):1081–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16606676/>
13. Kuraoka M, Schmidt AG, Nojima T, Feng F, Watanabe A, Kitamura D, et al. Complex Antigens Drive Permissive Clonal Selection in Germinal Centers. *Immunity* [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2022 Aug 5];44(3):542–52. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761316300486/fulltext>
14. Weisel FJ, Zuccarino-Catania G V., Chikina M, Shlomchik MJ. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity*. 2016 Jan 19;44(1):116–30.
15. Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the germinal center response. *Front Immunol*. 2018 Oct 25;9(OCT):2469.
16. Tangye SG, Ma CS. Regulation of the germinal center and humoral immunity by interleukin-21. *J Exp Med* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Aug 6];217(1). Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20191638>

17. Huse K, Wogslund CE, Polikowsky HG, Diggins KE, Smeland EB, Myklebust JH, et al. Human Germinal Center B Cells Differ from Naïve and Memory B Cells in CD40 Expression and CD40L-Induced Signaling Response. *Cytom Part A* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Aug 6];95(4):442–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.23737>
18. Nadeau S, Martins GA. Conserved and Unique Functions of Blimp1 in Immune Cells. *Front Immunol*. 2022 Jan 27;12:5856.
19. Quwaider D, Corchete LA, Misiewicz-Krzeminska I, Sarasquete ME, Pérez JJ, Krzeminski P, et al. DEPTOR maintains plasma cell differentiation and favorably affects prognosis in multiple myeloma. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2017 Apr 18 [cited 2022 Aug 6];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5395780/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2750780/)
20. Hodson DJ, Shaffer AL, Xiao W, Wright GW, Schmitz R, Phelan JD, et al. Regulation of normal B-cell differentiation and malignant B-cell survival by OCT2. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Apr 5 [cited 2022 Aug 6];113(14):E2039–46. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1600557113>
21. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2022 Aug 28];169(3):1277–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12133949/>
22. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Jul 2 [cited 2022 Aug 28];194(1):45–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11435471/>
23. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2022 Aug 28];105(4):1614–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15507523/>

24. Slamanig SA, Nolte MA. The Bone Marrow as Sanctuary for Plasma Cells and Memory T-Cells: Implications for Adaptive Immunity and Vaccinology. *Cells* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Aug 9];10(6). Available from: [/pmc/articles/PMC8232593/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348232593/)
25. Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, Zhang Y, Niesner R, Hauser AE. Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytometry A* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 9];85(1):15–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24700574/>
26. Wilmore JR, Gaudette BT, Gómez Atria D, Rosenthal RL, Reiser SK, Meng W, et al. IgA Plasma Cells Are Long-Lived Residents of Gut and Bone Marrow That Express Isotype- and Tissue-Specific Gene Expression Patterns. *Front Immunol*. 2021 Dec 24;12:5571.
27. Aaron TS, Fooksman DR. Dynamic organization of the bone marrow plasma cell niche. *FEBS J* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2022 Aug 9];289(14):4228–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.16385>
28. Bonnaure G, Gervais-St-Amour C, Néron S. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhance the Differentiation of Human Switched Memory B Lymphocytes into Plasma Cells in Serum-Free Medium. *J Immunol Res* [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 28];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27872867/>
29. Benet Z, Jing Z, Fooksman DR. Plasma cell dynamics in the bone marrow niche. *Cell Rep*. 2021 Feb 9;34(6):108733.
30. Li YF, Xu S, Ou X, Lam KP. Shp1 signalling is required to establish the long-lived bone marrow plasma cell pool. *Nat Commun*. 2014;5.
31. Good-Jacobson KL, O'Donnell K, Belz GT, Nutt SL, Tarlinton DM. c-Myb is required for plasma cell migration to bone marrow after immunization or infection. *J Exp Med* [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2020 Sep 28];212(7):1001–9. Available from: [/pmc/articles/PMC4493410/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264493410/?report=abstract)
32. Calvi LM, Link DC. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2022 Aug 10];94(1):112–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24101231/>

33. Benova A, Tencerova M. Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 May 12;11:294.
34. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2013 May [cited 2020 Sep 28];15(5):533–43. Available from: </pmc/articles/PMC4156024/?report=abstract>
35. Ramasamy SK. Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone [Internet]. Vol. 2017, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2017 [cited 2022 Aug 10]. Available from: </pmc/articles/PMC5623774/>
36. Comazzetto S, Shen B, Morrison SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell*. 2021 Jul 12;56(13):1848–60.
37. Gao Q, Wang L, Wang S, Huang B, Jing Y, Su J. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Identification, Classification, and Differentiation. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Jan 3;9:3558.
38. Tamma R, Ribatti D. Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jan 13 [cited 2022 Aug 10];18(1). Available from: </pmc/articles/PMC5297784/>
39. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell* [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2022 Aug 11];177(7):1915. Available from: </pmc/articles/PMC6570562/>
40. Nombela-Arrieta C, Isringhausen S. The role of the bone marrow stromal compartment in the hematopoietic response to microbial infections. *Front Immunol*. 2017 Jan 20;7(JAN):689.
41. Nguyen DC, Garimalla S, Xiao H, Kyu S, Albizua I, Galipeau J, et al. Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. *Nat Commun* 2018 91 [Internet]. 2018 Sep 12 [cited 2022 Aug 11];9(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05853-7>

42. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol*. 2019 Apr 5;0:721.
43. Belnoue E, Tougne C, Rochat A-F, Lambert P-H, Pinschewer DD, Siegrist C-A. Homing and Adhesion Patterns Determine the Cellular Composition of the Bone Marrow Plasma Cell Niche. *J Immunol* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2020 Oct 8];188(3):1283–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22262758/>
44. Nguyen DC, Joyner CJ, Sanz I, Lee FEH. Factors Affecting Early Antibody Secreting Cell Maturation Into Long-Lived Plasma Cells. *Front Immunol*. 2019 Sep 11;10:2138.
45. Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* [Internet]. 2014 Apr 17 [cited 2020 Oct 8];40(4):582–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24745334/>
46. Winter O, Moser K, Mohr E, Zotos D, Kaminski H, Szyska M, et al. Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 16 [cited 2020 Oct 8];116(11):1867–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20538807/>
47. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, Tougne C, Rochat AF, Bossen C, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2020 Oct 8];111(5):2755–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18180376/>
48. Matthes T, Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber M-L, Krause K-H, Donze O, Passweg J, et al. Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* [Internet]. 2011 Aug 18 [cited 2020 Oct 8];118(7):1838–44. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/118/7/1838/29716/Production-of-the-plasmacell-survival-factor-a>

49. Gomez MR, Talke Y, Goebel N, Hermann F, Reich B, Mack M. Basophils Support the Survival of Plasma Cells in Mice. *J Immunol* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2020 Oct 8];185(12):7180–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21068399/>
50. Rozanski CH, Utley A, Carlson LM, Farren MR, Murray M, Russell LM, et al. CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J Immunol* [Internet]. 2015 May 15 [cited 2020 Oct 8];194(10):4717–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25833397/>
51. Wols HAM, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The Role of Bone Marrow-Derived Stromal Cells in the Maintenance of Plasma Cell Longevity. *J Immunol* [Internet]. 2002 Oct 15 [cited 2020 Oct 8];169(8):4213–21. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/169/8/4213><http://www.jimmunol.org/content/169/8/4213.full#ref-list-1>
52. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2006 Jun [cited 2020 Oct 8];18(3):265–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16616478/>
53. Geffroy-luseau A, Jégo G, Bataille R, Campion L, Pellat-deceunynck C. Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. *Int Immunol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Oct 8];20(6):775–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18397910/>
54. Chu VT, Enghard P, Schürer S, Steinhauser G, Rudolph B, Riemekasten G, et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2009 Jul [cited 2020 Oct 8];60(7):2083–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19565488/>
55. Wilmore JR, Allman D. Here, there, and anywhere? Arguments for and against the physical plasma cell survival niche. *J Immunol* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2022 Aug 11];199(3):839. Available from: [/pmc/articles/PMC5651088/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811111/)

56. Nowacka KH, Jabłońska E. Role of the APRIL molecule in solid tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021 Oct 1;61:38–44.
57. Jellusova J, Cancro MP, Eibel H. Editorial overview: BAFF family ligands and receptors – a license to live. *Curr Opin Immunol.* 2021 Aug;71:vii–ix.
58. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of long-lived plasma cells (LLPC): Piecing together the puzzle. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):965.
59. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Mar 27 [cited 2020 Oct 9];104(13):5431–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17374716/>
60. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2022 Jul 18];251(1):177–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12011>
61. García-Ortiz A, Rodríguez-García Y, Encinas J, Maroto-Martín E, Castellano E, Teixidó J, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 217 [Internet]. 2021 Jan 9 [cited 2022 Aug 16];13(2):217. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/2/217/htm>
62. Su CY, Li JQ, Zhang LL, Wang H, Wang FH, Tao YW, et al. The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Front Pharmacol.* 2020 Sep;11:1435.
63. Holmes RS, Rout UK. Comparative Studies of Vertebrate Beta Integrin Genes and Proteins: Ancient Genes in Vertebrate Evolution. *Biomol* 2011, Vol 1, Pages 3–31 [Internet]. 2011 Aug 23 [cited 2022 Aug 16];1(1):3–31. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/1/1/3/htm>
64. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* [Internet]. 1995 Sep [cited 2022 Aug 16];130(5):1181–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7657702/>

65. Wennerberg K, Armulik A, Sakai T, Karlsson M, Fässler R, Schaefer EM, et al. The Cytoplasmic Tyrosines of Integrin Subunit $\beta 1$ Are Involved in Focal Adhesion Kinase Activation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2020 Nov 9];20(15):5758–65. Available from: [/pmc/articles/PMC86053/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11546839/)
66. Reddy KB, Smith DM, Plow EF. Analysis of fyn function in hemostasis and $\alpha 1 \beta 3$ -integrin signaling. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2020 Nov 9];121(10):1641–8. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/121/10/1641/DC1>
67. Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces. *Mol Cell*. 2008 Dec 26;32(6):849–61.
68. Takada Y, Elices MJ, Crouse C, Hemler ME. The primary structure of the 4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. Vol. 8, *The EMBO Journal*. 1989.
69. Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V \beta 3$. *Science* (80-) [Internet]. 2001 Oct 12 [cited 2020 Nov 5];294(5541):339–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11546839/>
70. Thinn AMM, Wang Z, Zhu J. The membrane-distal regions of integrin α cytoplasmic domains contribute differently to integrin inside-out activation. *Sci Rep*. 2018;8(1).
71. Alon R, Feigelson SW, Manevich E, Rose DM, Schmitz J, Overby DR, et al. $\alpha 4 \beta 1$ -dependent adhesion strengthening under mechanical strain is regulated by paxillin association with the $\alpha 4$ -cytoplasmic domain. *J Cell Biol* [Internet]. 2005 Dec 19 [cited 2020 Nov 9];171(6):1073–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16365170/>
72. Rose DM. The role of the $\alpha 4$ integrin-paxillin interaction in regulating leukocyte trafficking. *Exp Mol Med* [Internet]. 2006 Jun 30 [cited 2020 Nov 6];38(3):191–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/emm200623>

73. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site. *Cell* [Internet]. 1990 Feb 23 [cited 2020 Nov 9];60(4):577–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1689216/>
74. Clements JM, Newham P, Shepherd M, Gilbert R, Dudgeon TJ, Needham LA, et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J Cell Sci* [Internet]. 1994 Aug [cited 2022 May 15];107 (Pt 8):2127–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7527054/>
75. Wayner EA, Garcia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* [Internet]. 1989 Sep 1 [cited 2020 Nov 9];109(3):1321–30. Available from: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/109/3/1321/1058349/1321.pdf>
76. Bayless KJ, Meininger GA, Scholtz JM, Davis GE. Osteopontin is a ligand for the $\alpha 4 \beta 1$ integrin. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 9):1165–74.
77. Bridges LC, Sheppard D, Bowditch RD. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins $\alpha 4 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 7$. *Biochem J* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2020 Nov 11];387(1):101–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15504110/>
78. Humphries JD, Humphries MJ. CD14 is a ligand for the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *FEBS Lett*. 2007 Feb 20;581(4):757–63.
79. El Nemer W, Wautier MP, Rahuel C, Gane P, Hermand P, Galactéros F, et al. Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cell $\alpha 4 \beta 1$ integrin: Role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. *Blood* [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2020 Nov 11];109(8):3544–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17158232/>
80. Altevogt P, Hubbe M, Ruppert M, Lohr J, Von Hoegen P, Sammar M, et al. The $\alpha 4$ integrin chain is a ligand for $\alpha 4 \beta 7$ and $\alpha 4 \beta 1$. *J Exp Med* [Internet]. 1995 Aug

- 1 [cited 2020 Nov 9];182(2):345–55. Available from:
[/pmc/articles/PMC2192118/?report=abstract](#)
81. Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem*. 1991;266(23).
82. Li J, Su Y, Xia W, Qin Y, Humphries MJ, Vestweber D, et al. Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. *EMBO J* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2022 Jul 18];36(5):629. Available from:
[/pmc/articles/PMC5331762/](#)
83. Michael M, Parsons M. New perspectives on integrin-dependent adhesions. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Aug 16];63:31–7. Available from: [/pmc/articles/PMC7262580/](#)
84. Zhang K, Chen JF. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2022 Jul 18];6(1):20. Available from:
[/pmc/articles/PMC3364134/](#)
85. Luque A, Gómez M, Puzon W, Takada Y, Sánchez-Madrid F, Cabañas C. Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common $\beta 1$ chain. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 May 10 [cited 2022 Aug 27];271(19):11067–75. Available from:
<http://www.jbc.org/article/S0021925817469584/fulltext>
86. Pagani G, Gohlke H. On the contributing role of the transmembrane domain for subunit-specific sensitivity of integrin activation. *Sci Reports* 2018 81 [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2022 Aug 16];8(1):1–14. Available from:
<https://www.nature.com/articles/s41598-018-23778-5>
87. Critchley DR. Biochemical and Structural Properties of the Integrin-Associated Cytoskeletal Protein Talin. <http://dx.doi.org/101146/annurev.biophys.050708133744> [Internet]. 2009 May 5 [cited 2022 May 15];38(1):235–54. Available from:

- <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biophys.050708.133744>
88. Gough RE, Jones MC, Zacharchenko T, Le S, Yu M, Jacquemet G, et al. Talin mechanosensitivity is modulated by a direct interaction with cyclin-dependent kinase-1. *J Biol Chem*. 2021 Jul 1;297(1):100837.
 89. Calderwood DA, Yan B, De Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, et al. The Phosphotyrosine Binding-like Domain of Talin Activates Integrins *. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jun 14 [cited 2022 May 15];277(24):21749–58. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820704333/fulltext>
 90. Calderwood DA, Fujioka Y, De Pereda JM, García-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, et al. Integrin β cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: A structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Mar 4 [cited 2022 May 15];100(5):2272–7. Available from: </pmc/articles/PMC151330/>
 91. Zhou DW, Fernández-Yagüe MA, Holland EN, García AF, Castro NS, O’Neill EB, et al. Force-FAK signaling coupling at individual focal adhesions coordinates mechanosensing and microtissue repair. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 16];12(1):[13 p.]. Available from: </pmc/articles/PMC8060400/>
 92. Wynne JP, Wu J, Su W, Mor A, Patsoukis N, Boussiotis VA, et al. Rap1-interacting adapter molecule (RIAM) associates with the plasma membrane via a proximity detector. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2022 May 15];199(2):317–30. Available from: </pmc/articles/PMC3471229/>
 93. Goult BT, Brown NH, Schwartz MA. Talin in mechanotransduction and mechanomemory at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2022 Aug 16];134(20). Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/134/20/jcs258749/272649/Talin-in-mechanotransduction-and-mechanomemory-at>
 94. Luo B-H, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2006 [cited 2022 May 15];18:1–8. Available from: www.sciencedirect.com

95. Plow EF, Qin J. The Kindlin Family of Adapter Proteins: A Past, Present and Future Prospectus. *Circ Res* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Aug 16];124(2):202–4. Available from: [/pmc/articles/PMC6400466/](#)
96. Lu L, Lin CD, Yan ZJ, Wang S, Zhang YH, Wang SH, et al. Kindlin-3 Is Essential for the Resting $\alpha 4\beta 1$ Integrin-mediated Firm Cell Adhesion under Shear Flow Conditions. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 May 5 [cited 2022 Aug 16];291(19):10363–71. Available from: [/pmc/articles/PMC4858982/](#)
97. Scott DW, Patel RP. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology* [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 May 16];23(6):622–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23445551/>
98. Gu J, Isaji T, Sato Y, Kariya Y, Fukuda T. Importance of N-glycosylation on $\alpha 5\beta 1$ integrin for its biological functions. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2009 May [cited 2022 May 16];32(5):780–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19420742/>
99. Isaji T, Sato Y, Zhao Y, Miyoshi E, Wada Y, Taniguchi N, et al. N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin $\alpha 5$ subunit is essential for $\alpha 5\beta 1$ heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Nov 3 [cited 2022 May 16];281(44):33258–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16959765/>
100. Sato Y, Isaji T, Tajiri M, Yoshida-Yamamoto S, Yoshinaka T, Somehara T, et al. An N-glycosylation site on the beta-propeller domain of the integrin $\alpha 5$ subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by $\beta 1,4$ -N-acetylglucosaminyltransferase III. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2022 May 16];284(18):11873–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19276077/>
101. Ranjan A, Bane SM, Kalraiya RD. Glycosylation of the laminin receptor ($\alpha 3\beta 1$) regulates its association with tetraspanin CD151: Impact on cell spreading, motility, degradation and invasion of basement membrane by tumor cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2022 May 16];322(2):249–64. Available

- from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530578/>
102. Cai X, Thinn AMM, Wang Z, Shan H, Zhu J. The importance of N-glycosylation on $\beta 3$ integrin ligand binding and conformational regulation. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 May 16];7(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5498496/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530578/)
 103. Suzuki O, Abe M, Hashimoto Y. Sialylation and glycosylation modulate cell adhesion and invasion to extracellular matrix in human malignant lymphoma: Dependency on integrin and the Rho GTPase family. *Int J Oncol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 May 16];47(6):2091–9. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2015.3211/abstract>
 104. Freed E, Gailit J, Van der Geer P, Ruoslahti E, Hunter T. A novel integrin beta subunit is associated with the vitronectin receptor alpha subunit (alpha v) in a human osteosarcoma cell line and is a substrate for protein kinase C. *EMBO J* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 16];8(10):2955–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2479539/>
 105. Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* [Internet]. 1991 Nov 1 [cited 2022 May 16];174(5):1227–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1682411/>
 106. Kirk RI, Sanderson MR, Lerea KM. Threonine phosphorylation of the beta 3 integrin cytoplasmic tail, at a site recognized by PDK1 and Akt/PKB in vitro, regulates Shc binding. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Oct 6 [cited 2022 May 16];275(40):30901–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10896934/>
 107. Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, et al. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 [cited 2022 May 16];3(12):1060–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11781567/>

108. Dong Cho Han, Rodriguez LG, Guan JL. Identification of a novel interaction between integrin beta1 and 14-3-3beta. *Oncogene* [Internet]. 2001 Jan 18 [cited 2022 May 16];20(3):346–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11313964/>
109. Fagerholm SC, Hilden TJ, Nurmi SM, Gahmberg CG. Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biol* [Internet]. 2005 Nov 21 [cited 2022 May 16];171(4):705–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16301335/>
110. Lerea KM, Venjara AY, Olson SC, Kelly MR. Threonine phosphorylation of integrin beta3 in calyculin A-treated platelets is selectively sensitive to 5'-iodotubercidin. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007 Feb [cited 2022 May 16];1773(2):185–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17052767/>
111. Zucchetto A, Caldana C, Benedetti D, Tissino E, Rossi FM, Hutterer E, et al. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 16];122(19):3317–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24068493/>
112. Charrin S, Le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2022 Jul 18];420(2):133–54. Available from: </biochemj/article/420/2/133/44876/Lateral-organization-of-membrane-proteins>
113. de Winde CM, Zuidsherwoude M, Vasaturo A, van der Schaaf A, Figdor CG, van Spriel AB. Multispectral imaging reveals the tissue distribution of tetraspanins in human lymphoid organs. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2022 May 21];144(2):133–46. Available from: </pmc/articles/PMC4522275/>
114. Lang T, Hochheimer N. Tetraspanins. *Curr Biol* [Internet]. 2020 Mar 9 [cited 2022 Jul 18];30(5):R204–6. Available from: <http://www.cell.com/article/S0960982220300075/fulltext>

115. van Spriël AB, Figdor CG. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* 2010 Feb 1;12(2):106–12.
116. Healy EF. How tetraspanin-mediated cell entry of SARS-CoV-2 can dysregulate the shedding of the ACE2 receptor by ADAM17. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Feb 19;593:52–6.
117. Reppert N, Lang T. A conserved sequence in the small intracellular loop of tetraspanins forms an M-shaped inter-helix turn. *Sci Reports* 2022 121 [Internet]. 2022 Mar 16 [cited 2022 Jul 19];12(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-07243-y>
118. Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, et al. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J* [Internet]. 2001 Jan 15 [cited 2022 Jul 18];20(1–2):12–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/emboj/20.1.12>
119. Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, et al. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell.* 2016 Nov 3;167(4):1041-1051.e11.
120. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Jul 19];127(17):3641–8. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/127/17/3641/54544/Tetraspanins-at-a-glance>
121. Van Deventer SJ, Dunlock VME, Van Spriël AB. Molecular interactions shaping the tetraspanin web. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2022 Jul 19];45(3):741–50. Available from: </biochemsoctrans/article/45/3/741/66969/Molecular-interactions-shaping-the-tetraspanin-web>
122. Zuidschewoude M, Göttfert F, Dunlock VME, Figdor CG, Van Den Bogaart G, Van Spriël AB. The tetraspanin web revisited by super-resolution microscopy. *Sci Reports* 2015 51 [Internet]. 2015 Jul 17 [cited 2022 Jul 19];5(1):1–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep12201>

123. Rocha-Perugini V, Sánchez-Madrid F, Del Hoyo GM. Function and dynamics of tetraspanins during antigen recognition and immunological synapse formation. *Front Immunol.* 2016;6(JAN):653.
124. Qin Y, Mohandessi S, Gordon L, Wadehra M. Regulation of FAK Activity by Tetraspan Proteins: Potential Clinical Implications in Cancer. *Crit Rev Oncog [Internet].* 2015 [cited 2022 Jul 19];20(5–6):391–405. Available from: [/pmc/articles/PMC5390008/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33428143/)
125. Peng D, Li P cheng, Liu T, Zeng H song, Fei Y jie, Liu Z xiang, et al. Key Role of CD151-integrin Complex in Lung Cancer Metastasis and Mechanisms Involved. *Curr Med Sci [Internet].* 2020 Dec 1 [cited 2022 Jul 19];40(6):1148–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33428143/>
126. Lazareth H, Henique C, Lenoir O, Puelles VG, Flamant M, Bollée G, et al. The tetraspanin CD9 controls migration and proliferation of parietal epithelial cells and glomerular disease progression. *Nat Commun.* 2019 Dec 1;10(1).
127. Umeda R, Satouh Y, Takemoto M, Nakada-Nakura Y, Liu K, Yokoyama T, et al. Structural insights into tetraspanin CD9 function. *Nat Commun.* 2020;11(1).
128. Cohen J, Wang L, Marques S, Ialy-Radio C, Barbaux S, Lefèvre B, et al. Oocyte ERM and EWI Proteins Are Involved in Mouse Fertilization. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10.
129. Fu C, Zhang Q, Wang A, Yang S, Jiang Y, Bai L, et al. EWI-2 controls nucleocytoplasmic shuttling of EGFR signaling molecules and miRNA sorting in exosomes to inhibit prostate cancer cell metastasis. *Mol Oncol.* 2021;15(5):1543–65.
130. Mazurov D, Barbashova L, Filatov A. Tetraspanin protein CD9 interacts with metalloprotease CD10 and enhances its release via exosomes. *FEBS J.* 2013;280(5):1200–13.
131. Wang HX, Kolesnikova T V., Denison C, Gygi SP, Hemler ME. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J Cell Sci.* 2011;124(16):2702–10.

132. Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Yáñez-Mó M, Sánchez-Sánchez N, Rubinstein E, Olmo N, et al. A Functionally Relevant Conformational Epitope on the CD9 Tetraspanin Depends on the Association with Activated β 1Integrin. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):208–18.
133. Reyes R, Cardeñes B, Machado-Pineda Y, Cabañas C. Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
134. Böker KO, Lemus-Diaz N, Rinaldi Ferreira R, Schiller L, Schneider S, Gruber J. The Impact of the CD9 Tetraspanin on Lentivirus Infectivity and Exosome Secretion. *Mol Ther*. 2018;26(2):634–47.
135. Khushman M, Patel GK, Laurini JA, Bhardwaj A, Roveda K, Donnell R, et al. Exosomal markers (CD63 and CD9) expression and their prognostic significance using immunohistochemistry in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2019;10(4):695–702.
136. Yoon SO, Zhang X, Lee IY, Spencer N, Vo P, Choi YS. CD9 is a novel marker for plasma cell precursors in human germinal centers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(1):41–6.
137. Brosseau C, Colas L, Magnan A, Brouard S. CD9 tetraspanin: A new pathway for the regulation of inflammation? *Front Immunol*. 2018;9.
138. Brosseau C, Durand M, Colas L, Durand E, Foureau A, Cheminant MA, et al. CD9+ Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients. *Front Immunol*. 2018;9.
139. Yoon SO, Zhang X, Freedman AS, Zahrieh D, Lossos IS, Li L, et al. Down-Regulation of CD9 Expression and its Correlation to Tumor Progression in B Lymphomas. *Am J Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 24];177(1):377–86. Available from: /pmc/articles/PMC2893680/
140. Dong T, Liu Z, Zhao S, Hu C, Liu Y, Ma WJ, et al. The expression of CD9 and PIK3CD is associated with prognosis of follicular lymphoma. *J Cancer*. 2015;6(12):1222–9.
141. Xing C, Xu W, Shi Y, Zhou B, Wu D, Liang B, et al. CD9 knockdown

- suppresses cell proliferation, adhesion, migration and invasion, while promoting apoptosis and the efficacy of chemotherapeutic drugs and imatinib in Ph+ALL SUP-B15 cells. *Mol Med Rep.* 2020;22(4):2791–800.
142. Yang B, Hall CL, Yang BL, Savani RC, Turley EA. Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biochem.* 1994;56(4):455–68.
143. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* (80-) [Internet]. 1996 Jan 26 [cited 2020 Oct 28];271(5248):509–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8560266/>
144. Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Habuchi H, Tobita Y, Kimata K, Miyasaka M. Widespread expression of chondroitin sulfate-type serglycins with CD44 binding ability in hematopoietic cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Oct 17 [cited 2020 Oct 28];272(42):26714–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9334256/>
145. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CAG, et al. Osteopontin Modulates CD44-Dependent Chemotaxis of Peritoneal Macrophages Through G-Protein-Coupled Receptors: Evidence of a Role for an Intracellular Form of Osteopontin. *J Cell Physiol.* 2004 Jan;198(1):155–67.
146. Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* [Internet]. 1992 [cited 2020 Oct 28];116(3):817–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1730778/>
147. Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: Correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* [Internet]. 1994 Aug 1 [cited 2020 Oct 28];160(2):275–86. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.1041600209>
148. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2020 Oct 28];13(1):35–48. Available from:

- [/pmc/articles/PMC316376/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC316376/?report=abstract)
149. Van Driel M, Günthert U, Stauder R, Joling P, Lokhorst HM, Bloem AC. CD44 isoforms distinguish between bone marrow plasma cells from normal individuals and patients with multiple myeloma at different stages of disease. *Leukemia* [Internet]. 1998 Oct 22 [cited 2020 Oct 29];12(11):1821–8. Available from: <http://www.stockton-press.co.uk/leu>
 150. Vincent I, Mehti N. IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia* [Internet]. 2004 Mar 11 [cited 2020 Oct 29];18(5):967–75. Available from: www.nature.com/leu
 151. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol*. 1986;137(4):1270–4.
 152. Tohma S, Hirohata S, Lipsky PE. The role of CD11a/CD18-CD54 interactions in human T cell-dependent B cell activation. *J Immunol*. 1991;146(2):492–9.
 153. Figenschau SL, Knutsen E, Urbarova I, Fenton C, Elston B, Perander M, et al. ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):11720.
 154. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Pérez JJ, Puig N, Paiva B, et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytom Part B - Clin Cytom* [Internet]. 2016 [cited 2020 Oct 29];90(1):91–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26130131/>
 155. Veitonmäki N, Hansson M, Zhan F, Sundberg A, Löfstedt T, Ljungars A, et al. A human ICAM-1 antibody isolated by a function-first approach has potent macrophage-dependent antimyeloma activity in vivo. *Cancer Cell*. 2013 Apr 15;23(4):502–15.
 156. Klausz K, Burger R, Kellner C, Guenther A, Peipp M, Gramatzki M. The Novel ADCC-Optimized Human CD54 (ICAM-1) Antibody MSH-TP15e Has Potent Anti-Myeloma Activity. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):4471–4471.

157. Hall J, Adesanya MA, Madden LA, Maraveyas A. PO-30 - Changes in soluble CD106 and CD54 serum levels during chemotherapy treatment for multiple myeloma. *Thromb Res.* 2016 Apr 1;140:S187.
158. Qiu H, Shi S, Yue J, Xin M, Nairn A V., Lin L, et al. A mutant-cell library for systematic analysis of heparan sulfate structure-function relationships. *Nat Methods* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Jul 20];15(11):889–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30377379/>
159. Jang B, Jung H, Hong H, Oh ES. Syndecan transmembrane domain modulates intracellular signaling by regulating the oligomeric status of the cytoplasmic domain. *Cell Signal* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Jul 20];52:121–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30195038/>
160. McCarron MJ, Park PW, Fooksman DR. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood* [Internet]. 2017 May 18 [cited 2022 Jul 20];129(20):2749–59. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/129/20/2749/36120/CD138-mediates-selection-of-mature-plasma-cells-by>
161. Couchman JR. Syndecan-1 (CD138), Carcinomas and EMT. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2022 Jul 20];22(8):4227. Available from: </pmc/articles/PMC8072910/>
162. Fooksman DR, Mazumder A, McCarron M. CD138 Regulates Myeloma Cell Survival, Proliferation, BM Engraftment and Tumor Organization. *Blood* [Internet]. 2015 Dec 3 [cited 2022 Jul 20];126(23):2974–2974. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/126/23/2974/135273/CD138-Regulates-Myeloma-Cell-Survival>
163. Yu T, Chaganty B, Lin L, Xing L, Ramakrishnan B, Wen K, et al. VIS832, a novel CD138-targeting monoclonal antibody, potently induces killing of human multiple myeloma and further synergizes with IMiDs or bortezomib in vitro and in vivo. *Blood Cancer J* 2020 1011 [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2022 Jul 20];10(11):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41408-020-00378-z>

164. Lee HC. Structure and Enzymatic Functions of Human CD38. *Mol Med* [Internet]. 2006 Nov [cited 2022 Jul 20];12(11–12):317–23. Available from: [/pmc/articles/PMC1829193/](#)
165. Terstappen LWMM, Johnsen S, Segers-Nolten IMJ, Loken MR. Identification and Characterization of Plasma Cells in Normal Human Bone Marrow by High-Resolution Flow Cytometry. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1739–47.
166. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2016 Jul 21 [cited 2022 Jul 20];128(3):384–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27222480/>
167. Hill E, Morrison C, Kazandjian D. Daratumumab: A review of current indications and future directions. *Semin Oncol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Jul 20];49(1):48–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35184871/>
168. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 2012 11 [Internet]. 2012 Nov 29 [cited 2022 Jul 20];1(1):1–7. Available from: <https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/2162-3619-1-36>
169. Teplyakov A, Obmolova G, Luo J, Gilliland GL. Crystal structure of B-cell co-receptor CD19 in complex with antibody B43 reveals an unexpected fold. *Proteins Struct Funct Bioinforma* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Jul 20];86(5):495–500. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.25485>
170. Susa KJ, Rawson S, Kruse AC, Blacklow SC. Cryo-EM Structure of the B Cell Co-receptor CD19 Bound to the Tetraspanin CD81. *Science* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jul 20];371(6526):300–5. Available from: [/pmc/articles/PMC8111558/](#)
171. Li X, Ding Y, Zi M, Sun L, Zhang W, Chen S, et al. CD19, from bench to bedside. *Immunol Lett*. 2017 Mar 1;183:86–95.
172. Goridis C, Brunet JF. NCAM: structural diversity, function and regulation of

- expression. *Semin Cell Biol* [Internet]. 1992 [cited 2022 Jul 20];3(3):189–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1623208/>
173. Weledji EP, Assob JC. The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Ann Med Surg* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 20];3(3):77–81. Available from: </pmc/articles/PMC4284440/>
174. Ziegler S, Weiss E, Schmitt AL, Schlegel J, Burgert A, Terpitz U, et al. CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci Reports* 2017 71 [Internet]. 2017 Jul 21 [cited 2022 Jul 21];7(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06238-4>
175. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jul 24 [cited 2022 Jul 20];8(JUL):824. Available from: </pmc/articles/PMC5522883/>
176. Koumpis E, Tassi I, Malea T, Papathanasiou K, Papakonstantinou I, Serpanou A, et al. CD56 expression in multiple myeloma: Correlation with poor prognostic markers but no effect on outcome. *Pathol - Res Pract*. 2021 Sep 1;225:153567.
177. Rai S, Singh S, Gupta R. Prognostic significance of CD56 and CD7 in acute myeloid leukaemia and their outcome. *Am J Blood Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 20];10(4):109–17. Available from: </pmc/articles/PMC7486483/>
178. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leuk* 2022 367 [Internet]. 2022 Jun 22 [cited 2022 Oct 9];36(7):1720–48. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01620-2>
179. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2022 Oct 9];140(11):1229–53. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/140/11/1229/485458/The-International-Consensus-Classification-of>

180. Hernández-Rivas J-Á, Gironella Mesa M. Healthcare reality of the treatment of the high-risk multiple myeloma in Spain. *Med Clínica (English Ed [Internet]*. 2020 Apr 24 [cited 2022 Aug 18];154(8):315–9. Available from: <https://www.elsevier.es/en-revista-medicina-clinica-english-edition--462-articulo-healthcare-reality-treatment-high-risk-multiple-S2387020620301029>
181. Bao A, Zhao Q, Merritt E, Bumma N, Devarakonda S, Khan AM, et al. Racial differences as predictors of outcomes in young patients with multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2022 127 [Internet]. 2022 Jul 27 [cited 2022 Aug 21];12(7):1–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41408-022-00708-3>
182. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol [Internet]*. 2014 Nov 1 [cited 2022 Aug 21];15(12):e538–48. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204514704425/fulltext>
183. Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, Lee S, Coffey DG, Holmberg LA, et al. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2022 Feb 1;327(5):464–77.
184. Paiva B, Merino J, Miguel JFS. Utility of flow cytometry studies in the management of patients with multiple myeloma. *Curr Opin Oncol*. 2016 Nov 1;28(6):511–7.
185. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol [Internet]*. 2015 Sep 9 [cited 2022 Aug 21];33(26):2863–9. Available from: </pmc/articles/PMC4846284/>
186. Touzeau C, Moreau P. How I treat extramedullary myeloma. *Blood [Internet]*. 2016 Feb 25 [cited 2022 Aug 18];127(8):971–6. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/8/971/35145/How-I-treat-extramedullary-myeloma>
187. Bhutani M, Foureau DM, Atrash S, Voorhees PM, Usmani SZ. Extramedullary

- multiple myeloma. *Leuk* 2019 341 [Internet]. 2019 Nov 27 [cited 2022 Aug 18];34(1):1–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-019-0660-0>
188. Bladé J, Beksac M, Caers J, Jurczyszyn A, von Lilienfeld-Toal M, Moreau P, et al. Extramedullary disease in multiple myeloma: a systematic literature review. *Blood Cancer J* 2022 123 [Internet]. 2022 Mar 21 [cited 2022 Aug 18];12(3):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41408-022-00643-3>
189. Bladé J, de Larrea CF, Rosiñol L. Extramedullary involvement in multiple myeloma. *Haematologica* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2022 Aug 18];97(11):1618–9. Available from: </pmc/articles/PMC3487431/>
190. Gundersen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2022 Aug 17];21(1):8. Available from: </pmc/articles/PMC6349791/>
191. Rustad EH, Yellapantula V, Leongamornlert D, Bolli N, Ledergor G, Nadeu F, et al. Timing the initiation of multiple myeloma. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jul 22];11(1):1917. Available from: </pmc/articles/PMC7174344/>
192. Went M, Sud A, Försti A, Halvarsson BM, Weinhold N, Kimber S, et al. Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Jul 22];9(1):3708. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30213928/>
193. Bolli N, Martinelli G, Cerchione C. The molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Rep* [Internet]. 2020 Dec 12 [cited 2022 Jul 22];12(3):55–61. Available from: </pmc/articles/PMC7772755/>
194. Landgren O. Advances in MGUS diagnosis, risk stratification, and management: introducing myeloma-defining genomic events. *Hematology* [Internet]. 2021 Dec 10 [cited 2022 Jul 22];2021(1):662–72. Available from: <https://ashpublications.org/hematology/article/2021/1/662/482955/Advances-in-MGUS-diagnosis-risk-stratification-and>
195. André T, Najar M, Stamatopoulos B, Pieters K, Pradier O, Bron D, et al. Immune

- impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2022 Jul 22];64(2):213–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25341809/>
196. Liang X, Song E. The role of bone marrow stromal cells in blood diseases and clinical significance as a crucial part of the hematopoietic microenvironment. *Ann Blood* [Internet]. 2020 Mar 25 [cited 2022 Jul 22];5(0):2–2. Available from: <https://aob.amegroups.com/article/view/5340/html>
197. Xu S, De Veirman K, De Becker A, Vanderkerken K, Van Riet I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target? *Leuk* 2018 327 [Internet]. 2018 Feb 22 [cited 2022 Jul 22];32(7):1500–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-018-0061-9>
198. Maiso P, Mogollón P, Ocio EM, Garayoa M. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Multiple Myeloma: Their Role as Active Contributors to Myeloma Progression. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Jul 22];13(11):2542. Available from: </pmc/articles/PMC8196907/>
199. Wang X, He L, Huang X, Zhang S, Cao W, Che F, et al. Recent Progress of Exosomes in Multiple Myeloma: Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Strategies. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 1635 [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Jul 26];13(7):1635. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/7/1635/htm>
200. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J* 2018 81 [Internet]. 2018 Jan 12 [cited 2022 Jul 26];8(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41408-017-0037-4>
201. Mansour A, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Emerging roles of osteoclasts in the modulation of bone microenvironment and immune suppression in multiple myeloma. *Front Immunol*. 2017 Aug 11;8(AUG):954.
202. Fairfield H, Dudakovic A, Khatib CM, Farrell M, Costa S, Falank C, et al. Myeloma-modified adipocytes exhibit metabolic dysfunction and a senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cancer Res* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited

- 2022 Jul 26];81(3):634. Available from: [/pmc/articles/PMC7854508/](#)
203. Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 26];1364(1):32–51. Available from: [/pmc/articles/PMC4806534/](#)
204. De Bruyne E, Andersen TL, De Raeve H, Van Valckenborgh E, Caers J, Van Camp B, et al. Endothelial cell-driven regulation of CD9 or motility-related protein-1 expression in multiple myeloma cells within the murine 5T33MM model and myeloma patients. *Leuk* 2006 2010 [Internet]. 2006 Aug 10 [cited 2022 Aug 24];20(10):1870–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/2404343>
205. Lopes R, Caetano J, Ferreira B, Barahona F, Carneiro EA, João C. The Immune Microenvironment in Multiple Myeloma: Friend or Foe? *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2022 Aug 27];13(4):1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC7914424/](#)
206. Slany A, Haudek-Prinz V, Meshcheryakova A, Bileck A, Lamm W, Zielinski C, et al. Extracellular matrix remodeling by bone marrow fibroblast-like cells correlates with disease progression in multiple myeloma. *J Proteome Res* [Internet]. 2014 Feb 7 [cited 2022 Jul 27];13(2):844–54. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr400881p>
207. Gupta N, Kumar R, Sharma A. Versikine, a proteolysis product of Versican: novel therapeutics for multiple myeloma. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 27];5(7):680–5. Available from: <https://tcr.amegroups.com/article/view/11311/html>
208. Nemani N, Santo L, Eda H, Cirstea D, Mishima Y, Patel C, et al. Role of Decorin in Multiple Myeloma (MM) Bone Marrow Microenvironment. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2022 Jul 27];30(3):465–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbmr.2371>
209. He Z, Mei L, Connell M, Maxwell CA. Hyaluronan Mediated Motility Receptor (HMMR) Encodes an Evolutionarily Conserved Homeostasis, Mitosis, and Meiosis Regulator Rather than a Hyaluronan Receptor. *Cells* [Internet]. 2020

- Mar 28 [cited 2022 Jul 27];9(4):810. Available from:
[/pmc/articles/PMC7226759/](#)
210. Barash U, Cohen-Kaplan V, Dowek I, Sanderson RD, Ilan N, Vlodaysky I. Proteoglycans in health and disease: New concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. *FEBS J* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 27];277(19):3890–903. Available from: [/pmc/articles/PMC3000436/](#)
 211. Ahrens TD, Bang-Christensen SR, Jørgensen AM, Løppke C, Spliid CB, Sand NT, et al. The Role of Proteoglycans in Cancer Metastasis and Circulating Tumor Cell Analysis. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Aug 26 [cited 2022 Jul 27];8:749. Available from: [/pmc/articles/PMC7479181/](#)
 212. Peng Y, Wu D, Li F, Zhang P, Feng Y, He A. Identification of key biomarkers associated with cell adhesion in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020 Jun 22 [cited 2022 Aug 27];20(1):1–16. Available from: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-020-01355-z>
 213. Wallington-Beddoe CT, Mynott RL. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma. *J Hematol Oncol* 2021 141 [Internet]. 2021 Sep 23 [cited 2022 Oct 9];14(1):1–15. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01162-7>
 214. Asimakopoulos F, Hope C, Johnson MG, Pagenkopf A, Gromek K, Nagel B. Extracellular matrix and the myeloid-in-myeloma compartment: balancing tolerogenic and immunogenic inflammation in the myeloma niche. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2017 Aug [cited 2022 Oct 9];102(2):265–75. Available from: [/pmc/articles/PMC5505742/](#)
 215. Purushothaman A, Bandari SK, Liu J, Mobley JA, Brown EA, Sanderson RD. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Jan 22 [cited 2022 Jul 27];291(4):1652–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26601950/>
 216. Qin X, Lin L, Cao L, Zhang X, Song X, Hao J, et al. Extracellular matrix protein

- Reelin promotes myeloma progression by facilitating tumor cell proliferation and glycolysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Mar 27 [cited 2022 Jul 27];7:45305. Available from: [/pmc/articles/PMC5366887/](#)
217. Pan Q, Li T, Luo Z, Pan P. Expression of Cysteine-Rich Secreted Acidic Protein in Multiple Myeloma and Its Effect on the Biological Behavior of Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 27];2021:6101060. Available from: [/pmc/articles/PMC8563126/](#)
218. Moorman HR, Poschel D, Klement JD, Lu C, Redd PS, Liu K. Osteopontin: A Key Regulator of Tumor Progression and Immunomodulation. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Aug 27];12(11):1–31. Available from: [/pmc/articles/PMC7698217/](#)
219. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2015 May 14 [cited 2022 Aug 27];125(20):3049–58. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/125/20/3049/33950/Pathogenesis-beyond-the-cancer-clone-s-in-multiple>
220. Romano A, Conticello C, Cavalli M, Vetro C, La Fauci A, Parrinello NL, et al. Immunological Dysregulation in Multiple Myeloma Microenvironment. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 28];2014:198539. Available from: [/pmc/articles/PMC4071780/](#)
221. Jasrotia S, Gupta R, Sharma A, Halder A, Kumar L. Cytokine profile in multiple myeloma. *Cytokine*. 2020 Dec 1;136:155271.
222. de Jong MME, Kellermayer Z, Papazian N, Tahri S, Hofste op Bruinink D, Hoogenboezem R, et al. The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nat Immunol* 2021 226 [Internet]. 2021 May 20 [cited 2022 Jul 28];22(6):769–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-00931-3>
223. Akhtar S, Ali TA, Faiyaz A, Khan OS, Raza SS, Kulinski M, et al. Cytokine-Mediated Dysregulation of Signaling Pathways in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jul 2 [cited 2022 Jul 28];21(14):1–24.

- Available from: [/pmc/articles/PMC7403981/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3592476942/)
224. Akhmetzyanova I, Aaron T, Galbo P, Tikhonova A, Dolgalev I, Tanaka M, et al. Tissue-resident macrophages promote early dissemination of multiple myeloma via IL-6 and TNF α . *Blood Adv* [Internet]. 2021 Sep 28 [cited 2022 Jul 28];5(18):3592–608. Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/5/18/3592/476942/Tissue-resident-macrophages-promote-early>
225. Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J* 2015 52 [Internet]. 2015 Feb 27 [cited 2022 Jul 28];5(2):e282–e282. Available from: <https://www.nature.com/articles/bcj20153>
226. Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, Song W, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2022 Jul 28];115(26):5385–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20395418/>
227. DU CY, Yang RY, Li C, Duan LJ. [Correlation of Th17 Cells and IL-17 Level in Multiple Myeloma Patients with Pathogenesis of Multiple Myeloma]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Jul 28];25(1):147–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28245392/>
228. Bouyssou JMC, Ghobrial IM, Roccaro AM. Targeting SDF-1 in multiple myeloma tumor microenvironment. *Cancer Lett* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Jul 28];380(1):315–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26655999/>
229. Rao L, Veirman K De, Giannico D, Saltarella I, Desantis V, Frassanito MA, et al. Targeting angiogenesis in multiple myeloma by the VEGF and HGF blocking DARPin® protein MP0250: a preclinical study. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Mar 3 [cited 2022 Jul 29];9(17):13366. Available from: [/pmc/articles/PMC5862584/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30862584/)
230. Juskevicius R, Murthy H, Dangott B. Plasma Cell Myeloma With Very High Ki67 Proliferation Rate: Comparison of Visual Estimation and Computational

- Image Analysis With Description of Clinical and Pathologic Features. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Jul 30];144(suppl_2):A132–A132. Available from: https://academic.oup.com/ajcp/article/144/suppl_2/A132/1773922
231. Dhodapkar M V. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood* [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2022 Jul 29];128(23):2599. Available from: </pmc/articles/PMC5146746/>
 232. Hideshima T, Anderson KC. Signaling Pathway Mediating Myeloma Cell Growth and Survival. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jan 2 [cited 2022 Jul 29];13(2):1–17. Available from: </pmc/articles/PMC7827005/>
 233. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Templin J, Cao Y, Keller C, Panse J, et al. Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(13).
 234. Harjunpää H, Asens ML, Guenther C, Fagerholm SC. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10(MAY):1078.
 235. Soliman AM, Das S, Teoh SL. Next-Generation Biomarkers in Multiple Myeloma: Understanding the Molecular Basis for Potential Use in Diagnosis and Prognosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2022 Jul 29];22(14). Available from: </pmc/articles/PMC8305153/>
 236. Handa H, Murakami Y, Ishihara R, Kimura-Masuda K, Masuda Y. The Role and Function of microRNA in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Jul 29];11(11). Available from: </pmc/articles/PMC6896016/>
 237. Saki N, Abroun S, Hajizamani S, Rahim F, Shahjahani M. Association of Chromosomal Translocation and MiRNA Expression with The Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Cell J* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 29];16(2):99. Available from: </pmc/articles/PMC4072077/>
 238. Vasco-Mogorrón MA, Campillo JA, Periago A, Cabañas V, Berenguer M, García-Garay MC, et al. Proliferation to apoptosis tumor cell ratio as a biomarker to improve clinical management of pre-malignant and symptomatic plasma cell

- neoplasms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2022 Jul 30];22(8). Available from: [/pmc/articles/PMC8068942/](#)
239. Aljama MA, Hasib Sidiqi M, Lakshman A, Dispenzieri A, Jevremovic D, Gertz MA, et al. Plasma cell proliferative index is an independent predictor of progression in smoldering multiple myeloma. *Blood Adv* [Internet]. 2018 Nov 11 [cited 2022 Jul 30];2(22):3149. Available from: [/pmc/articles/PMC6258920/](#)
240. Harmer D, Falank C, Reagan MR. Interleukin-6 interweaves the bone marrow microenvironment, bone loss, and multiple myeloma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(JAN):788.
241. Tai YT, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood* [Internet]. 2016 Jun 23 [cited 2022 Jul 30];127(25):3225–36. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/127/25/3225/35206/APRIL-and-BCMA-promote-human-multiple-myeloma>
242. Haas M, Caron G, Chatonnet F, Manenti S, Alaterre E, Devin J, et al. PIM2 kinase has a pivotal role in plasmablast generation and plasma cell survival, opening up novel treatment options in myeloma. *Blood*. 2022 Apr 14;139(15):2316–37.
243. Janker L, Mayer RL, Bileck A, Kreutz D, Mader JC, Utpatel K, et al. Metabolic, Anti-apoptotic and Immune Evasion Strategies of Primary Human Myeloma Cells Indicate Adaptations to Hypoxia*. *Mol Cell Proteomics*. 2019 May 1;18(5):936–53.
244. Jovanović KK, Escure G, Demonchy J, Willaume A, Van De Wyngaert Z, Farhat M, et al. Deregulation and Targeting of TP53 Pathway in Multiple Myeloma. *Front Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 31];8(JAN):665. Available from: [/pmc/articles/PMC6333636/](#)
245. Coira IF, Rincón R, Cuendet M. The Multiple Myeloma Landscape: Epigenetics and Non-Coding RNAs. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 May 2 [cited 2022 Jul 31];14(10). Available from: [/pmc/articles/PMC9139326/](#)

246. Ozyerli-Goknar E, Bagci-Onder T. Epigenetic Dereglulation of Apoptosis in Cancers. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 Jul 31];13(13). Available from: [/pmc/articles/PMC8267644/](#)
247. Jandu H, Nielsen A, Brunner N, Hansen A, Knudsen S, Stenvang J, et al. Characterization of resistance to a recombinant hexameric Fas-ligand (APO010) in human cancer cell lines. *Exp Hematol*. 2020 Jul 1;87:33-41.e4.
248. Lin L, Yan F, Zhao D, Lv M, Liang X, Dai H, et al. Reelin promotes the adhesion and drug resistance of multiple myeloma cells via integrin β 1 signaling and STAT3. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2022 Jul 31];7(9):9844. Available from: [/pmc/articles/PMC4891088/](#)
249. Di Marzo L, Desantis V, Solimando AG, Ruggieri S, Annese T, Nico B, et al. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2022 Jul 21];7(37):60698. Available from: [/pmc/articles/PMC5312413/](#)
250. Pinto V, Bergantim R, Caires HR, Seca H, Guimarães JE, Vasconcelos MH. Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Jul 21];12(2). Available from: [/pmc/articles/PMC7072128/](#)
251. Peng Y, Li F, Zhang P, Wang X, Shen Y, Feng Y, et al. IGF-1 promotes multiple myeloma progression through PI3K/Akt-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Life Sci*. 2020 May 15;249:117503.
252. Palta A, Kaur M, Tahlan A, Dimri K. Evaluation of Angiogenesis in Multiple Myeloma by VEGF Immunoexpression and Microvessel Density. *J Lab Physicians* [Internet]. 2020 Mar [cited 2022 Jul 21];12(1):38–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792792/>
253. Ronca R, Ghedini GC, Maccarinelli F, Sacco A, Locatelli SL, Foglio E, et al. FGF Trapping Inhibits Multiple Myeloma Growth through c-Myc Degradation-Induced Mitochondrial Oxidative Stress. *Cancer Res* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Jul 21];80(11):2340–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094301/>

254. Liu J, Hideshima T, Xing L, Wen K, Tai Y-T, Cang Y, et al. TNF- α Confers Resistance of Myeloma Cells to IMiDs through TRAF2 Degradation. *Blood* [Internet]. 2019 Nov 13 [cited 2022 Jul 21];134(Supplement_1):1809–1809. Available from: https://ashpublications.org/blood/article/134/Supplement_1/1809/427676/TNF-Confers-Resistance-of-Myeloma-Cells-to-IMiDs
255. Herrero AB, García-Gómez A, Garayoa M, Corchete LA, Hernández JM, San Miguel J, et al. Effects of IL-8 Up-Regulation on Cell Survival and Osteoclastogenesis in Multiple Myeloma. *Am J Pathol*. 2016 Aug 1;186(8):2171–82.
256. Schwestermann J, Besse A, Driessen C, Besse L. Contribution of the Tumor Microenvironment to Metabolic Changes Triggering Resistance of Multiple Myeloma to Proteasome Inhibitors. *Front Oncol* [Internet]. 2022 May 26 [cited 2022 Jul 21];12. Available from: [/pmc/articles/PMC9178120/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39178120/)
257. De Bruyne E, Bos TJ, Asosingh K, Broek I Vande, Menu E, Van Valckenborgh E, et al. Epigenetic silencing of the tetraspanin CD9 during disease progression in multiple myeloma cells and correlation with survival. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10).
258. Shallal S, Kornbluth J. CD9 expression enhances the susceptibility of myeloma cell lines to cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2000;96(1).
259. Hu X, Xuan H, Du H, Jiang H, Huang J. Down-regulation of CD9 by methylation decreased bortezomib sensitivity in multiple myeloma. *PLoS One*. 2014;9(5).
260. Yamamoto T, Nakayama J, Yamamoto Y, Kuroda M, Hattori Y, Ochiya T. SORT1/LAMP2-mediated extracellular vesicle secretion and cell adhesion are linked to lenalidomide resistance in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2022;6(8).
261. Goodwin AE, Pauli BU. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J Immunol Methods* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2023 Mar 13];187(2):213–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7499880/>

262. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* [Internet]. 2012 [cited 2022 Dec 10];26(9):1908. Available from: [/pmc/articles/PMC3437410/](#)
263. Luque R, García-Trujillo JA, Cámara C, Moreno A, Eiras P, Roy G, et al. CD106 and activated-CD29 are expressed on myelomatous bone marrow plasma cells and their downregulation is associated with tumour progression. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2022 Dec 14];119(1):70–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.2002.03792.x>
264. Martínez-Viambres E, García-Trujillo JA, Rodríguez-Martín E, Villar LM, Coll J, Roldán E. 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. *Leuk* 2012 265 [Internet]. 2011 Dec 2 [cited 2022 Dec 14];26(5):1098–105. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2011335>
265. Cosemans C, Oben B, Arijs I, Daniëls A, Declercq J, Vanhees K, et al. Prognostic Biomarkers in the Progression From MGUS to Multiple Myeloma: A Systematic Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Dec 14];18(4):235–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29506935/>
266. Granell M, Calvo X, Garcia-Guiñón A, Escoda L, Abella E, Martínez CM, et al. Prognostic impact of circulating plasma cells in patients with multiple myeloma: implications for plasma cell leukemia definition. *Haematologica* [Internet]. 2017 [cited 2022 Dec 14];102(6):1099–104. Available from: [/pmc/articles/PMC5451342/](#)
267. Dhodapkar M V., Sexton R, Waheed S, Usmani S, Papanikolaou X, Nair B, et al. Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120). *Blood* [Internet]. 2014 Jan 2 [cited 2022 Dec 14];123(1):78–85.

268. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2022 Dec 14];110(7):2586–92. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/110/7/2586/103625/New-criteria-to-identify-risk-of-progression-in>
269. Roccaro AM, Mishima Y, Sacco A, Moschetta M, Tai YT, Shi J, et al. CXCR4 Regulates Extra-Medullary Myeloma through Epithelial-Mesenchymal-Transition-like Transcriptional Activation. *Cell Rep* [Internet]. 2015 [cited 2022 Dec 14];12(4):622–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190113/>
270. Sheth N, Yeung J, Chang H. p53 nuclear accumulation is associated with extramedullary progression of multiple myeloma. *Leuk Res* [Internet]. 2009 Oct [cited 2022 Dec 14];33(10):1357–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19201468/>
271. Dahl IMS, Rasmussen T, Husebekk A, Kauric G. Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Dec 14];116(2):273–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11841427/>
272. Hathi D, Chanswangphuwana C, Cho N, Fontana F, Maji D, Ritchey J, et al. Ablation of VLA4 in multiple myeloma cells redirects tumor spread and prolongs survival. *Sci Reports* 2022 121 [Internet]. 2022 Jan 7 [cited 2022 Dec 14];12(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-03748-0>
273. Firsova M V., Mendeleeva LP, Kovrigina AM, Solovev M V., Savchenko VG. Plasmacytoma in patients with multiple myeloma: Morphology and immunohistochemistry. *BMC Cancer* [Internet]. 2020 Apr 22 [cited 2022 Dec 14];20(1):1–8. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-020-06870-w>

274. Lloyd AC. The regulation of cell size. *Cell* [Internet]. 2013 Sep 12 [cited 2022 Dec 14];154(6):1194–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24034244/>
275. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, et al. An Anchorage-Independent Cell Growth Signature Identifies Tumors with Metastatic Potential. *Oncogene* [Internet]. 2009 Aug 8 [cited 2022 Dec 14];28(31):2796–805. Available from: </pmc/articles/PMC3008357/>
276. Deng Z, Wang H, Liu J, Deng Y, Zhang N. Comprehensive understanding of anchorage-independent survival and its implication in cancer metastasis. *Cell Death Dis* 2021 127 [Internet]. 2021 Jun 18 [cited 2022 Dec 14];12(7):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03890-7>
277. Sevilla-Movilla S, Arellano-Sánchez N, Martínez-Moreno M, Gajate C, Sánchez-Vencells A, Valcárcel L V., et al. Upregulated expression and function of the $\alpha 4\beta 1$ integrin in multiple myeloma cells resistant to bortezomib. *J Pathol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Dec 14];252(1):29–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.5480>
278. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* [Internet]. 2000 Sep 7 [cited 2022 Dec 14];19(38):4319–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10980607/>
279. Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR, et al. Cell–cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and $\alpha 4\beta 1$ -integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1953–60.
280. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018 Sep 9 [cited 2022 Dec 14];18(9):533–48. Available from: </pmc/articles/PMC6629548/>

281. Jones J, Berkhoff S, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, et al. Transient down-regulation of beta1 integrin subtypes on kidney carcinoma cells is induced by mechanical contact with endothelial cell membranes. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 Dec 14];11(4):826–38. Available from: [/pmc/articles/PMC3823260/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111111/)
282. Lahlou H, Muller WJ. β 1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: Implications for human breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2011 Nov 30 [cited 2022 Dec 14];13(6):1–10. Available from: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2905>
283. Lin L, Zhang X, Cao L, An Q, Hao J, Zhang Y, et al. Reelin promotes adhesion of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells via integrin β 1 signaling. *J Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2022 Dec 14];8(12):2212–22. Available from: [/pmc/articles/PMC5560138/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
284. Bachmann M, Kukkurainen S, Hytönen VP, Wehrle-Haller B. Cell adhesion by integrins. *Physiol Rev* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Dec 14];99(4):1655–99. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00036.2018>
285. Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, et al. The activated conformation of integrin β 7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med* [Internet]. 2017 [cited 2022 Dec 14];23(12):1436–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29106400/>
286. Hosen N, Yoshihara S, Takamatsu H, Ri M, Nagata Y, Kosugi H, et al. Expression of activated integrin β 7 in multiple myeloma patients. *Int J Hematol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 Dec 14];114(1):3–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33999338/>
287. Bauer M, Brakebusch C, Coisne C, Sixt M, Wekerle H, Engelhardt B, et al. Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Feb 10 [cited 2022 Dec 14];106(6):1920–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19179279/>

288. Li R, Wu Y, Manso AM, Gu Y, Liao P, Israeli S, et al. β 1 Integrin Gene Excision in the Adult Murine Cardiac Myocyte Causes Defective Mechanical and Signaling Responses. *Am J Pathol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Dec 14];180(3):952–62. Available from: [/pmc/articles/PMC3349893/](#)
289. Roldán E, Garda-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-Fibronectin Interaction Is Required for the Terminal Differentiation of Human Bone Marrow Cells Capable of Spontaneous and High Rate Immunoglobulin Secretion. *J Exp Med* [Internet]. 1992 Jun 1 [cited 2020 Oct 8];175(6):1739–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1588291/>
290. Neri P, Ren L, Azab AK, Brentnall M, Gratton K, Klimowicz AC, et al. Integrin β 7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2022 Dec 14];117(23):6202–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474670/>
291. Li J, Springer TA. Energy landscape differences among integrins establish the framework for understanding activation. *J Cell Biol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Dec 14];217(1):397–412. Available from: [/pmc/articles/PMC5748972/](#)
292. Zandecki M, Facon T, Bernardi F, Izydorzyc V, Dupond L, Francois M, et al. CD19 and immunophenotype of bone marrow plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Pathol* [Internet]. 1995 [cited 2022 Dec 14];48(6):548–52.
293. Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, González-García I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* [Internet]. 2002 Mar 15 [cited 2022 Dec 14];99(6):2154–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11877292/>
294. Atrash S, Thompson-Leduc P, Tai MH, Kaila S, Gray K, Ghelerter I, et al. Treatment patterns and effectiveness of patients with multiple myeloma initiating Daratumumab across different lines of therapy: a real-world chart review study. *BMC Cancer* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Dec 14];21(1):1207.

295. Kotha J, Longhurst C, Appling W, Jennings LK. Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. *Exp Cell Res* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2022 Dec 14];314(8):1811–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18358474/>
296. Machado-Pineda Y, Cardeñes B, Reyes R, López-Martín S, Toribio V, Sánchez-Organero P, et al. CD9 controls integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated cell adhesion by modulating its association with the metalloproteinase ADAM17. *Front Immunol*. 2018 Nov 5;9(NOV):2474.
297. Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, et al. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Apr 27 [cited 2022 Dec 14];276(17):14329–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278880/>
298. Trindade C, Sun X, Maric D, Jiang C, Hourigan CS, Metcalfe DD, et al. Immunophenotypic Patterns of Bone Marrow Eosinopoiesis in Patients with Hypereosinophilic Syndrome and Systemic Mastocytosis. *Blood* [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2022 Dec 14];132(Supplement 1):4294–4294. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/132/Supplement/1/4294/275725/Immunophenotypic-Patterns-of-Bone-Marrow>
299. Desterke C, Martinaud C, Guerton B, Pieri L, Bogani C, Clay D, et al. Tetraspanin CD9 participates in dysmegakaryopoiesis and stromal interactions in primary myelofibrosis. *Haematologica* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Dec 14];100(6):757–67. Available from: <https://haematologica.org/article/view/7406>
300. Rose DM, Cardarelli PM, Cobb RR, Ginsberg MH. Soluble VCAM-1 binding to $\alpha 4$ integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):602–9.
301. Caparotta M, Masone D. Cholesterol plays a decisive role in tetraspanin assemblies during bilayer deformations. *Biosystems*. 2021 Nov 1;209:104505.