

# **DADES DEL TREBALL**

**AUTOR:** Georgina Ferret Granés

**TÍTOL:** Variants genètiques predictores de progressió en el  
Mieloma Múltiple.

**ANY ELABORACIÓ:** 2011

**DIRECTOR TREBALL:** Evarist Feliu Frasnado

**CODIRECTOR TREBALL:** David Gallardo Giralt

**TIPUS TREBALL:** Treball de recerca

**CENTRE:** Institut Català d'Oncologia, Hospital Dr. Josep  
Trueta, IDIBGI.

**PARAULES CLAU:** Polimorfisme, Interleukina-6, Mieloma

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE  
BARCELONA**

**VARIANTS GENÈTIQUES  
PREDICTORES DE  
PROGRESSIÓ EN EL MIELOMA  
MÚLTIPLE**

**GEORGINA FERRET GRANÉS**

**TREBALL DE RECERCA**

**SETEMBRE 2011**

# ÍNDEX

|                    |       |
|--------------------|-------|
| RESUM              | 2     |
| INTRODUCCIÓ        | 3-7   |
| MATERIAL I MÈTODES | 8-9   |
| RESULTATS          | 10-12 |
| DISCUSSIÓ          | 13    |
| CONCLUSIONS        | 13    |
| BIBLIOGRAFIA       | 14-15 |

# RESUM

El Mieloma múltiple és una patologia hematològica maligna que cursa amb la presència d'una proteïna monoclonal responsable del deteriorament del pacient.

Existeixen múltiples factors que afavoreixen la progressió de la malaltia d'entre els quals destaca la interleukina 6 (IL-6), una citoquina que actua com a factor de creixement de les cèl·lules malignes i com a inhibidor de la seva apoptosi.

En aquest estudi ens hem plantejat si les variants genètiques d'aquesta IL-6 també poden causar diferències en l'evolució del mieloma múltiple. En concret hem estudiat la presència de guanina o lisina en la posició 174 de la regió promotora del gen de la IL-6.

# INTRODUCCIÓ

El mieloma múltiple (MM) és una patologia hematològica maligna causada per cèl·lules plasmàtiques. Representa el 10% de totes les neoplàsies hematològiques. Les cèl·lules plasmàtiques tenen la capacitat de sintetitzar una proteïna anòmla anomenada component monoclonal (proteïna monoclonal) responsable del deteriorament del pacient, l'aparició de lesions osteolítiques, anèmia, fracàs renal i hipercalcèmia.

Habitualment existeix un estadi premaligne asimptomàtic anomenat gammapatia monoclonal de significat incert (GMSI) on només es detecta aquest component monoclonal i en un 1% dels casos/any pot evolucionar a Mieloma Múltiple.

El mieloma asimptomàtic (MMA), el següent estadi, implica un risc superior d'evolucionar a mieloma múltiple (10% dels casos/any). Es caracteritza per la presència de proteïna M sèrica > 3 g/dL, població plasmàtica clonal > 10% a moll d'os i absència de lesió orgànica; entenent per lesió orgànica: hipercalcèmia (calci > 11.5 mg/dL), insuficiència renal (creatinina sèrica > 2.0 mg/dL o aclariment de creatinina < 40 mL/min), anèmia normocítica normocròmica (hemoglobina < 10 g/dL o 2 g/dL per sota del límit inferior de la normalitat) i lesions òssies (lesions lítiques, osteopènia severa o fractures patològiques).

Finalment, l'últim estadi, el de mieloma múltiple, es caracteritza per proteïna M sèrica > 3 g/dL i/o població plasmàtica clonal > 10% a moll d'os i/o presència de lesió orgànica.

L'etiologia d'aquesta entitat no és del tot coneguda. Sembla ser que la raça hi juga un paper important ja que la prevalença és 2 o 3 vegades superior en africans-americans i negres africans en comparació amb els blancs. Altres factors de risc relacionats serien l'edat avançada, el sexe masculí, l'exposició a pesticides i la història familiar de GMSI o MM. Així doncs, tant factors genètics com ambientals es consideren factors desencadenants.

L'estimulació del les cèl·lules B madures per part d'un antigen provoca la proliferació i diferenciació cap a cèl·lules B de memòria i plasmablastes. Aquests últims acaben evolucionant cap a cèl·lules plasmàtiques que entren en apoptosi al cap de 3 dies; secreten una immunoglobulina no sotmesa a hipermutacions somàtiques i habitualment del tipus IgM tot i que pot canviar a altres isotips (G, A, D, E).

Les cèl·lules B activades entren al centre germinal on són estimulades per tal de produir hipermutacions somàtiques de les cadenes pesades de les immunoglobulines però estan subjectes a una possible apoptosi si no són seleccionades antigènica. Els plasmablastes que canvien l'isotip de la immunoglobulina migren cap al moll d'os on interaccionen amb les cèl·lules de l'estroma i es

diferencien cap a cèl·lules plasmàtiques de llarga durada que sobreviuen uns 30 dies.

Les cèl·lules plasmàtiques malignes presenten una vida mitja llarga. Estan localitzades al moll d'os en contacte íntim amb l'estroma. Presenten un índex d'activitat mitòtica molt baix (LI 5 1% - 2%). Secreten menys immunoglobulines que les cèl·lules plasmàtiques normals. Al moll d'os, les cèl·lules mielomatoses (cMM) i les de l'estroma secreten citokines i interaccionen amb molècules d'adhesió; tota aquesta activació permetrà el creixement i la supervivència del procés neoplàsic.

La proliferació, diferenciació i funció de les cèl·lules d'estirp limfoide estan regulades per una xarxa complexa de factors de creixement i molècules de la superfície cel·lular que contacten aquestes cèl·lules amb l'estroma del moll d'os.

Cada factor de creixement s'uneix a un receptor específic de la superfície cel·lular que pertany a diferents famílies (tirosin-quinasa, citokines,...).

Les citokines implicades en la patogènesi del MM són similars a les que medien la proliferació controlada dels plasmablasts i la diferenciació a cèl·lules plasmàtiques madures. La interleukina 6 és especialment important. Es tracta d'una citokina amb efectes pleiotròpics tant en cèl·lules hematològiques com no

hematològiques. Indueix la diferenciació de les cèl·lules B cap a cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines i actua com a factor de creixement en MM. Així, intervé en l'expansió de cèl·lules plasmàtiques i també de malignes tant estimulant la seva divisió com inhibint l'apoptosi. La disminució de l'expressió del receptor de la IL-6 i els antagonistes d'aquests receptors indueixen l'apoptosi.

Existeix certa controvèrsia sobre l'origen d'aquesta interleukina. Sembla ser que estaria sintetitzada per les cèl·lules estromals del moll d'os, osteoblasts i osteoclasts. La seva secreció sembla que està regulada per altres citoquines com la IL-1b.

Nivells elevats d'IL-6 en sèrum, s'ha demostrat que són predictors d'un pitjor pronòstic o de malaltia més activa. Els nivells sèrics del receptor de IL-6 no estan tan correlacionats amb l'activitat de la malaltia. De totes maneres, el descens d'ambdós paràmetres sembla que es correlacionen amb la resposta al tractament.

El projecte que ens hem plantejat es basa en la pregunta de si la presència de variants genètiques de la IL-6 podrien ser responsables d'evolucions diferents de la malaltia.

El gen de la interleukina es troba al cromosoma 7 (p15-p21); la regió promotora, que el flanqueja, és molt polimòrfica, susceptible de canvis. En concret hem volgut estudiar la presència de lisina o guanina en la posició 174 d'aquesta regió promotora.



# MATERIAL I MÈTODES

Vam elaborar l'estudi a partir de 106 pacients diagnosticats de MM entre els anys 1999 i 2011 amb una edat mitja de 70 anys (41-92).

La distribució per sexes corresponia a un 50% de dones (n= 53) i un 50% d'homes (n= 53).

Pel que fa al subtipus de mieloma, del total de casos, 38 (35%) corresponien a un MM tipus IgGK, 20 (19%) IgGL, 17 (16%) IgAK, 17 (16%) IgAL, 8 (8%) BJK i 6 (6%) BJL.

Pel que fa al tractament, 24 casos (23%) van rebre Velcade, melfalan i prednisona; 37 (35%) velcade i dexametasona; 6 (6%) talidomida, melfalan i prednisona; 1 (1%) lenalidomida i dexametasona; 10 (9%) melfalan i prednisona i 28 (26%) altres esquemes de tractament.

Després de fer-los signar el consentiment informat, es va recollir un tub d'EDTA de sang perifèrica a cadascun d'ells.

Primer es va procedir a l'extracció d'ADN segons el protocol del kit de la casa Qiagen i la mostra resultant es va conservar a -80°C.

Posteriorment es va realitzar una PCR amb els primers 5'-ATGCCAAAGTGCTGAGTCACTA-3' (forward) i 5'-TCGAGGGCAGAATGAGCCTC-3' (reverse) per tal de poder seleccionar el fragment a estudiar i aconseguir la seva amplificació.

Un cop finalitzada, van ser necessàries diverses electroforesis en gel d'agarosa per tal de comprovar que la PCR havia estat efectiva.

Les mostres que s'havien amplificat van ser sotmeses a una digestió mitjançant l'enzim de restricció NlaIII per tal de separar cadascun dels fragments.

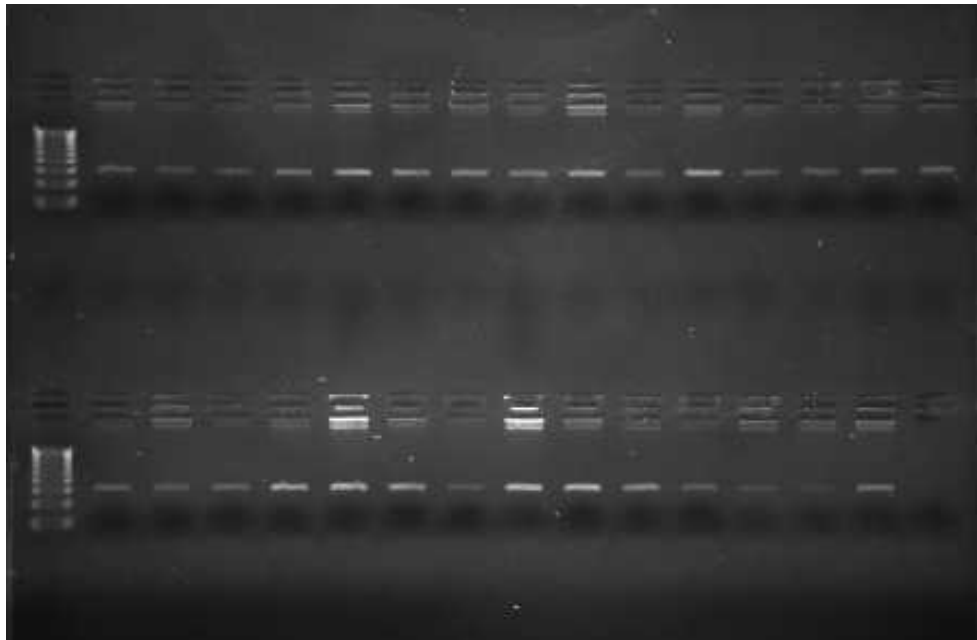
De nou, es van realitzar diverses electroforesis per tal de valorar el número i pes molecular dels fragments obtinguts.

En cas d'observar dues bandes amb pesos de 230 i 75 parells de bases, es tractaria d'un genotip homozigot GG; si apareixien dos fragments de 121 i 75 parells de bases, es consideraria un genotip homozigot CC i la presència dels 3 fragments (230, 120 i 75 parells de bases) seria un genotip heterozigot G/C.

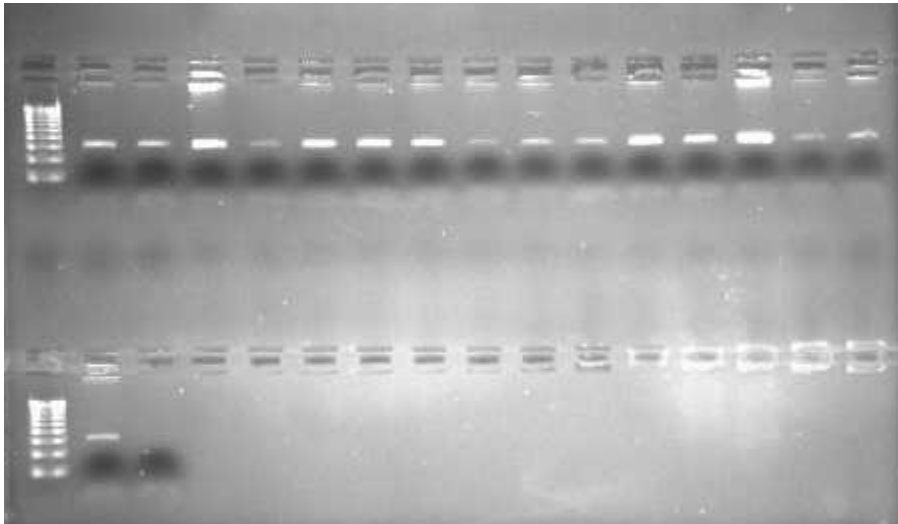
# RESULTATS

## La PCR

De les 106 mostres, vam obtenir 101 PCR efectives, amb amplificació del fragment. Els casos en què la tècnica no va ser efectiva es van tornar a sotmetre a la PCR però partint de la mateixa mostra de DNA, és a dir, no es va procedir a fer una nova extracció de l'àcid nucleic. Malgrat el 2on intent encara van quedar 5 mostres que no van amplificar. Per l'eficàcia de la tècnica, vam deduir que el problema residia en l'extracció del DNA tot i que estem pendents de valorar la concentració d'ADN mitjançant l'espectrofotòmetre en aquestes mostres negatives.



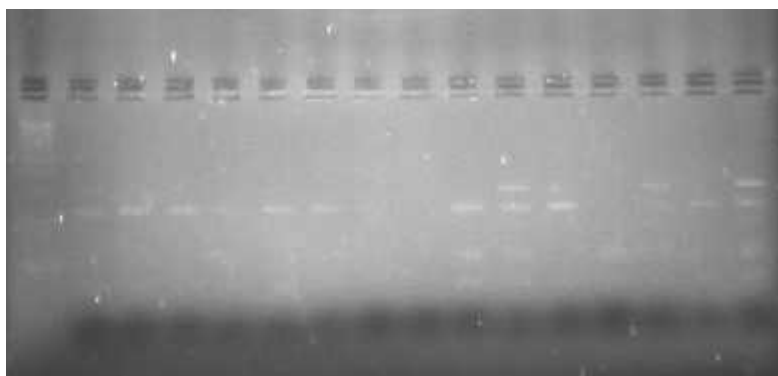
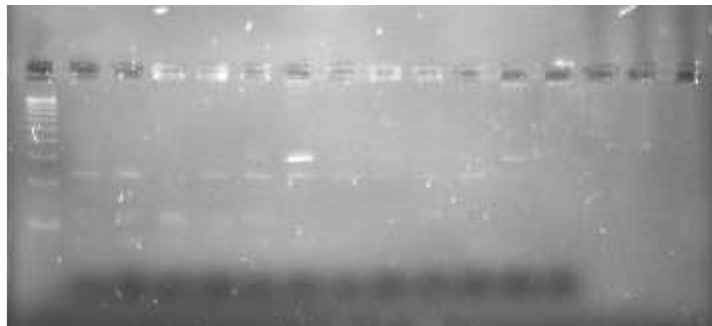
L'últim pouet correspon a la mostra "blanc" o mostra control.



El 2on pouet de la línia de sota correspon al "blanc" o mostra control.

## La Digestió

La digestió es va realitzar amb l'enzim de restricció NlaIII, inicialment amb 0,1µl d'enzim per 3 µl de mostra amplificada més el buffer i durant 2 hores a 37°C. Després d'intentar-ho amb diverses mostres i obtenir electroforesis poc nítides es va decidir doblar la quantitat d'enzim, digerir durant 3 hores i disminuir el voltatge de l'electroforesi passant de 130 volts a 110. Malgrat aquests canvis, en la majoria de les mostres no es van poder veure clarament els diferents fragments d'ADN. Van poder-se llegir només 48 mostres de les 106.



# DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Davant d'aquest problema s'ha decidit buscar una nova tècnica que permeti estudiar aquest polimorfisme.

S'han escollit 3 primers amb els que només realitzant la primera PCR s'obtenen els fragments per a determinar si el pacient és homozigot o heterozigot.

Caldrà tornar a agafar cadascuna de les 106 mostres i sotmetre-les a aquesta nova PCR i valorar-ne els resultats. És a dir, valorar, segons el genotip obtingut, si els pacients han presentat evolucions diferents.

# BIBLIOGRAFIA

1. Fonseca R, San Miguel J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007 Dec;21(6):1115-40, ix.
2. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. Robert A. Kyle and S. Vincent Rajkumar, Division of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, MN. *Blood.* 2008;111:2962-2972.
3. Michael Hallek, P. Leif Bergsagel and Kenneth C. Anderson. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood.* 1998; 91:3-21.
4. Interleukin-6-Related Genotypes, Body Mass Index, and Risk of Multiple Myeloma and Plasmacytoma. Wendy Cozen, Mulugeta Gebregziabher, David V. Conti, David J. Van Den Berg et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(11). November 2006.
5. Interleukin-6 -174G→C Polymorphism Is Associated with Improved Outcome in High-Risk Breast Cancer. *Cancer Research* 63, 8051-8056, November 15, 2003.
6. Analysis of polymorphism at site -174G/C of interleukin-6 promoter region in multiple myeloma. C.R. Duch, M.S. Figueiredo, C. Ribas, M.S.S. Almeida et al. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2207) 40:265-267.

7. In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway. Manik Chatterjee, Dirk Honemann et al. *Blood*, 1 november 2002, vol 100, number 9.

8. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation 1. Peter C. Heinrich, Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M. Hermanns, Gerhard Müller-newen and Fred Schaper. *Biochem. J.* (2003)374, 1-20.

9. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH, et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*. 2009;94(12):1708-1713.