

UCH-FC  
Biotecnología  
0148  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**ACCION DE TALIDOMIDA EN LAS VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES  
MEDIADAS POR IL-6 EN CELULAS DE MIELOMA MULTIPLE.**

**Memoria de Titulo entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Titulo de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

**Daniela Eugenia Olivares Zapata.**

**Marzo, 2005  
Santiago-Chile**

**Directores de Tesis Dra. Mireya Fernández G. y Dr. J. Francisco Santibáñez D.**



## ACTA EXAMEN PÚBLICO

De acuerdo a lo indicado en el Título VI, artículos 23 y 24, del Reglamento de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, a la Srta. **DANIELA EUGENIA OLIVARES ZAPATA**, le corresponde rendir su Examen Público de Título, “**ACCIÓN DE TALIDOMIDA EN LAS VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES MEDIADAS POR IL-6 EN CELULAS DE MIELOMA MULTIPLE**”. Esta Memoria fue desarrollada bajo la dirección de la Dra. Mireya Fernández Gálvez, y del Dr. Francisco Santibáñez Domínguez, en el Laboratorio de Biología Celular, del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. INTA.

### Directores de la Memoria

Dra. Mireya Fernández Gálvez

Dr. Francisco Santibáñez Domínguez

Dra. María Rosa Bono Merino  
Prof. Patrocinante

### Comisión de Evaluación de la Memoria

Dr. Julio Alcayaga Urbina  
Presidente de la Comisión

Dr. Mario Rosemblatt Silber

La Comisión Ha calificado el presente Examen con nota \_\_\_\_\_

**A mis padres Jorge y Noni,  
a mis hermanos Jorge y Felipe.**

1

2  
3

4

5

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis directores de tesis, Dra. Mireya Fernández y Dr. Juan Francisco Santibáñez por recibirme en el laboratorio, por todos estos años de apoyo, paciencia, confianza y amistad. A todo el grupo de laboratorio (Mónica, Sussy, Javier, Pato, Nico, Daisy, JP, Juan, Cote, Paty, Pablo, José y los profes), por la compañía, apoyo y complicidad en momentos complejos y por la alegría necesaria para enfrentar cada día.

A mis amigos de la U, Mato, Miriam, Andrea, Viviana, Rodrigo, Pollo, Concho, Claudia, Cristian, Marcos, Carlos, Andrés, Raúl, Cristóbal y a los que están lejos, porque sin su apoyo y compañía nada habría sido igual. Por las largas horas compartidas estudiando, en clases o simplemente carretiando.

A mis amigos, Carola, Matías, Coté, Suzana, Maripa, Fabián y Gonzalo. Por aprenderse el nombre de la carrera y ser parte importante de mi vida.

A mi familia, papá, mamá, Jorge, Felipe, abuelitas, tía Xime, tíos y primos. Por el cariño, entusiasmo y compañía de todos estos años.

A todos muchas gracias.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>INTRODUCCION</b> .....	14
Mieloma Múltiple.....	14
IL-6 en MM.....	15
Talidomida en MM.....	18
Hipótesis.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
<b>MATERIALES</b> .....	22
Instrumentos y equipos.....	22
Reactivos.....	22
Anticuerpos.....	22
Factores.....	23
Inhibidores.....	23
Reactivos para cultivo celular.....	23
Proteínas.....	23
Reactivos químicos.....	24
Otros.....	25
<b>METODOS</b> .....	26
Cultivos Celulares.....	26
Ensayos de Proliferación.....	27
Análisis del Ciclo celular y Apoptosis.....	28
Análisis de Señalización Intracelular.....	28
Lisados celulares.....	28
Western Blot.....	29
Stripping (Lavado de anticuerpos).....	31
Inmunofluorescencia para NFκ-β y estructura de ácidos nucleicos.....	31
Análisis estadísticos.....	32

<b>RESULTADOS</b> .....	33
<b>I Vías de Señalización Intracelular</b> .....	33
I.1 Efecto de IL-6 sobre las vías de señalización intracelular MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK/STAT en células U266.....	33
I.2 Efecto de los inhibidores PD98059, LY294002 y AG490 sobre las vías de señalización intracelular mediadas por IL-6.....	35
<b>II. Proliferación Celular</b> .....	37
Efecto de los inhibidores PD98059, LY294002 y AG490 sobre proliferación celular de U266.....	37
<b>III Análisis del ciclo celular y Apoptosis de las células de Mieloma Múltiple</b> .....	40
III.1 Efecto de LY294002 en el ciclo celular y Apoptosis .....	40
III.2 Efecto de AG490 en el ciclo celular y Apoptosis.....	42
<b>IV Acción de Talidomida sobre las células de Mieloma Múltiple</b> .....	45
IV.1 Efecto de Talidomida sobre la proliferación de U266.....	45
IV.2 Efecto de Talidomida en el ciclo celular y Apoptosis.....	47
IV.3 Talidomida en la localización subcelular de NFκ-β.....	53
IV.4 Talidomida sobre las vías de señalización mediadas por IL-6.....	57
<b>DISCUSION</b> .....	59
<b>CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	69

## Lista de abreviaturas.

- **AcMo** : Anticuerpo monoclonal.
- **AcPo** : Anticuerpo policlonal.
- **ATCC** : American Type Culture Collection.
- **bFGF-2** : Factor de crecimiento básico de fibroblastos 2.
- **BMP-2** : Proteína morfogénica del hueso.
- **BSA** : Albúmina sérica de bovino.
- **DAPI** : 4',6 -Diamidino-2-phenylindol.
- **DMSO** : Dimetil Sulfóxido.
- **EDTA** : Acido Etilen-diamino-Tetra-acético.
- **F** : Frecuencia.
- **g.l** : Grados de libertad.
- **IL-2** : Interleuquina 2.
- **IL-6** : Interleuquina 6.
- **IL-6R** : Receptor de IL-6.
- **sIL-6R** : Receptor soluble de IL-6.
- **IL-10** : Interleuquina 10.
- **INF- $\gamma$**  : Interferon gama.
- **IP** : Ioduro de Propidio.
- **JAK** : Janus Kinasa
- **MAP quinasas**: Proteínas quinasas con actividad mitogénica.
- **MM** : Mieloma Múltiple
- **MO** : Médula Ósea.

- **NaCl** : Cloruro de Sodio.
- **NaF** : Fluoruro de Sodio.
- **NEM** : N-etilmaleimida
- **NF $\kappa$ - $\beta$**  : Factor nuclear  $\kappa\beta$
- **PBS** : Tampón Fosfato salino.
- **PI3K** : Fosfatotidilinositol-3 kinasa
- **PMSF** : Fenil-metil-sulfonil-fluoruro.
- **rpm** : Revoluciones por minuto.
- **SBF** : Suero fetal bovino.
- **SDS** : Dodecilsulfato de Sodio.
- **STAT1** : Transductor de señal y activador de transcripción 1.
- **STAT3** : Transductor de señal y activador de transcripción 3.
- **Tal** : Talidomida.
- **TBS** : Tampón tris salino.
- **TNF- $\alpha$**  : Factor de necrosis tumoral alfa.
- **VEGF** : Factor de crecimiento del endotelio vascular.

## **Lista de Tablas.**

Tabla I. Ciclo celular de U266 tratadas con LY294002.....	41
Tabla II. Ciclo celular de U266 tratadas con AG490.....	43
Tabla III. Ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida.....	47
Tabla IV. Apoptosis en U266 tratadas con Talidomida.....	47
Tabla V. Ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida e IL-6.....	49
Tabla VI. Cinética de Apoptosis en células U266 tratadas con Talidomida.....	51

## Lista de figuras.

Figura 1. Vías de señalización de gp130.....	16
Figura 2. Esquema básico de las vías de señalización mediadas por IL-6.....	17
Figura 3. Estructura de Talidomida.....	18
Figura 4. Efectos de Talidomida sobre el microambiente de la MO de pacientes con mieloma multiple.....	20
Figura 5. Efecto de IL-6 sobre la activación de las vías de señalización MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1, 2-STAT1, 3.....	34
Figura 6. Efecto de los inhibidores de las vías MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1, 2-STAT1, 3 sobre la activación de IL-6 en U266.....	36
Figura 7. Efecto de los inhibidores de Ras-MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1, 2-STAT1, 3 sobre proliferación de U266.....	39
Figura 8. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con LY294002 inhibidor de PI3K.....	41
Figura 9. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con el inhibidor de JAK2, AG490.....	43
Figura 10. Grafico del % de Apoptosis vs concentración de AG490.....	44
Figura 11. Efecto de Talidomida sobre la proliferación celular de células U266.....	46
Figura 12. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida.....	48
Figura 13. Citometría de flujo para el efecto de Talidomida e IL-6 en el ciclo celular de U266.....	50
Figura 14. Cinética de Apoptosis de células tratadas con Talidomida.....	52

Figura 15. Efecto de Talidomida en la localización de NFκ-β y contenido nuclear en U266.....	54
Figura 16. Inmunofluorescencia para NFκ-β.....	56
Figura 17. Efecto de Talidomida sobre las vías de activación MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1, 2-STAT1, 3 mediadas por IL-6.....	58
Figura 18. Modelo propuesto para la acción de Talidomida en células U266 de MM....	68

## RESUMEN.

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia que se caracteriza por una expansión clonal de células plasmáticas en la médula ósea (MO). En esta patología interleuquina-6 (IL-6) regula la proliferación y sobrevida de las células de MM, mediante la activación de tres vías de transducción de señales: a) JAK1,2/STAT1,3; b) PI3K/AKT; c) la vía Ras-MAP quinasas.

Actualmente no existe un tratamiento curativo para esta enfermedad y la sobrevida promedio de los pacientes es de aproximadamente cuatro años. Estudios recientes sugieren que Talidomida tiene un efecto directo sobre células de MM, sin embargo el mecanismo molecular aún no está completamente dilucidado.

El objetivo de esta tesis fue analizar, en la línea celular U266 de MM, la acción de Talidomida sobre proliferación/sobrevida y apoptosis y sobre las vías de transducción de señales (JAK1,2/STAT1,3; Ras-MAP quinasas y PI3K/AKT) que median el efecto de IL-6.

Nuestros resultados indican que Talidomida es capaz de:

- a) Disminuir la proliferación celular de manera dosis dependiente.
- b) Aumentar el porcentaje de células en la fase G0-G1 del ciclo celular.
- c) Disminuir el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular.
- d) Inducir apoptosis de manera dosis dependiente.
- e) Inhibir la activación de ERK1,2 AKT1 y STAT3.
- f) Bloquear la translocación de NF $\kappa$ - $\beta$  al núcleo.

## **ABSTRACT.**

Multiple Myeloma is a neoplastic disease characterized by accumulation of clonal plasma cells in the bone marrow. In this pathology interleukin-6 regulates both the proliferation and survival of MM cells through the activation of three intracellular signaling pathways: a) JAK1,2/STAT1,3; b) PI3K/AKT and c) pathways Ras-MAP kinase.

At the present, MM is incurable, and the average survival rate of patients is about four years. Recent reports suggest that Thalidomide has a direct effect upon MM cells, however the molecular mechanism is still unclear.

The main goal of this study was analyze, in U266 cells, the action of Thalidomide on both proliferation/survival and signaling pathway, which are regulated by IL-6.

Our results indicate that Thalidomide is able to:

- a) Reduce the proliferation rate in a dose dependent manner.
- b) Increase the percentage of cells in G0-G1 phase of cell cycle.
- c) Reduce the percentage of cells in S phase of cell cycle.
- d) Induce apoptosis in a dose dependent manner.
- e) Inhibit the activation of ERK1,2 AKT1 and STAT3.
- f) Block the traslocation of NF $\kappa$ - $\beta$  to the nucleus.

## INTRODUCCION.

El Mieloma Múltiple es una enfermedad neoplásica que se caracteriza por una expansión clonal del compartimiento de células plasmáticas en la médula ósea (MO) y por la producción de una inmunoglobulina monoclonal en el suero u orina (Hideshima y Anderson, 2002). Corresponde al 14% de las enfermedades onco-hematológicas y clínicamente se expresa con insuficiencia medular, enfermedad ósea, compromiso renal, anemia, hipercalcemia y/o inmunodeficiencia (Bataille y Harousseau, 1997; Anderson y col, 2000). La edad promedio de diagnóstico es de 62 años para los hombres y 61 años para las mujeres (Kuehl y Bergsagel, 2002). En la actualidad no existe un tratamiento curativo para esta enfermedad, y la sobrevida promedio con terapia estándar (antraciclinas, agentes alcalinos y corticoesteroides) es de aproximadamente 4 años. En grupos selectos de pacientes se ha logrado un aumento de la sobrevida al asociar la terapia con trasplante autólogo de células troncales; no obstante la mayoría de los pacientes recae (Hideshima y Anderson, 2002).

El microambiente creado en la MO de pacientes con MM se caracteriza por la presencia de células plasmáticas malignas, proteínas de matriz extracelular, células estromales y otros tipos celulares, como osteoblastos y osteoclastos (Kuehl y Bergsagel, 2002). Las interacciones entre estas estructuras determinan la proliferación, migración y sobrevida de las células de MM, así como también la adquisición de resistencia a drogas. (Anderson, 2003; Bruno y col, 2004.) Las células malignas, al interactuar con células estromales, son inducidas a secretar factores que contribuyen a su sobrevida y proliferación (Hideshima y Anderson, 2002; Hussein, 2002.).

## **IL-6 en MM.**

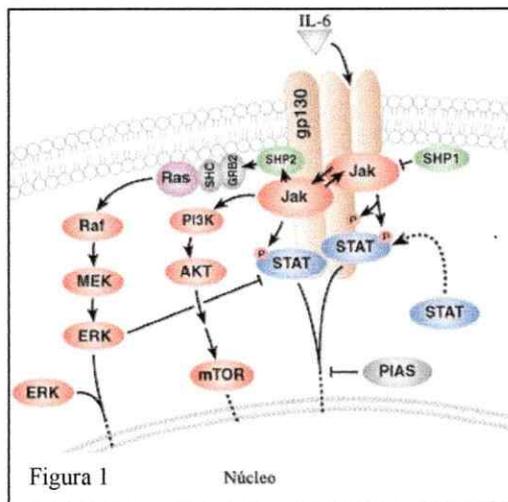
Un factor clave en la patogénesis del MM es IL-6, puesto que regula la proliferación y supervivencia de las células de MM. Este concepto fue introducido por primera vez por Kawano y col (1988), al demostrar que células de MM aisladas expresan el receptor para IL-6 (gp80). Diversos estudios posteriores sugieren que IL-6, producida por células del estroma, estimulan la proliferación de las células de mieloma a través de un mecanismo paracrino. El tratamiento con IL-6 exógena induce la síntesis de ADN en células de MM, mientras que la adición de anticuerpos anti-IL-6 o anti-receptor de IL-6 suprime su proliferación. (Treon y Anderson, 1998; Tricot, 2000; Anderson y col, 2000; Rawstron y col, 2000).

Además de estos hallazgos obtenidos *in vitro*, existe abundante evidencia clínica que también propone un rol central para IL-6 en la patogénesis del MM. Los niveles de IL-6 se encuentran elevados en la mayoría de los pacientes con MM, se correlacionan con la masa tumoral y han sido considerados como factor pronóstico. Por otra parte, la terapia con anticuerpos monoclonales anti-IL-6 revierte transitoriamente algunas manifestaciones de la enfermedad en pacientes con MM (Saito y col, 1992; Kishimoto y col, 1995; Treon y Anderson, 1998; Jones y col, 2001).

IL-6 se une inicialmente a su receptor, una glicoproteína de 80-kd (gp80) ubicada en la membrana celular, o a una forma soluble de éste (sIL-6R). Ambas formas del receptor forman un complejo con IL-6, que luego se une a la proteína de transmembrana gp130, transductora de señales intracelulares (Murakami y col, 1993; Ogata y col, 1997; Hirano, 1998; Schuringa y col, 2000). Esta proteína, a través de la cual IL-6 ejerce su acción, no es capaz de unir IL-6 que no esté formando parte del complejo IL-6/IL-6R.

Esto implica que un aumento de sIL-6R puede amplificar la acción de IL-6 circulante, aún cuando los niveles de IL-6 no estén aumentados. Además, la unión de IL-6 a su receptor soluble puede provocar la proliferación de aquellas células que no posean gp80 (receptor de la superficie celular), debido a la interacción del complejo IL-6/sIL-6R con gp130, lo que desencadena una cascada de señales proliferativas al interior de la célula (Naka y col, 2004).

La estimulación de gp130 por IL-6/IL-6R provoca su homodimerización, lo que gatilla la activación de a lo menos tres vías de transducción de señales:



1) JAK1, 2-STAT1, 3, 2) PI3K/AKT y 3) Ras-MAP quinasas. La señalización intracelular iniciada por gp130 activa el receptor asociado Janus tirosin-quinasa (JAK) que se encuentra en el tallo citoplasmático de gp130, creando sitios de reclutamiento para dominios SH2 que contienen componentes de

señalización como STAT1, STAT3 y SHP2 (Hirano, 1998; Schuringa y col, 2000). La fosforilación de STAT3 provoca su dimerización y posterior translocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción regulando la expresión génica (Terstegen y col, 2000; Kawamura y col, 2000). La activación de la vía MAP quinasas es iniciada por la fosforilación de la proteína SHP2 que gatilla la activación secuencial de las proteínas Ras, Raf, MEK, ERK1, 2; esta última se transloca al núcleo para regular la expresión de algunos genes (Ogata y col, 1997). Por otra parte, PI3K fosforilada por JAK es capaz de activar AKT en sus residuos serina y treonina. La activación de AKT

promueve la oncogénesis, al activar otras moléculas que regulan la proliferación/sobrevida celular y apoptosis en células malignas (Hideshima y col, 2001; Hsu y col, 2002) (Figura 1). Según datos de la literatura, las cascadas de señales que se relacionan con el efecto proliferativo son las vías de Ras-MAP quinasas y PI3K/AKT y aquellas que se relacionan con el efecto anti-apoptótico de IL-6 son las vías de JAK1, 2-STAT1, 3 y PI3K/AKT, a través de la activación de NFκ-β (Mitsiades y col, 2002a; Tu y col, 2000; Hideshima y col, 2001; Hideshima y col, 2002; Chen y col, 1999; Chatterjee y col, 2002; Platanias, 2003.) (Figura 2).

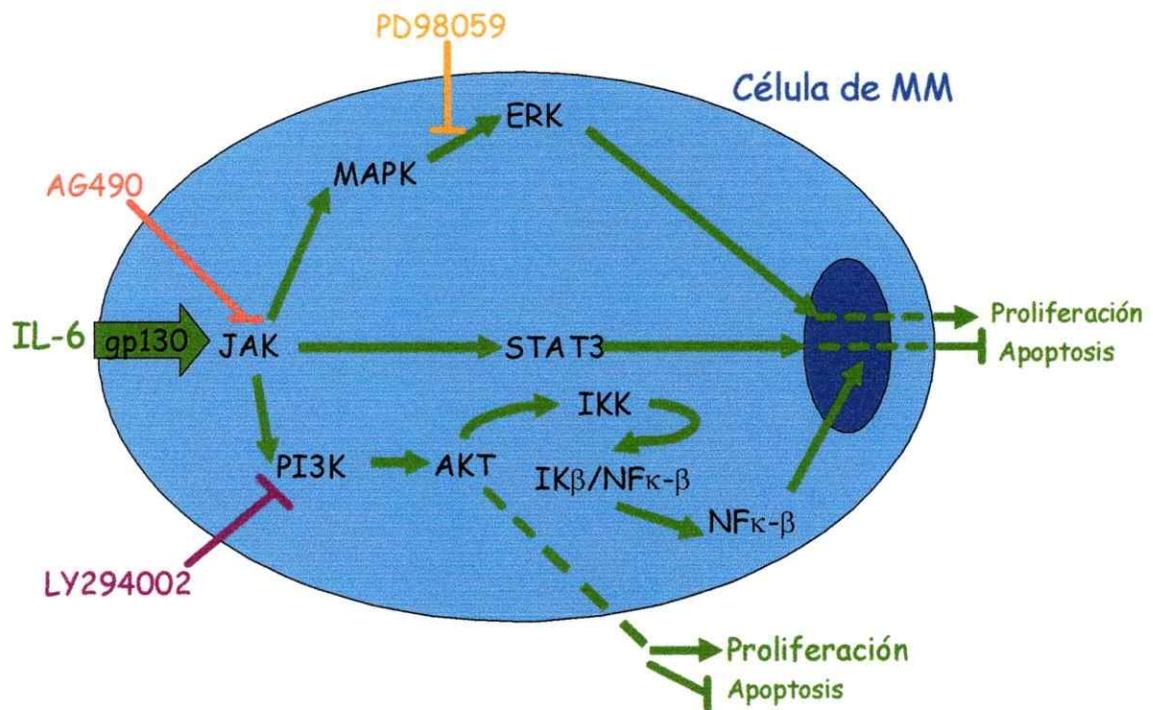


Figura 2. Esquema básico de las vías de señalización mediadas por IL-6 producto de la estimulación de gp130 y los procesos celulares asociados a ellas. PD98059 inhibidor de MAP quinasa. LY294002 inhibidor de PI3K. AG490 inhibidor de JAK2. → Estimula —| Bloquea.

NFκ-β es un heterodímero compuesto por las subunidades p50 y p65 y está constitutivamente presente en el citoplasma, donde se encuentra inactivo, debido a su asociación con inhibidores de la familia IκB (Hideshima y col, 2002). Cuando IκB es fosforilado por el complejo IKK, se separa de NFκ-β, es ubiquitinado y degradado por proteosomas. NFκ-β es translocado al núcleo, donde se une a secuencias específicas de ADN y estimula la transcripción de genes (Mitsiades y col, 2002a). Las proteínas producto de estos genes incluyen citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y proteínas que regulan el crecimiento celular y supervivencia. Se ha descrito que NFκ-β regula el crecimiento, diferenciación celular y apoptosis en líneas celulares y tejidos (Baeuerle y Baltimore, 1996). Estudios en los que células de MM fueron tratadas con inhibidores de Iκκ confirman el rol de NFκ-β en la proliferación, supervivencia y resistencia a drogas (Liou y Baltimore, 1993; Hideshima y col, 2002; Mitsiades y col, 2002a; Bharti y col, 2004).

### **Talidomida en MM.**

Agentes biológicos, hormonas y drogas, son capaces de interferir en las vías de acción de IL-6, disminuyendo la expresión ya sea de IL-6, de los receptores de IL-6 o de gp130 (Chen y col, 1999; Treon y Anderson, 1998.)

En los últimos años, Talidomida, un derivado del ácido glutámico (Figura 3), ha pasado a constituir un tercer tipo de drogas que, al igual que los agentes

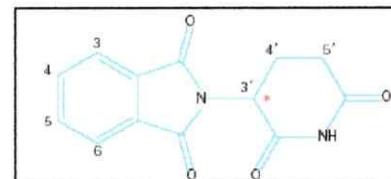


Figura 3

alquilantes y los corticoesteroides, forman parte del arsenal terapéutico utilizado en el MM (Hideshima y col, 2000; Barlogie y col, 2001).

Aunque Talidomida se usó inicialmente para tratar el MM debido a sus conocidos efectos antiangiogénicos, el mecanismo de su actividad anti-MM está poco claro (Singhal y col, 1999; Tosi y col, 2001; Mitsiades y col, 2002b). De hecho la densidad microvascular de la médula ósea, no cambia significativamente en todos aquellos pacientes con una respuesta satisfactoria al tratamiento, lo que estaría indicando entonces que la eficacia de Talidomida en el MM se debe a su acción en alguno de los otros procesos celulares y moleculares que se ven alterados en esta patología (Hideshima y col, 2000). Estudios recientes sugieren que Talidomida tiene un efecto directo sobre células de MM (Figura 4), lo que se reflejaría en una inhibición del crecimiento y sobrevida celular, modificando la producción y bioactividad de citoquinas como IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , VEGF y bFGF-2, estimulando la acción de células natural killer (Davies y col, 2001; Hideshima y Anderson, 2002). En cultivos de células de MM se ha descrito que Talidomida induce apoptosis, efecto que podría estar mediado por la capacidad del agente de inhibir la actividad/activación de NF $\kappa$ - $\beta$  (Franks y col, 2004.). Sin embargo, los mecanismos moleculares que median estos efectos no han sido aún descritos (Hideshima y col, 2002; Anderson, 2003; Rosiñol y col, 2004; Kumar y col, 2004; Hattori e Iguchi, 2004).

El objetivo de esta tesis es analizar la acción de Talidomida sobre la proliferación/sobrevida y vías de transducción de señales (JAK1,2-STAT1,3, Ras-MAP quinasas y PI3K/AKT) que median el efecto de IL-6 en células de MM.

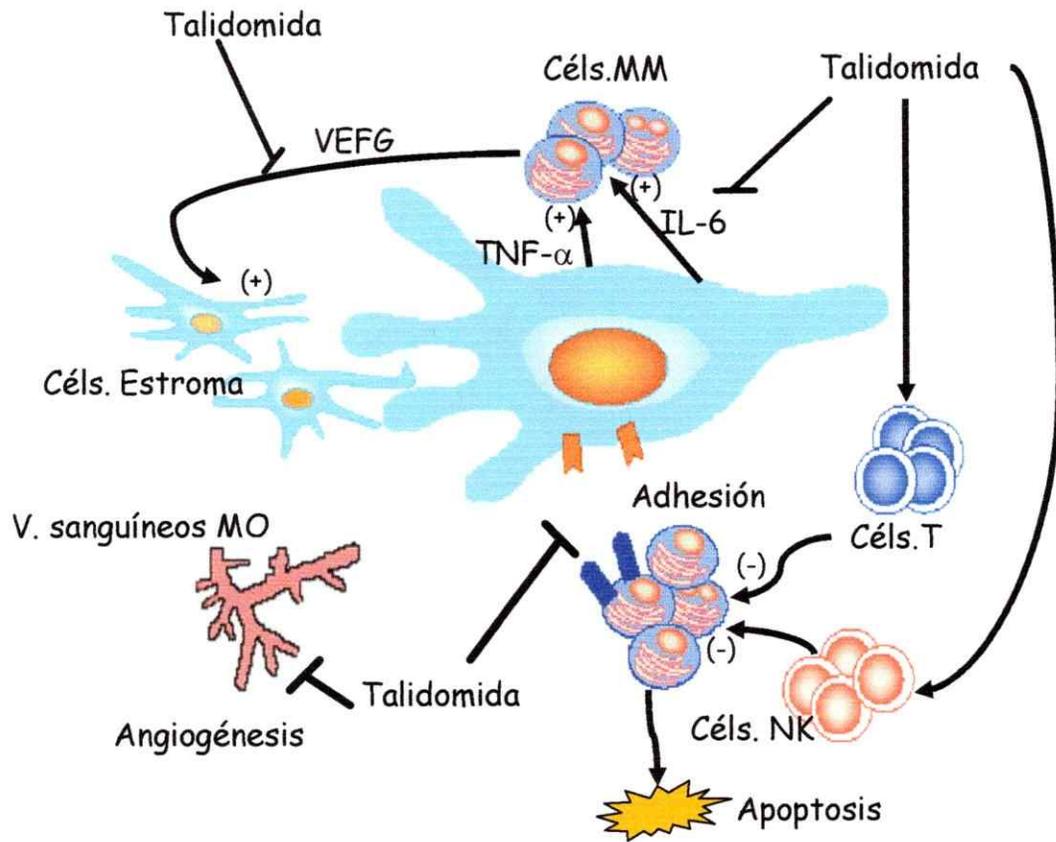


Figura 4. Efectos de Talidomida sobre el microambiente de la médula ósea de pacientes con Mieloma Múltiple.  $\rightarrow$  Estimula  $\mid$  Bloquea

## **HIPOTESIS**

Talidomida disminuye la proliferación/sobrevida e induce la apoptosis de células de MM al modificar la(s) vía(s) de transducción de señales mediadas por IL-6.

### **Objetivo General**

Analizar el efecto de Talidomida sobre las vías de transducción de señales que median el efecto de IL-6, y sobre la proliferación, sobrevida y apoptosis de células de Mieloma Múltiple.

### **Objetivos Específicos.**

En células U266 de MM:

- 1.- Identificar la o las vías de transducción de señales mediadas por IL-6.
- 2.- Estudiar el efecto de IL-6 y Talidomida sobre proliferación/sobrevida y apoptosis
- 3.- Evaluar el efecto de Talidomida sobre 1) y su relación con cambios en proliferación y sobrevida.

## **MATERIALES.**

### **Instrumentos y equipos.**

- Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129.
- Incubador Lab-Line CO<sub>2</sub> automático.
- Cámaras de electroforesis y transferencia Bio-Rad.
- Centrifuga Biofuge prime R Heraeus.
- Microscopio de Fluorescencia Nikon labophot-2.
- Microscopio Invertido de Contraste de fase Nikon modelo TMS-F
- Lector de Elisa modelo Elx-806.
- Cámara Kodak Digital Science DC120.

### **Reactivos.**

#### **Anticuerpos.**

- Acpo anti-ERK1, 2 (K-23) conejo IgG, Santa Cruz, Cat. Sc-153
- AcMo anti-p-ERK (E-4) ratón IgG 2a, Santa Cruz, Cat. Sc-7383
- AcMo anti-p-STAT3 (B-7) ratón IgG 2b, Santa Cruz, Cat. Sc-8059
- Acpo anti-NFkB p65 (C-20) conejo, Santa Cruz, Cat. Sc-372
- Acpo anti-p-AKT (Ser 473)-R conejo IgG, Santa Cruz, Cat. Sc-7985-R
- Acpo anti-AKT1/2 (H-136) conejo IgG, Santa Cruz, Cat. Sc-8312
- Anti-conejo, conjugado a peroxidasa, Amersham Life Science.
- Anti-ratón conjugado a peroxidasa, Amersham Life Science.
- Anti-conejo, conjugado a FITC, SIGMA,

**Factores.**

- IL-6, human recombinant, Upstate, Cat.01-156
- Talidomida.

**Inhibidores.**

- AG490, Calbiochem, Cat.658401
- PD98059, Calbiochem, Cat. 513000
- LY294002, Calbiochem, Cat. 440202

**Reactivos para cultivo celular.**

- Medio RPMI 1640, GIBCO BRL 31800-022
- L-Glutamina 99-100%, SIGMA G-3126
- Gentamicina 80mg/2ml, Laboratorio Astorga.
- Suero Fetal Bovino, GIBCO
- Suero Forgen (Agua bidestilada, estéril y apirogena), Laboratorio Sanderson S.A.
- Penicilina-Estreptomicina, GIBCO
- Fungizona, GIBCO.

**Proteínas.**

- Albúmina Sérica de Bovino (BSA) fracción V, SIGMA A-2153.
- Leupeptina, USBiological, Cat.L2050.
- Pepstatina A, USBiological, Cat.P3280

### Reactivos Químicos.

- 4',6 -Diamidino-2-phenylindol (DAPI).
- Ácido clorhídrico fumante 37% p.a., Merck 317.
- Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanol sulfónico (HEPES), SIGMA, N°. H-9136.
- Acrilamida, SIGMA, No. A-9099.
- Azul de bromofenol, USB, US12370.
- Azul Tripán, tinción 0,4%, SIGMA, No. T-6154.
- $\beta$ -Mercaptoetanol, Merck 15433.
- Bis-acrilamida, SIGMA, N°. M-7279.
- Cloruro de magnesio, Merck 5833
- Cloruro de potasio, p.a., Merck 4336.
- Cloruro de sodio, p.a., Merck 6404.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), SIGMA, No. D-5879.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), Calbiochem, Cat. 428023.
- Etiléndiamino tetraacético disódico dihidratado (EDTA), SIGMA, No. E-4884.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), SIGMA, No. P-7626.
- Formaldehído 37%, Merck 4003.
- Fosfato dibásico de potasio p.a., Merck
- Fosfato dibásico de sodio, p.a., Merck 6580.
- Fosfato monobásico de sodio, p.a., Merck 6343.
- Glicina, SIGMA, No. G-7126.

- Hidróxido de sodio, p.a., Merck 6498.
- Isobutanol, Merck 15433.
- Marcador de peso molecular BenchMark™ Prestained Protein Ladder, GIBCO BRL Cat. No 10748-010
- Metanol, TCL.
- N-etilmaleimida (NEM), SIGMA, No. E-1271.
- Nonidet (NP-40), SIGMA, No. N-6507.
- TEMED, SIGMA, No. T-9281.
- Tris, p.a., Merck 8382.

#### **Otros**

- Biomax Film MR, Kodak, Cat.8701302.
- ECL, Amersham Life Science biotech, RPN 2108.
- Inmuno-Blot Membrane, BioRad, Cat. 162-0115.
- Solución de montaje DAKO Fluorescent S3023.
- Programa SYSTAT11. SOFTWARE INC. 2004.
- Programa Kodak Digital Science, 1D Image Análisis Software versión 3.0.
- Programa STATISTICA versión 6.0 StatSoft, Inc. 2004.

## **METODOS.**

### **CULTIVOS CELULARES.**

#### **Línea celular de Mieloma Múltiple Humano U266.**

La línea celular U266 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA. Los cultivos celulares se iniciaron con  $1.5 \times 10^5$  –  $3 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 15% de SFB, gentamicina (100 U/ml) y L-glutamina (2mM) y se les cambió el medio cada dos días. Estos cultivos se mantuvieron a temperatura constante (37°C) y en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

#### **Criopreservación.**

Una vez expandidas las células se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido. Para ello, las células se centrifugaron por 10 minutos a 1800 rpm y se resuspendieron, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, en una solución de criopreservación fría que consiste en 90% SFB y 10% DMSO. Se distribuyó luego 1 ml de la solución de células en cada criotubo y se congeló mediante descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar -196 °C.

## **Ensayos de proliferación.**

La proliferación celular o aumento de células vivas en función del tiempo, se evaluó por recuento celular utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Las células U266 se centrifugaron 10 minutos a 1800 rpm y se lavaron dos veces con PBS. El pellet se resuspendió en RPMI suplementado con 15% SFB. Luego se sembró  $1 \times 10^5$  células/pozo en placas de 24 pozos, y se trataron con los inhibidores de las rutas de señalización o con Talidomida. Se utilizaron inhibidores específicos de las vías Ras-MAP quinasas PD98059 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M), de PI3K/AKT LY294002 (10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M) y de JAK2 AG490 (20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M). También se estudió el efecto de estos inhibidores en presencia de IL-6. Para ello, las células se preincubaron con los inhibidores a las concentraciones ya señaladas por 30 minutos y a continuación se les agregó IL-6 10ng/ml por los próximos 4 días de cultivo. Talidomida fue utilizada a cuatro concentraciones diferentes, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ g/ml y también se estudio la combinación de la droga con IL-6 10ng/ml. Para ello las células se preincubaron con Talidomida por 30 minutos, y luego se estimuló con IL-6 por los próximos 4 días de cultivo. Las células se cultivaron por 4 días. El recuento celular se realizó en el caso de los inhibidores a los 2 y cuatro días de tratamiento. La concentración celular se determinó diluyendo 10  $\mu$ l de la muestra con 10  $\mu$ l de Azul Tripan; se contó 4 cuadrantes de la cámara, por duplicado. El cálculo de la concentración se realizó tomando en cuenta el factor de conversión de la cámara y el factor de dilución de la muestra.

### **Análisis del ciclo celular y Apoptosis.**

Al igual que en los ensayos anteriores las células se preincubaron por 30 minutos con Talidomida (50-400ug/ml) o LY29402 (10-20 $\mu$ M) o AG490 (20-40 $\mu$ M) y luego estimuladas o no con IL-6 10ng/ml por los próximos tres días. Al cabo de este tiempo, las células fueron contadas en un hemocitometro.  $1 \times 10^6$  células/ml se lavaron dos veces con PBS; y se fijaron con PBS/Etanol 70%. Luego se marcaron con Ioduro de propidio, fluorocromo que se une a ácidos nucleicos. El ciclo celular se analizó por citometría de flujo; este método permite conocer el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular así como el porcentaje de células que presentan el ADN fragmentado o hipodiploides.

Los análisis por citometría fueron realizados en Clínica Las Condes.

### **Análisis de señalización intracelular.**

#### **Lisados celulares.**

Las células en suspensión a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml se centrifugaron y se lavaron 2 veces con RPMI sin SFB. Luego se incubaron por 4 horas en medio de cultivo sin SFB a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/300 $\mu$ l medio. Transcurrido el tiempo de incubación las células se trataron con IL-6 10ng/ml a distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos), PD98057, LY294002, AG490 y Talidomida

por 30 minutos. Las células se trataron también con la combinación de estos agentes con IL-6, para ello las células se preincubaron por 30 minutos con los distintos inhibidores o con Talidomida y luego estimuladas con IL-6 por 15 minutos.

Las células se centrifugaron por un minuto a 12000 rpm y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de buffer de lisis (2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM NEM, 1 mM o-vanadato de sodio, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 5 mM NaF en PBS) en frío. El lisado se realizó a 4° C. Las proteínas se cuantificaron por el método de Pierce, para lo cual se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l y se le agregó 200  $\mu$ l de la mezcla de los reactivos de Pierce (50A: 1B), se incubó por 30 minutos a 37°C y se analizó en un lector de Elisa a 570nm de longitud de onda. El resto de la muestra se sometió a condiciones reductoras con buffer carga (40%SDS, Glicerol 20% azul de Bromofenol 0.012%, Tris-HCl 500mM) en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (4%) por 5 minutos a 60° C.

#### **Western Blot.**

Se preparó los geles de poliacrilamida al 10% y por cada carril se cargó 30  $\mu$ g de proteína o 50  $\mu$ l extracto proteico. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente a 80V hasta que el frente pasó el gel concentrador y luego se aumentó a 140V hasta que el frente salió del gel. El buffer de corrida contiene 50 mM Tris, 190 mM glicina y 0,1% SDS.

A continuación de la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas desde los geles a membranas de nitrocelulosa. El buffer de transferencia contiene 50mM Tris, 190mM glicina, 20% metanol y 0,1% SDS. La transferencia se realizó a 100V, por 90 minutos a 4°C. Los sitios de unión inespecífica en las membranas se bloquearon con una solución de saturación (leche al 4% en TBS (25mM Tris)/0.1% Tween-20) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Las membranas se ensayaron para la identificación de p-ERK1, 2, p-STAT3, p-AKT y las formas inactivas de estas proteínas. Se incubó con los anticuerpos respectivos toda la noche a 4°C o por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con TBS-Tween (0,05% Tween 20) de 5 minutos cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo secundario, anti-ratón o anti-conejo según corresponda por una hora a temperatura ambiente con agitación.

Luego se lavó cuatro veces con TBS-Tween (0,05% Tween 20) por cinco minutos cada vez. Se reveló la membrana usando un kit de quimioluminiscencia (ECL) exponiendo posteriormente a film fotográfico durante 1 a 15 minutos.

Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por análisis densitométrico usando el programa Kodak Digital Science, ID Image 3.0. Los resultados se expresaron como la intensidad relativa con respecto al control.

### **Stripping (Lavado de anticuerpos).**

Una vez que las membranas se revelaron, se sometieron a un "stripping" para eliminar la unión del anticuerpo con la proteína de interés y ser incubada con otro anticuerpo para obtener la carga u otra proteína. Las membranas se lavaron en TBS/TWEEN y luego se colocaron en unos tubos con solución de stripping (50mM Tris pH 7.2, 10% SDS, 0.07%  $\beta$ -mercaptoetanol) en un horno a 55 °C con agitación por 20 minutos. Se lavaron dos veces con PBS por 15 minutos y se continuó con el protocolo para western blot desde la etapa de bloqueo.

### **Inmunofluorescencia para NF $\kappa$ - $\beta$ y estructura de ácidos nucleicos.**

Las células en suspensión tratadas con LY294002 (20 $\mu$ M) ó AG490 (40 $\mu$ M) o con Talidomida (400 $\mu$ g/ml) por 48 horas, se adherieron al portaobjeto por centrifugación (cytospin) y se fijaron con metanol frío por 2 minutos. Luego, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (PBS/BSA5%) por 20 minutos a 37°C en cámara húmeda. Se incubó con el primer anticuerpo para NF $\kappa$ - $\beta$  p65 (1:100 en BSA 1%) por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se lavó tres veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado a FITC por 45-60 minutos bajo las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:1000) por 15 minutos a 37°C y luego se lavó dos veces con PBS y una vez con agua

destilada. Se agregó una gota de solución de montaje DAKO Fluorescent, se analizó por microscopía de epifluorescencia y se fotografiaron con cámara Kodak Digital.

#### **Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico se usaron los programas SYSTAT11. SOFTWARE INC. 2004 y STATISTICA versión 6.0 StatSoft, Inc. 2004. Se realizó un test paramétrico ANOVA para lo cual a los datos de los ensayos de proliferación se les calculó el logaritmo en base 10 y a los datos de ciclo celular y apoptosis se les calculó el  $\cos^{-1}$  del porcentaje obtenido por citometría de flujo. Las interacciones entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Tukey a posteriori (HSD). Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS.**

### **Vías de señalización intracelular.**

#### **Efecto de IL-6 sobre las vías de señalización intracelular MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1, 2-STAT1, 3 en células U266.**

La capacidad de IL-6 de activar vías de señalización intracelular se evaluó analizando el aumento de las especies fosforiladas de ERK1,2, AKT y STAT3, testigos del estímulo de las vías Ras-MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1,2-STAT1,3 respectivamente.

Como se muestra en la figura 5, el tratamiento de las células con IL-6 produjo un aumento de los niveles de fosforilación de los tres elementos analizados. La fosforilación de STAT3 se observó fuerte y transitoria con un máximo entre los 5 y los 15 minutos. En el caso de AKT1 y ERK1,2, el aumento también fue rápido pero con un grado menor de fosforilación en comparación a STAT3. Estos datos indican que en la línea celular U266 IL-6 es capaz de activar las tres vías de transducción de señales. A partir de este resultado determinamos que el tiempo de estímulo con IL-6 para los próximos experimentos será de 15 minutos.

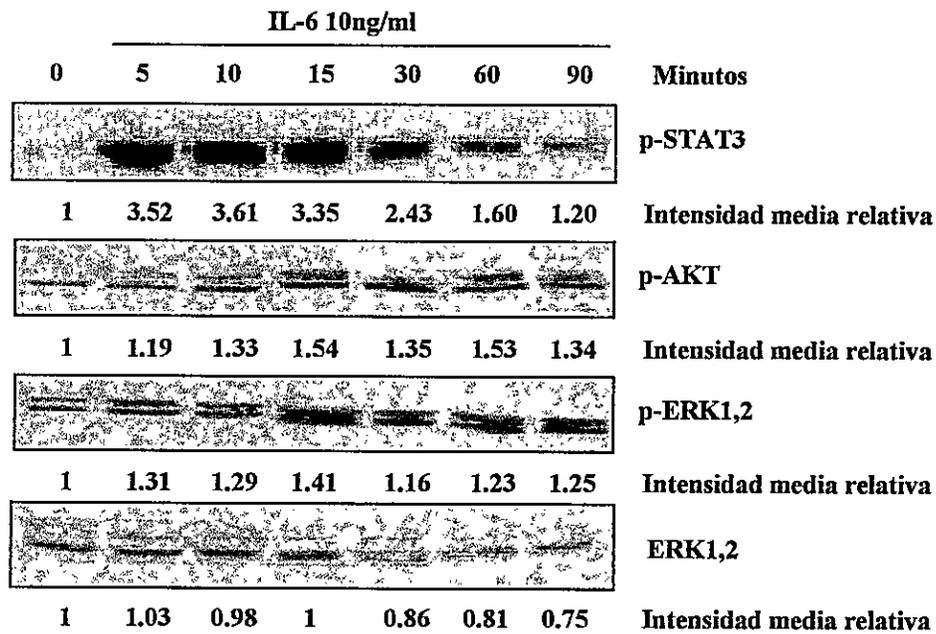


Figura 5. Efecto de IL-6 sobre la activación de las vías de señalización Ras-MAP quinasas JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT. Inmunoblot de lisados celulares previamente incubados con IL-6 (10ng/ml) por los tiempos indicados. En el panel superior se observa la forma activa de STAT3, los paneles siguientes corresponden a las formas activas de AKT, ERK1,2 respectivamente. Como control de carga se utilizó ERK1,2. Intensidad media relativa corresponde al valor de intensidad media de la banda obtenida en el análisis densitométrico dividida por el valor de la banda control.

## **Efecto de los inhibidores PD98059, AG490 y LY294002 sobre las vías de señalización mediadas por IL-6.**

En la figura 6A, se observa que la activación de ERK1,2 en presencia de IL-6 y PD98059, inhibidor de la vía Ras-MAP quinasas, es menor que en presencia de IL-6 solo. Los niveles de fosforilación de ERK1,2 son menores incluso que el nivel basal. En la figura 6B se observa que en presencia de IL-6 y LY294002, inhibidor de la vía PI3K/AKT, se observa una inhibición de un 30% en el nivel de fosforilación de AKT con la concentración de 10 $\mu$ M del inhibidor y de un 80% con la concentración de 20 $\mu$ M con respecto al nivel basal. Al analizar el efecto del inhibidor con respecto al estímulo de IL-6 observamos una disminución de la fosforilación de AKT, con ambas concentraciones de LY294002. Al analizar el efecto de LY294002 sobre la vía de las Ras-MAP quinasas también observamos una inhibición de un 30% y 40% con las dosis de 10 $\mu$ M y 20 $\mu$ M respectivamente de la activación de ERK1,2 en presencia de IL-6.

AG490, inhibidor de la vía JAK1,2-STAT1,3 específicamente de JAK2, afecta las tres vías de señalización estudiadas. Como se observa en la figura 6C, al tratar las células con el inhibidor a la concentración de 20 $\mu$ M e IL-6, no hay disminución de la fosforilación de ERK1,2, por acción de AG490 en cambio cuando se utiliza la concentración de 40 $\mu$ M, se observa una inhibición de un 35% con respecto a IL-6. La activación por IL-6 de AKT es inhibida de manera semejante a la observada en la vía de las Ras-MAP quinasas. Por otra parte la activación por IL-6 de STAT3 disminuye parcialmente y de manera dosis dependiente en presencia del inhibidor de JAK1, 2-STAT1,3.

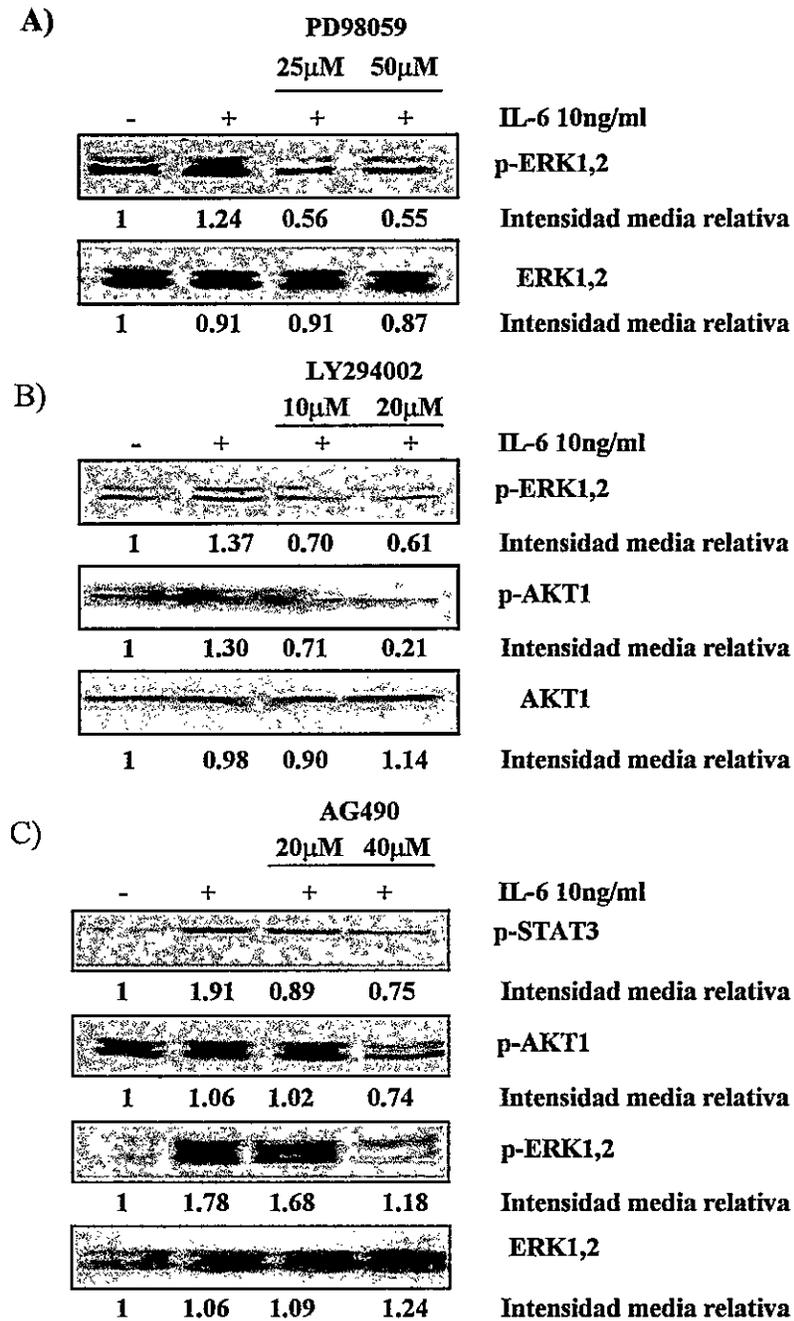


Figura 6. Efecto de los inhibidores de las vías Ras-MAP quinasas, JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT sobre la activación de IL-6 en U266. Inmunoblot de lisados de células tratadas con los distintos inhibidores por 30 minutos y estimuladas con IL-6 (10ng/ml) por 15 minutos. A) PD98059 inhibidor de la activación de Ras-MAP quinasas. B) LY294002 inhibidor de PI3K/AKT. C) AG490 inhibidor de JAK1,2-STAT1,3. Intensidad media Relativa corresponde al valor de la intensidad media de la banda obtenido por análisis densitométrico / por el valor de la banda control.

## **Proliferación celular.**

### **Efecto de los inhibidores PD98059, LY294002 y AG490 sobre proliferación de U266.**

La proliferación celular está determinada por la activación de las vías de señalización mediadas por IL-6, antes analizadas. Con el objeto de corroborar esto en las células de MM utilizadas en este trabajo, estudiamos el efecto de los inhibidores de estas vías sobre dicho proceso.

#### **A) Efecto de PD98059 sobre proliferación**

Como se muestra en la figura 7A, la proliferación de las células U266 aumenta significativamente a los dos y cuatro días de tratamiento con IL-6 10ng/ml respecto al control. Al tratar las células con PD98059, inhibidor de la vía de las Ras-MAP quinasas, se observa una inhibición significativa de la proliferación a los dos y cuatro días de tratamiento con ambas concentraciones utilizadas (25 $\mu$ M y 50  $\mu$ M). Sin embargo al tratar las células con el inhibidor e IL-6 se observa una menor inhibición tanto a los dos como a los cuatro días de tratamiento a ambas concentraciones. Por lo tanto IL-6 revierte parcialmente el efecto anti-proliferativo de PD98059 a ambas concentraciones y a los dos tiempos estudiados.

### **B) Efecto de LY294002 sobre proliferación.**

Como se muestra en la figura 7B al tratar las células U266 con LY294002, inhibidor de la vía PI3K/AKT, se observa una inhibición significativa de la proliferación con respecto al control, tanto a los dos como a los cuatro días de tratamiento a ambas concentraciones utilizadas. A los dos días de tratamiento, la proliferación es inhibida en un 30% con LY294002 10 $\mu$ M y en un 70% con LY294002 20 $\mu$ M. Al combinar LY294002 10 $\mu$ M con IL-6 no se observa inhibición de la proliferación, sin embargo con LY294002 20 $\mu$ M e IL-6 hay una inhibición de un 35%. A los 4 días de tratamiento, la proliferación es inhibida significativamente en un 55% con LY294002 10 $\mu$ M y en un 80% con LY294002 20 $\mu$ M. Al combinar LY294002 con IL-6 hay una menor inhibición con ambas concentraciones del inhibidor siendo de un 35% con LY294002 10 $\mu$ M y de un 70% con LY294002 20 $\mu$ M. Por lo tanto IL-6 revierte el efecto inhibitorio de LY294002 10 $\mu$ M a los dos días y parcialmente a los 4 días; del mismo modo revierte parcialmente el efecto inhibitorio de LY294002 20 $\mu$ M a ambos tiempos estudiados.

### **C) Efecto de AG490 sobre proliferación.**

En la figura 7C se observa que AG490, inhibidor de la vía JAK1,2-STAT1,3, inhibe significativamente la proliferación de las células U266 con respecto al control. A los dos días de tratamiento con AG490 tanto a 20 $\mu$ M como a 40 $\mu$ M la proliferación celular es inhibida en un 35-45% con respecto al control. Al combinar AG490 a ambas concentraciones con IL-6 no se observa un cambio en el nivel de la inhibición. Después de 4 días de tratamiento se observa una mayor inhibición de la proliferación (55%) con AG490 40 $\mu$ M. Sin embargo, en presencia de IL-6 la inhibición se mantiene. Por lo tanto IL-6 a diferencia de lo observado con los otros inhibidores estudiados no revierte el efecto inhibitorio de AG490 sobre la proliferación.

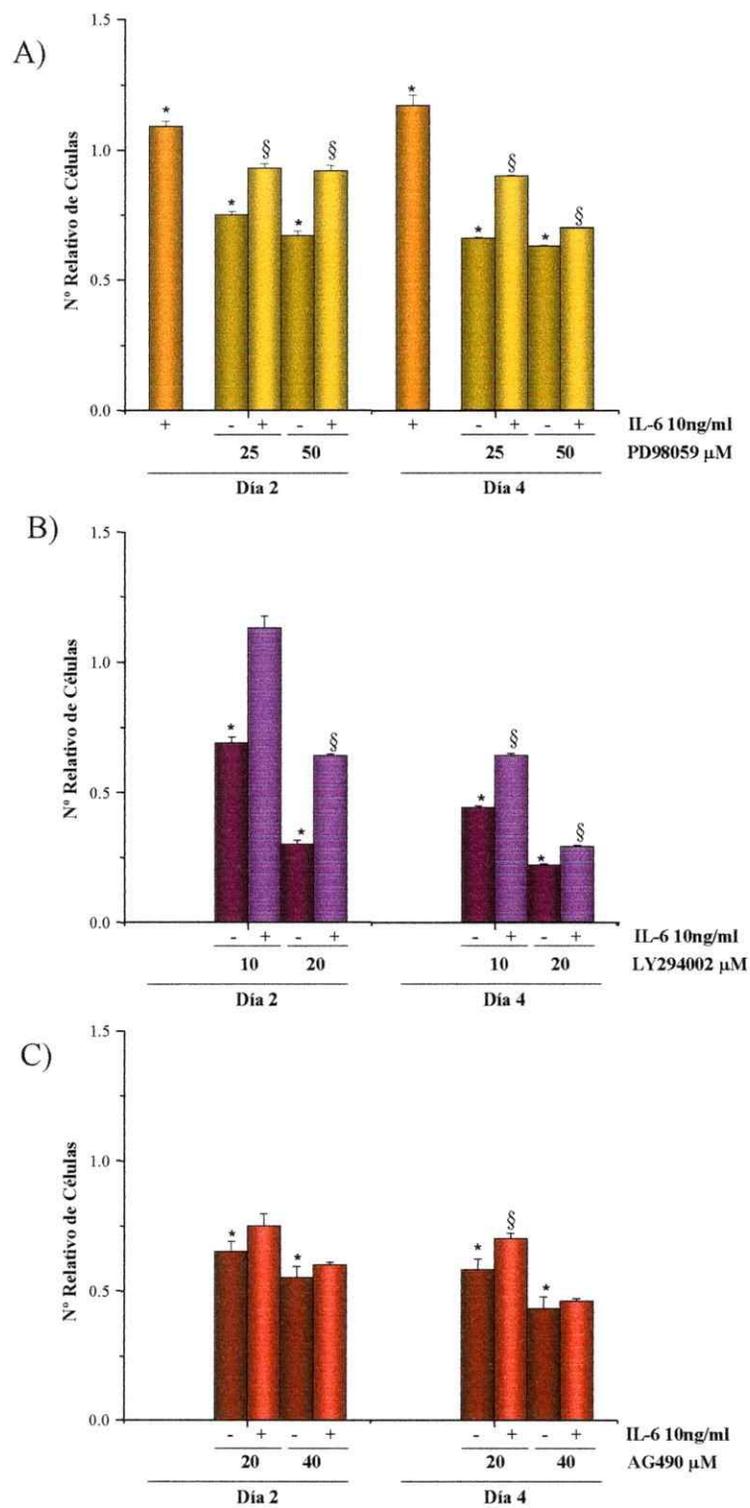


Figura 7. Efecto de los inhibidores de Ras-MAP quinasas, JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT sobre la proliferación de la línea celular U266. A) PD98059. B) LY294002. C) AG490. Nº Relativo de Células corresponde a: Nº de células tratadas (Inhibidor y/o IL-6) / Nº de células sin tratar. Los datos son el promedio de 3 experimentos,  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  vs control;  $\S$ ,  $P < 0.05$  vs células tratadas con inhibidor.

## **Análisis del ciclo celular y Apoptosis de las células de Mieloma Múltiple.**

Dado los resultados obtenidos en el análisis de la proliferación, en que observamos que LY294002 y AG490 disminuyen la proliferación en un porcentaje mayor que PD98059, determinamos el efecto de la inhibición de las vías PI3K/AKT y JAK1,2-STAT1,3, que median la acción de IL-6, sobre el ciclo celular y apoptosis.

### **Efecto de LY294002 en el ciclo celular y Apoptosis.**

Como se señala en la Tabla I, al tratar las células con el inhibidor de la vía PI3K/AKT observamos que el porcentaje de células en G0-G1 aumenta significativamente con respecto al control, alcanzando un  $89.4\% \pm 1.27$  del total con LY294002  $20\mu\text{M}$  versus  $68.1\% \pm 0.59$  con un  $p < 0.0002$ . El porcentaje de células en G2-M disminuye a medida que aumentamos la concentración de LY294002. En la condición control el porcentaje de células en esta fase corresponde a un  $2.5\% \pm 0.41$  y con  $20\mu\text{M}$  del inhibidor este porcentaje disminuye significativamente a un  $0.4\% \pm 0.2$  ( $p < 0.0057$ ). Se observa también una disminución significativa de las células en fase S desde un  $29.5\% \pm 0.32$  en la condición control a un  $10.3\% \pm 1.46$  ( $p < 0.002$ ) en las tratadas con LY294002  $20\mu\text{M}$ . Como se aprecia en la figura 8 no se observa un peak sub-haploide (azul) antes de G0-G1, lo que nos indica que LY294002 no induce apoptosis a ninguna de las concentraciones utilizadas. Cuando las células son tratadas con LY294002  $20\mu\text{M}$  e IL-6 el porcentaje de células en G0-G1 disminuye significativamente desde un  $89.4\% \pm 1.27$  con el inhibidor solo a un  $80.9 \pm 2.61$  ( $p < 0.0016$ ) y aumenta significativamente el porcentaje de células en la fase S desde un  $10.3\% \pm 1.46$  con el inhibidor solo a un  $18.5 \pm 2.74$  ( $p < 0.0021$ ). Por lo tanto, LY294002

detiene el ciclo celular de las células U266 en la fase G0-G1 posiblemente provocando una situación de quiescencia celular, disminuye el porcentaje de células en fase S y no induce apoptosis. IL-6 revierte parcialmente el efecto de LY294002 en el ciclo celular.

Tabla I: Ciclo celular de U266 tratadas con LY294002.

	G0-G1	P-valor	G2-M	P-valor	S	P-valor	Apoptosis
Control	68.1 ± 0.59		2.5 ± 0.41		29.5 ± 0.32		0
IL-6	59.7 ± 0.37	*0.0138	2.7 ± 0.41	1	37.6 ± 0.42	*0.0161	0
LY10	76.5 ± 0.79	*0.0144	1.4 ± 0.35	*0.9465	22.1 ± 0.46	*0.0423	0
LY10IL-6	70.6 ± 0.59	§0.3672	0.2 ± 0.09	§0.1032	29.2 ± 0.51	§0.1009	0
LY20	89.4 ± 1.27	*0.0002	0.4 ± 0.20	*0.0057	10.3 ± 1.46	*0.0002	0
LY20IL-6	80.9 ± 2.61	§0.0016	0.6 ± 0.15	§0.9965	18.5 ± 2.74	§0.0021	0

Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos, ± SEM.

ANOVA, F=61.65, g.l.= 10, 42, p<0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con LY294002.

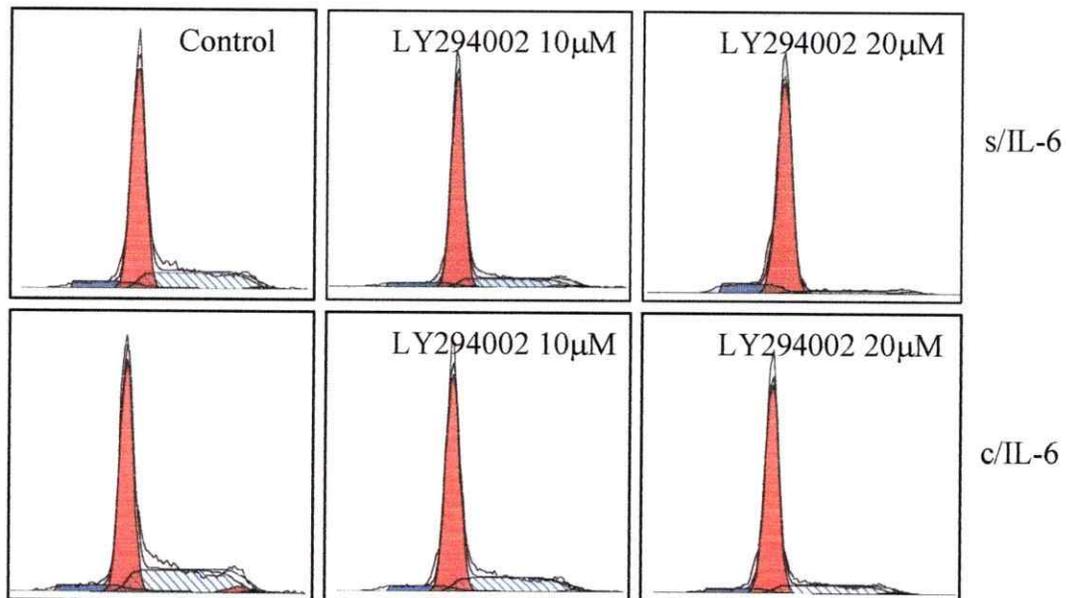


Figura 8. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con LY294002 inhibidor de PI3K/AKT. Las células fueron cultivadas en presencia de LY294002 por 72 horas. El peak en rojo corresponde al porcentaje de células en G0-G1.

### **Efecto de AG490 en el ciclo celular.**

Como se señala en la tabla II, al tratar las células con el inhibidor AG490, el porcentaje de células en la fase G0-G1 aumenta significativamente con respecto al control; el porcentaje de células controles en esta fase es de un  $68.1\% \pm 0.59$  y cuando se utiliza la concentración más alta del inhibidor ( $40\mu\text{M}$ ) este porcentaje aumenta a un  $80.0\% \pm 0.82$  ( $p < 0.0002$ ). Hay una disminución significativa de las células que se encuentran en G2-M, desde un  $2.5\% \pm 0.41$  en la condición control a un  $0\%$  ( $p < 0.0002$ ) al usar ambas concentraciones de AG490. El porcentaje de células en la fase S también disminuye significativamente desde un  $29.5\% \pm 0.32$  en la condición control a un  $19.9\% \pm 0.82$  ( $p < 0.0003$ ) con  $40\mu\text{M}$  de AG490. En la Tabla II, en la figura 9 y figura 10, se señala también que AG490 induce apoptosis de las células U266 de manera dosis dependiente. Al usar la menor concentración ( $20\mu\text{M}$ ) del inhibidor se observa un  $18.2\% \pm 0.41$  de células apoptóticas, llegando a un  $69.3\% \pm 2.12$  con AG490  $40\mu\text{M}$ . Al tratar las células con el inhibidor y en presencia de IL-6 el porcentaje de células en la fase G0-G1 y en la fase S no cambia significativamente con respecto al inhibidor solo. El porcentaje de células en apoptosis es menor que con AG490 solo; en presencia de AG490  $20\mu\text{M}$  e IL-6 el porcentaje de células apoptóticas es de  $12.3\% \pm 1.06$  y en presencia de AG490  $40\mu\text{M}$  e IL-6 es de  $52.6\% \pm 3.03$ . Por lo tanto, IL-6 es capaz de rescatar parcialmente a las células en apoptosis a cualquiera de las concentraciones del inhibidor utilizadas.

Tabla II: Ciclo celular de U266 tratadas con AG490

	G0-G1	P-valor	G2-M	P-valor	S	P-valor	Apoptosis	P-valor
Control	68.1 ± 0.59		2.5 ± 0.41		29.5 ± 0.32		0	
IL-6	59.7 ± 0.37	*0.0012	2.7 ± 0.41	*1	37.6 ± 0.42	*0.0014	0	*1
AG20	73.8 ± 1.17	*0.1908	0	*0.0002	26.6 ± 1.17	*0.9579	18.2 ± 0.41	*0.0001
AG20IL-6	68.9 ± 2.41	§0.6108	2.5 ± 0.06	§0.0002	28.5 ± 2.31	§0.9998	12.3 ± 1.06	§0.0220
AG40	80.0 ± 0.82	*0.0002	0	*0.0002	19.9 ± 0.82	*0.0003	69.3 ± 2.12	*0.0001
AG40IL-6	77.1 ± 2.07	§0.9715	0.6 ± 0.06	§0.0426	22.3 ± 2.11	§0.9967	52.6 ± 3.03	§0.0001

Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos, ± SEM.

Ciclo Celular: ANOVA, F=45.164, g.l.= 10, 42, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con AG490.

Apoptosis: ANOVA, F=757.03, g.l.= 5,14, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con AG490.

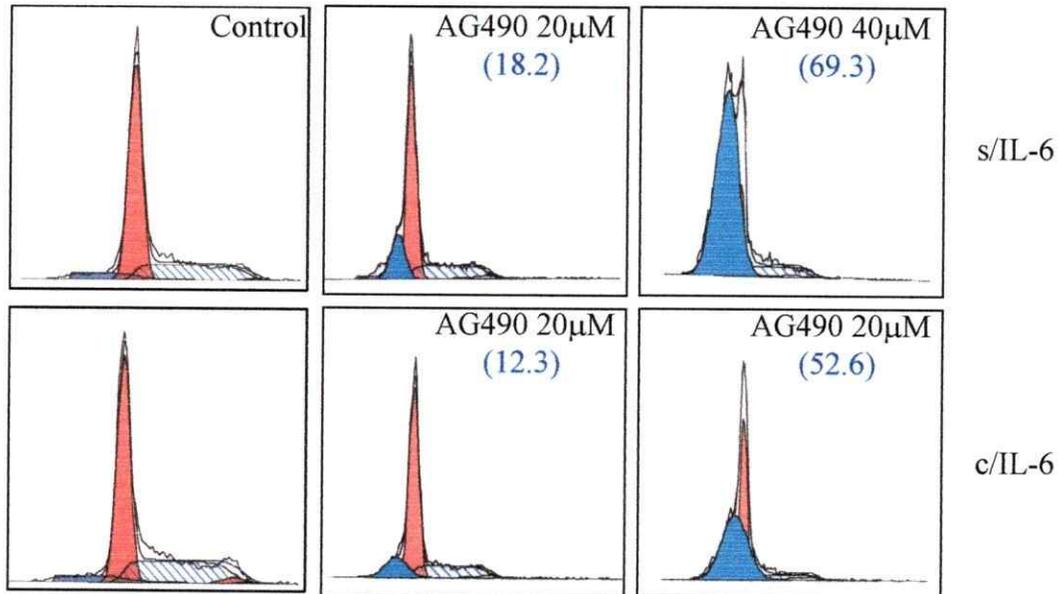


Figura 9. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con el inhibidor de JAK2 AG490. Las células se preincubaron con AG490 por 30 minutos, se les agregó o no IL-6 y se cultivaron por 72 horas. El peak en rojo corresponde al porcentaje de células en G0-G1 y el peak azul corresponde a las células en apoptosis. ( ): % de células apoptóticas.

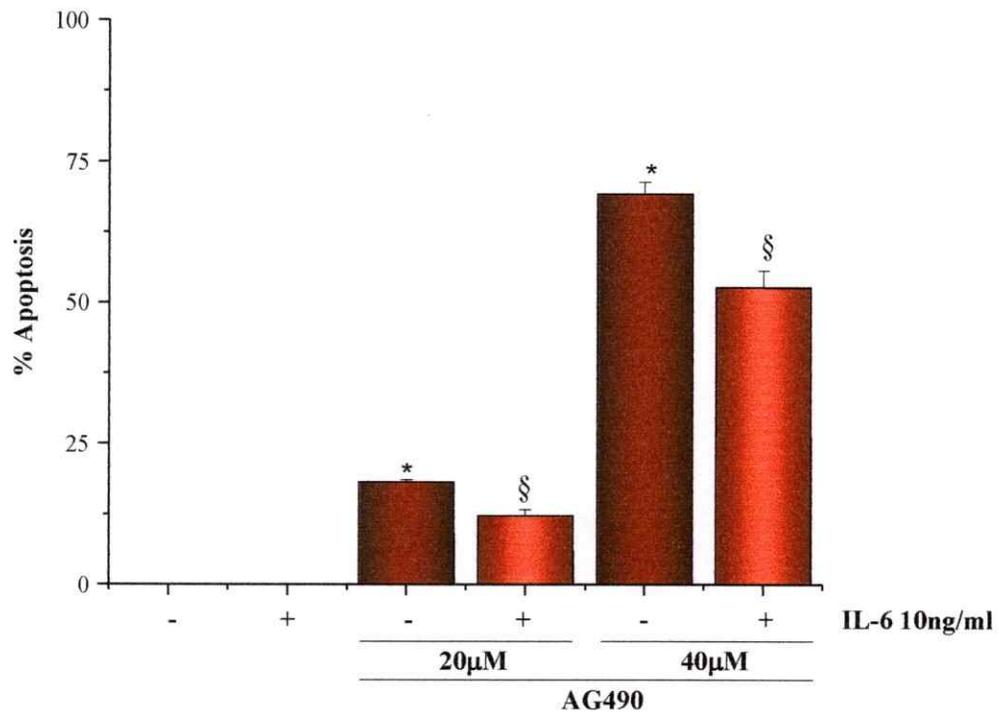


Figura 10. Grafico del % de Apoptosis vs Concentración de AG490. Los % de apoptosis se obtuvieron por citometria de flujo. Las células se trataron con AG490 durante 72 horas. Los datos son el promedio de 3 experimentos  $\pm$  SEM. ANOVA,  $F= 757.03$ ,  $g.l.= 5,14$ ,  $* p< 0.001$  vs control;  $\S p< 0.001$  vs células tratadas con AG490.

## **Acción de Talidomida sobre las células de MM.**

El interés central de esta tesis radicó en la acción de Talidomida sobre las células de MM. Con este objeto analizamos, en la línea celular U266, el efecto de Talidomida sobre la proliferación/sobrevida, apoptosis y las vías de transducción de señales que median la acción de IL-6.

### **Efecto de Talidomida sobre la proliferación de U266.**

Como se muestra en la figura 11A, el tratamiento con Talidomida provoca una inhibición significativa, dosis dependiente, de la proliferación de las células U266. En la figura 11B, se observa que al tratar las células con Talidomida a 200 o 400 $\mu$ g/ml e IL-6 la inhibición de la proliferación es menor con respecto a aquella observada con Talidomida sola.

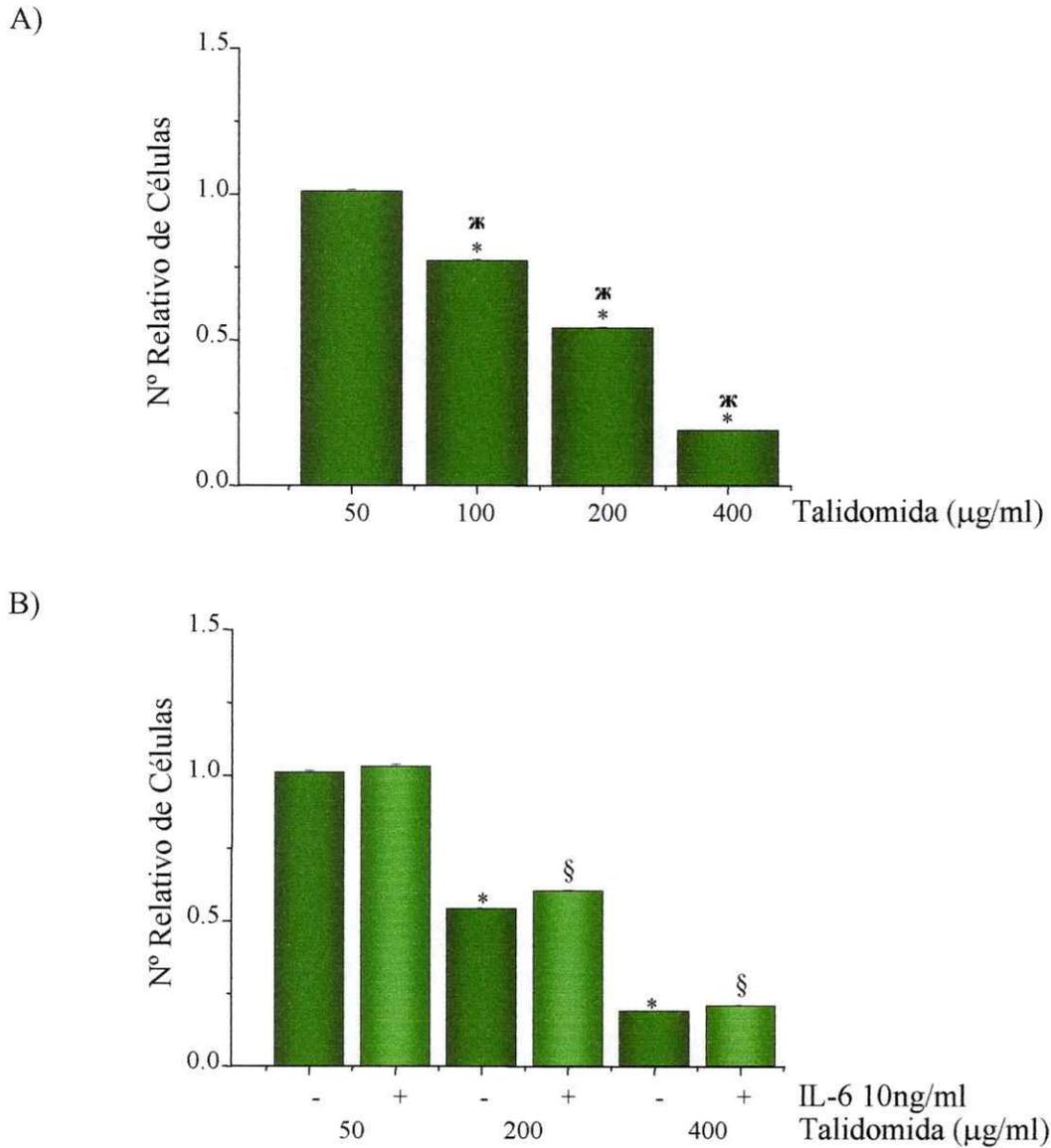


Figura 11. Efecto de Talidomida sobre la proliferación celular de células U266. A) Proliferación de U266 tratadas con distintas concentraciones de Talidomida. Las células fueron cultivadas en presencia de Talidomida 50, 100, 200 y 400µg/ml durante cuatro días. B) Efecto de Talidomida e IL-6 sobre la proliferación celular de U266. Las células fueron preincubadas con Talidomida (50, 200 y 400µg/ml) por 30 minutos, luego fueron estimuladas con IL-6 10ng/ml y cultivadas por cuatro días. El Nº Relativo de Células corresponde a: Nº de células tratadas (Talidomida y/o IL-6) / Nº de células sin tratar (control). Los datos son el promedio de 4 experimentos  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  vs control; ⌘,  $P < 0.05$  vs células tratadas con Talidomida a la concentración inmediatamente menor; §,  $P < 0.05$  vs células tratadas con igual concentración de Talidomida.

## Efecto de Talidomida en el ciclo celular.

Como se observa en la tabla III, el porcentaje de células en la fase G0-G1 aumenta significativamente en presencia de Talidomida 200µg/ml y 400µg/ml, alcanzando un máximo con la concentración mayor (86.2% ± 2.07 versus 68.1% ± 0.59 p< 0.0002). El porcentaje de células en la fase S disminuye significativamente en presencia de Talidomida 100µg/ml a 400µg/ml, con respecto al control. A la concentración mayor de Talidomida se obtiene el menor porcentaje de células en la fase S (13.9% ± 2.07 versus 29.5% ± 0.32 p< 0.0002). Así también, y como se señala en la tabla IV y en la figura 12, Talidomida induce apoptosis de manera dosis dependiente, alcanzándose un máximo de células apoptóticas a la concentración de 400µg/ml (55.8% ± 0.86 versus 0% p< 0.0001).

Tabla III: Ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida.

	G0-G1	*P-valor	ЖP-valor	G2-M	*P-valor	ЖP-valor	S	*P-valor	ЖP-valor
Control	68.1 ± 0.59			2.51 ± 0.41			29.5 ± 0.32		
Tal 50	64.6 ± 0.45	0.9979		10.8 ± 1.87	0.0004		24.6 ± 2.18	0.9262	
Tal 100	74.4 ± 2.01	0.6909	0.1036	9.11 ± 0.83	0.0037	0.9999	17.1 ± 2.28	0.0029	0.235
Tal 200	81.2 ± 2.79	0.0021	0.4185	1.42 ± 0.22	0.9976	0.0002	17.4 ± 2.67	0.0041	1
Tal 400	86.2 ± 2.07	0.0002	0.7831	0	0.0018	0.0468	13.9 ± 2.07	0.0002	0.9789

Los valores corresponden al promedio de 4 experimentos, ± SEM.

Ciclo Celular: ANOVA, F=31.514, g.l.= 8, 45, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. Ж Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con Talidomida a la concentración inmediatamente menor.

Tabla IV: Apoptosis de U266 tratadas con Talidomida.

Apoptosis	*P-valor	ЖP-valor
0		
11.4 ± 1.73	0.0001	
23.3 ± 1.49	0.0001	0.0001
36.9 ± 1.61	0.0001	0.0001
55.8 ± 0.86	0.0001	0.0001

Los valores corresponden al promedio de 4 experimentos, ± SEM.

Apoptosis: ANOVA, F=423.963, g.l.= 4,14, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control.

\* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. Ж Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con Talidomida a la concentración inmediatamente menor.

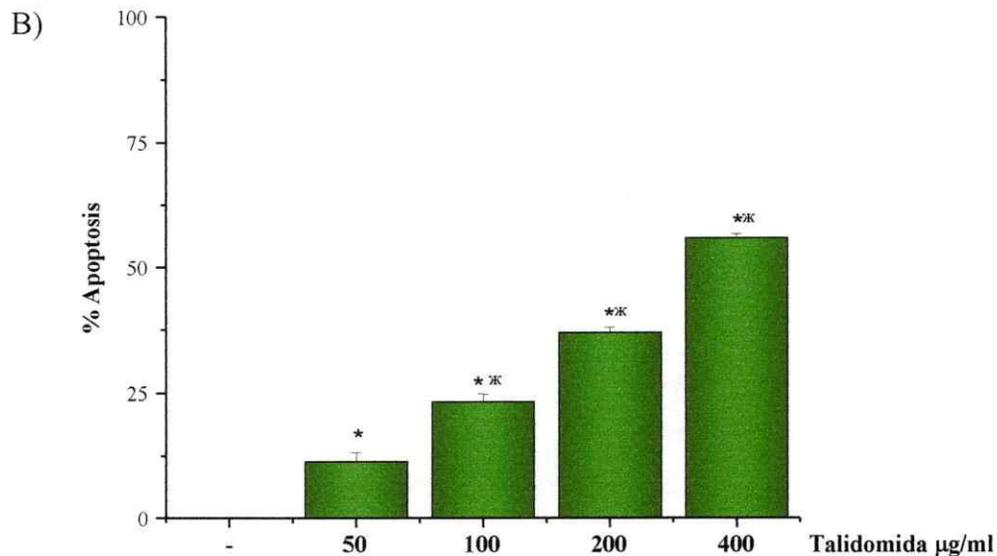
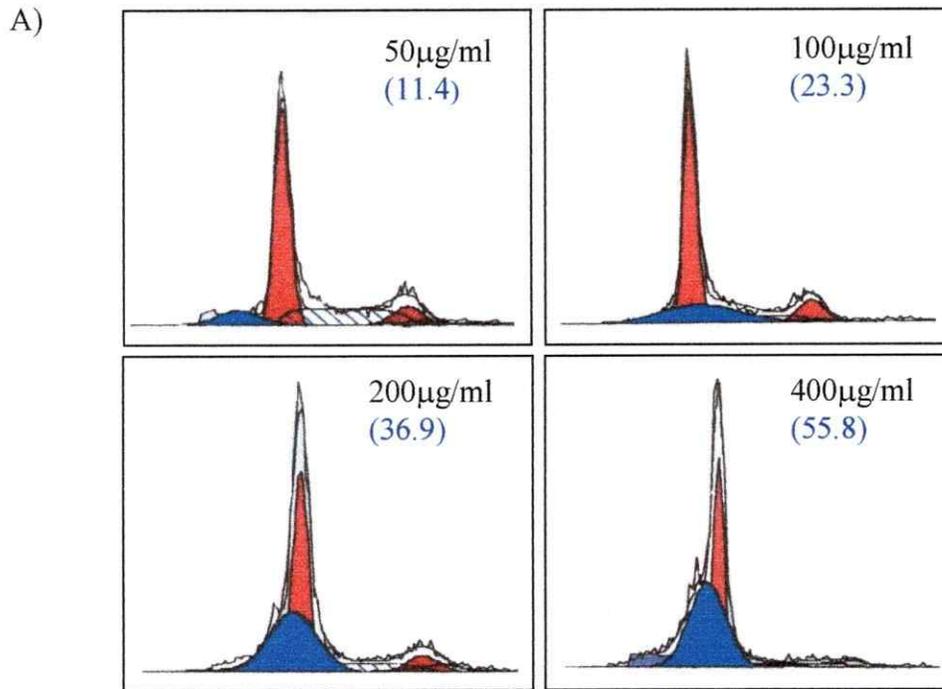


Figura 12. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida. A) Las células fueron cultivadas en presencia de Talidomida (50, 100, 200 y 400mg/ml) por 72 horas. El peak en rojo corresponde al porcentaje de células en G0-G1 y el peak azul corresponde a las células en apoptosis. ( ): % de células apoptóticas. B) Gráfico del % de Apoptosis vs. Concentración de Talidomida. Los % de apoptosis se obtuvieron por citometría de flujo. Las células U266 se trataron o no (control) con diferentes concentraciones de Talidomida durante 72 horas. Los datos son el promedio a 4 experimentos  $\pm$  SEM. ANOVA,  $F=423.963$ , g.l.= 4,14,  $p < 0.001$ . \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. Ж Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con Talidomida a la concentración inmediatamente menor.

Como se indica en la tabla V, al tratar las células con Talidomida e IL-6 el porcentaje de éstas en la fase G0-G1 no cambia significativamente con respecto a Talidomida sola. En cambio el porcentaje de células en la fase S aumenta significativamente con Talidomida 50µg/ml (31.2% ± 10.8 versus 24.6% ± 2.18 p< 0.0012) y 200µg/ml (22.7% ± 1.07 versus 17.4% ± 2.67 p< 0.0002) e IL-6, con respecto a Talidomida sola. Como se muestra en las figuras 13 A y B, el porcentaje de células en apoptosis por acción de Talidomida disminuye significativamente en presencia de IL-6. A la concentración menor de Talidomida (50µg/ml) e IL-6, no se observa apoptosis (11,4% ± 1.73 versus 0% p<0.0001). A la concentración más alta de Talidomida (400µg/ml), IL-6 disminuye de un 55.8 ± 0.86 a 37.6 ± 2.21 (p<0,0001) el porcentaje de células en apoptosis.

Tabla V: Ciclo celular de U266 tratadas con Talidomida e IL-6.

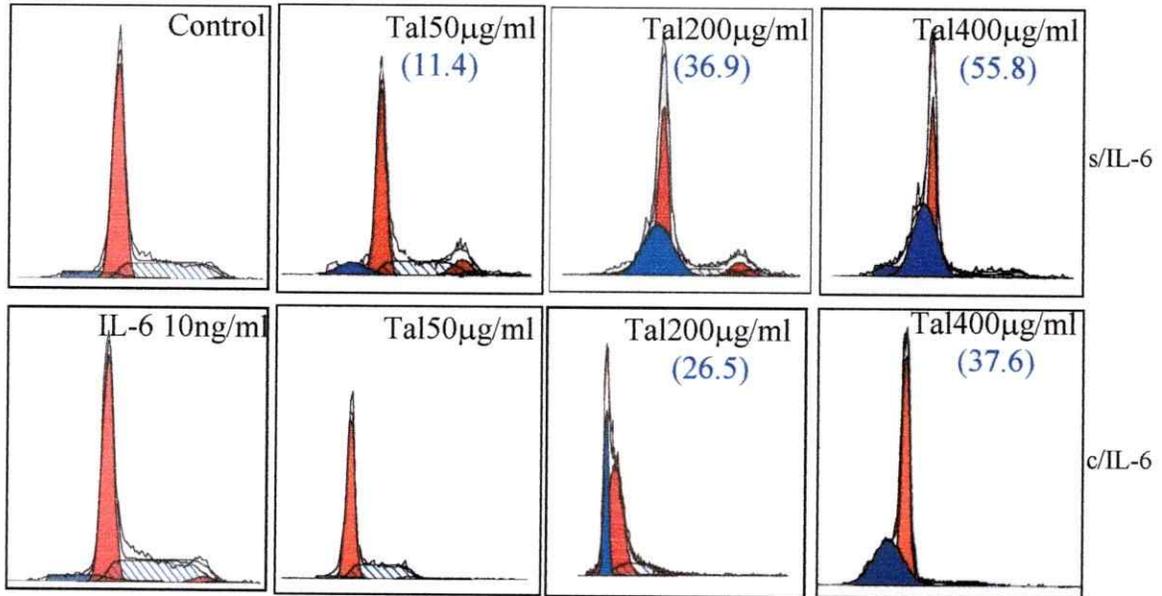
	G0-G1	P-valor	G2-M	P-valor	S	P-valor	Apoptosis	P-valor
Control	68.1 ± 0.59		2.51 ± 0.41		29.5 ± 0.32		0	
IL-6	59.7 ± 0.37	*0.2889	2.71 ± 0.41	*1	37.6 ± 0.42	*0.3131	0	*1
Tal 50	64.6 ± 0.45	*0.9997	10.8 ± 1.87	*0.0002	24.6 ± 2.18	*0.9531	11.4 ± 1.73	*0.0001
Tal 50 IL-6	63.7 ± 0.64	§0.9937	5.11 ± 0.34	§0.0855	31.2 ± 10.8	§0.0012	0	§0.0001
Tal 200	81.2 ± 2.79	*0.0035	1.41 ± 0.22	*0.9997	17.4 ± 2.67	*0.0007	36.9 ± 1.61	*0.0001
Tal 200 IL-6	75.9 ± 1.29	§0.7769	1.42 ± 0.24	§1	22.7 ± 1.07	§0.0002	26.5 ± 0.82	§0.0001
Tal 400	86.2 ± 2.07	*0.0002	0	*0.0003	13.9 ± 2.07	*0.0002	55.8 ± 0.86	*0.0001
Tal 400 IL-6	82.4 ± 2.62	§0.9815	2.31 ± 0.47	§0.0198	15.4 ± 2.55	§0.7220	37.6 ± 2.21	§0.0001

Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos, ± SEM.

Ciclo Celular: ANOVA, F=37.844, g.l.= 2, 72, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con Talidomida.

Apoptosis: ANOVA, F=625.743, g.l.= 7,24, p< 0.001. \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con igual concentración de Talidomida.

A)



B)

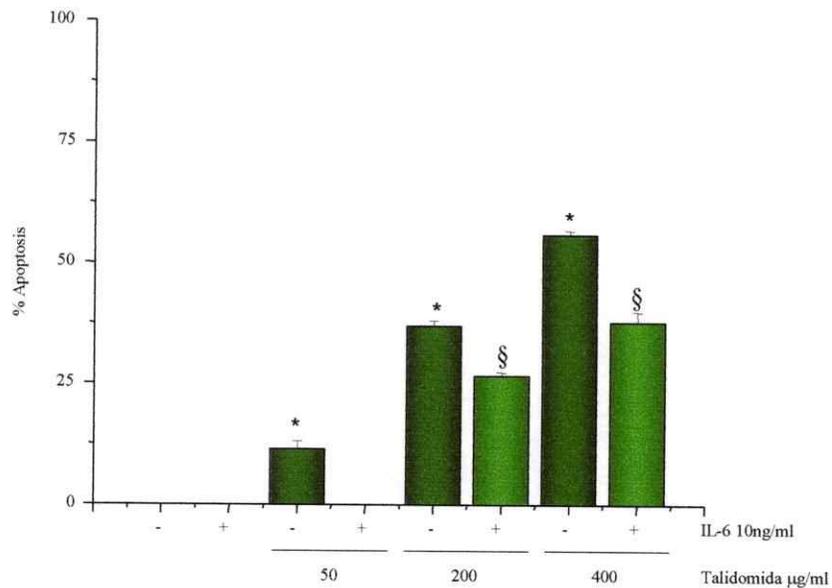


Figura 13. Citometría de flujo para el efecto de Talidomida e IL-6 en el ciclo celular de U266. A) Las células fueron preincubadas con Talidomida (50, 200 y 400µg/ml) por 30 minutos, a continuación se les agregó IL-6 10ng/ml y se cultivaron por 72 horas. En rojo observamos el peak correspondiente a las células en la fase G0-G1 y en azul el peak correspondiente a las células apoptóticas. B) Gráfico del % de Apoptosis vs. Concentración de Talidomida. Los % de apoptosis se obtuvieron por citometría de flujo. Las células U266 se preincubaron o no (control) con diferentes concentraciones de Talidomida durante 30 minutos, luego se agregó IL-6 y se cultivaron por 72 horas. Los datos son representativos a 4 experimentos. Los datos son el promedio de 4 experimentos  $\pm$  SEM. ANOVA,  $F=625.743$ ,  $g.l.=7,24$ ,  $p<0.001$ . \* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas igual concentración de Talidomida.

En la tabla VI y figura 14, se muestra que Talidomida no induce apoptosis de las células U266 a las 24 horas de tratamiento. A partir de las 48 horas de tratamiento ya se observa apoptosis en estas células; a este tiempo un  $24.4\% \pm 0.81$  de células son apoptóticas ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, este efecto no se observa cuando las células son tratadas con Talidomida e IL-6 por 48 horas. A las 72 horas de tratamiento con Talidomida se observa un  $55.8\% \pm 0.86$  de células en apoptosis. A este tiempo y en presencia de IL-6 el porcentaje de células en apoptosis disminuye significativamente. ( $55,8\% \pm 0.86$  versus  $37.6\% \pm 2.21$ ,  $p < 0,0001$ )

Tabla VI: Cinética Apoptosis de células U266 tratadas con Talidomida.

	% Apoptosis	P-valor
Tal 400µg/ml 24Hrs	0	*1
Tal 400µg/ml IL-6 24Hrs	0	*1
Tal 400µg/ml 48Hrs	$24.4 \pm 0.81$	*0.0001
Tal 400µg/ml IL-6 48Hrs	0	§0.0001
Tal 400µg/ml 72Hrs	$55.8 \pm 0.86$	*0.0001
Tal 400µg/ml IL-6 72Hrs	$37.6 \pm 2.21$	§0.0001

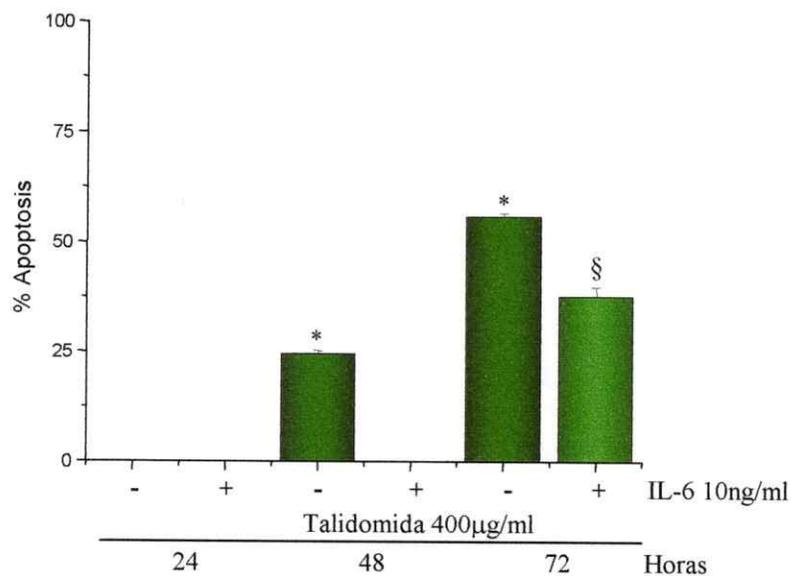


Figura 14. Cinética de apoptosis. Las células fueron cultivadas en presencia de 400µg/ml de Talidomida e IL-6 10ng/ml por 24, 48 y 72 horas. Los experimentos son el promedio de 3 experimentos ± SEM.

\* Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs control. § Prueba de Tukey a posteriori (HSD) P-valor vs células tratadas con igual concentración de Talidomida.

Por lo tanto, podemos decir que Talidomida es capaz de detener el ciclo celular en G0-G1, disminuir el porcentaje de células en la fase S e inducir apoptosis de manera dosis dependiente y que IL-6 contrarresta el efecto de 50µg/ml y 200µg/ml de la droga en la fase S y disminuye significativamente el porcentaje de células apoptóticas a todas las concentraciones de Talidomida estudiadas.

### **Talidomida en la localización subcelular de NFκ-β.**

Dado que según la literatura NFκ-β tiene un rol antiapoptótico y pro-crecimiento en células de MM, analizamos el efecto de Talidomida en la activación de dicho factor de transcripción. Para llevar a cabo este análisis determinamos la localización subcelular de NFκ-β mediante inmunofluorescencia.

Las células control presentaron una localización de NF-κβ tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 15A). Este factor de transcripción se encuentra en el citoplasma en forma inactiva formando un complejo con Iκβ; cuando es activado se transloca al núcleo para unirse a los promotores de sus genes diana. Nuestros resultados sugieren por lo tanto que, en la línea celular U266, NFκ-β se encuentra constitutivamente activo. Al analizar los núcleos marcados con DAPI no se observan evidencias que indiquen que las células están en procesos apoptóticos, los núcleos se encuentran homogéneos en su contenido, y no se observó una agrupación o fragmentación del contenido nuclear (Figura 15B). Por otra parte, el tratamiento por 48 horas con Talidomida (400 μg/ml) mostró una inmunotinción negativa en los núcleos de las U266 para NFκ-β, observándose solo una distribución citoplasmática (Figura 15C). A analizar la tinción nuclear con DAPI, se observó una fragmentación del contenido nuclear lo que sugiere apoptosis de las células (Figura 15D), de acorde con los datos presentados anteriormente.

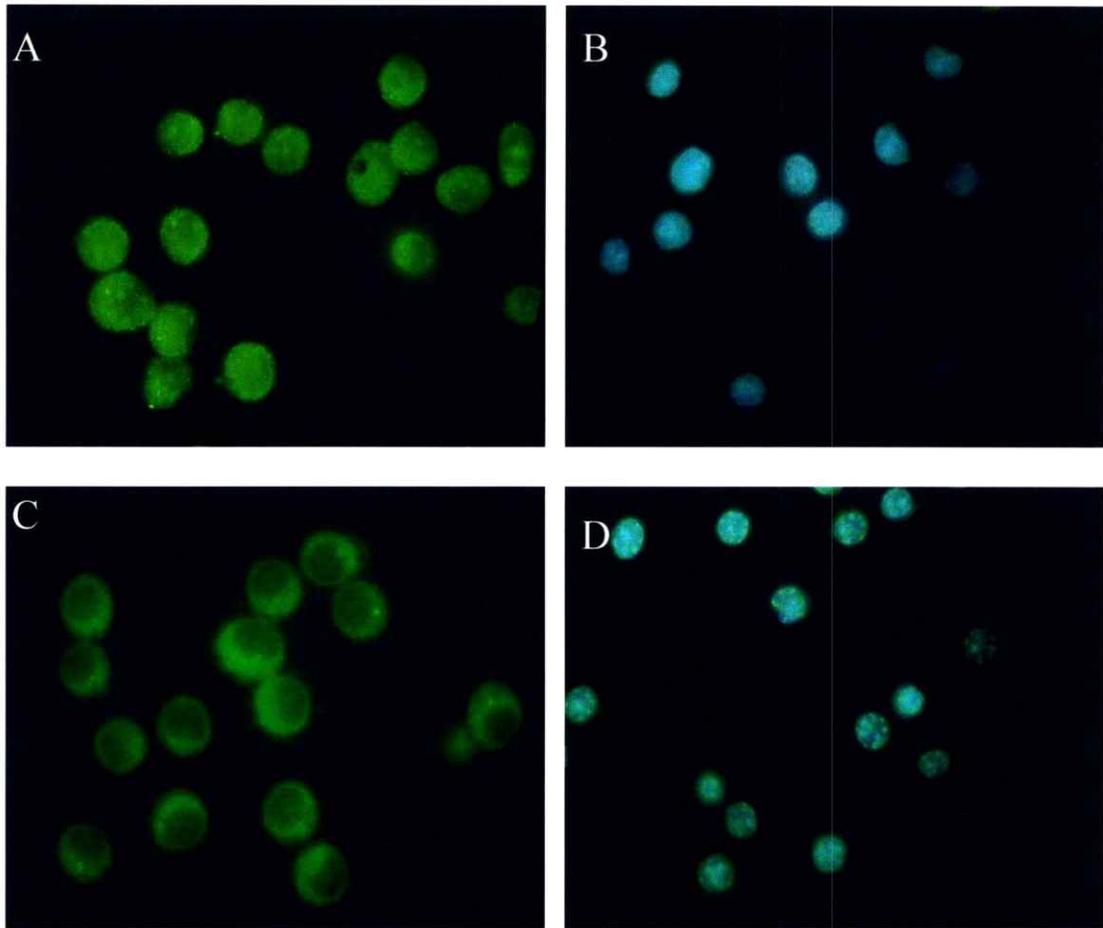


Figura 15. Efecto de Talidomida en la localización de  $\text{NF}\kappa\text{-}\beta$  y contenido nuclear en U266. En los paneles A y C se observa por inmunofluorescencia la localización de  $\text{NF}\kappa\text{-}\beta$  en células controles y en células tratadas por 48 horas con Talidomida (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). En los paneles B y D, se presentan los núcleos de células en condición control y de células tratadas por 48 horas con Talidomida (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) respectivamente. En las células tratadas con Talidomida se observa fragmentación del contenido nuclear. Aumento 100X

Hasta ahora nuestros resultados indican que Talidomida se comporta de manera similar que los inhibidores de las vías JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT en proliferación, ciclo celular y apoptosis. Con el objeto de conocer si Talidomida se comportan de manera similar a estos inhibidores también en la translocación de NFk- $\beta$ , las células fueron tratadas con AG490 (40 $\mu$ M) y LY294002 (20 $\mu$ M) y analizadas por inmunofluorescencia.

En la figura 16, se puede observar que tanto las células tratadas con AG490 como las tratadas con LY294002 presentan los núcleos vacíos, no hay expresión nuclear de NFk- $\beta$  y por lo tanto no hay translocación de NFk- $\beta$  al núcleo. Este efecto es por lo tanto similar al observado cuando las células son tratadas con Talidomida.

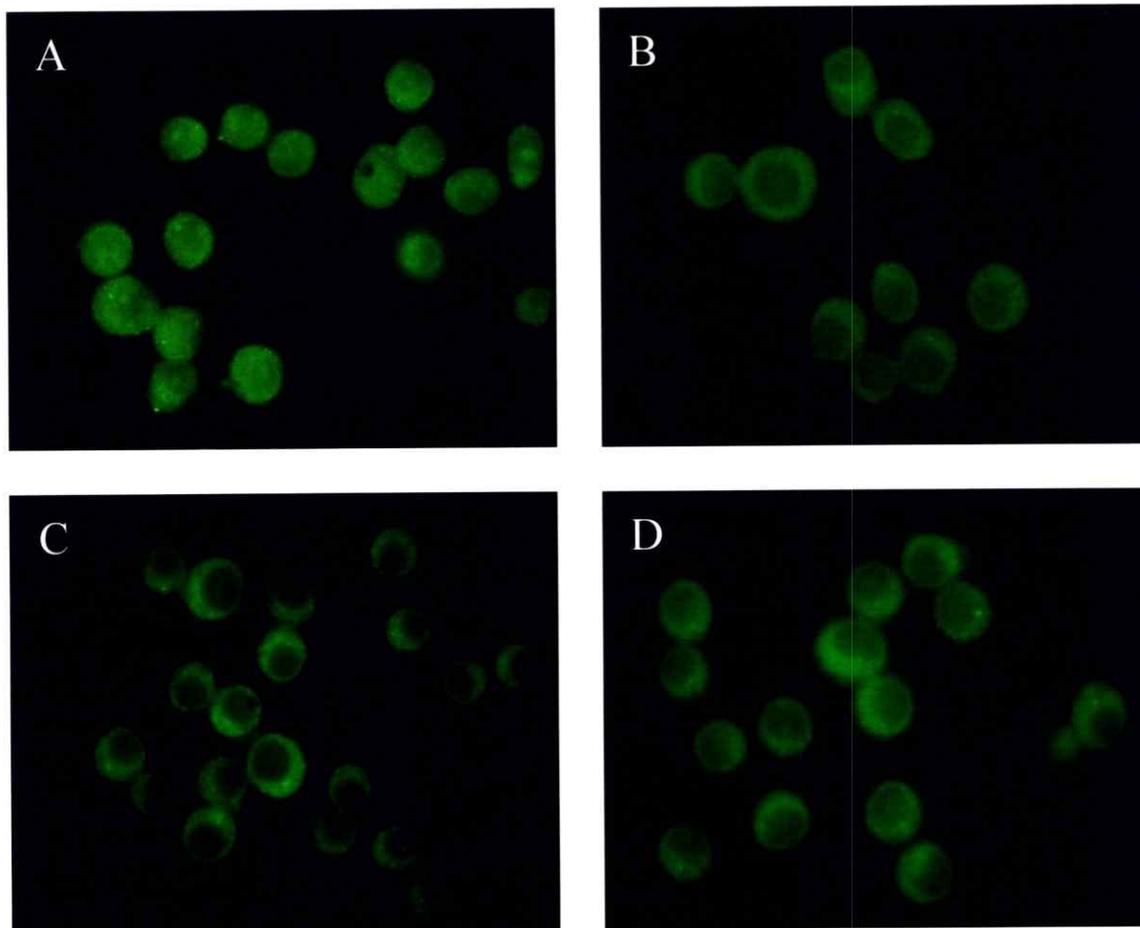


Figura 16. Inmunofluorescencia para  $\text{NF}\kappa\text{-}\beta$ . A) Células Control. B) Células tratadas con AG490  $40\mu\text{M}$ . C) Células tratadas con LY294002  $20\mu\text{M}$ . D) Células tratadas Talidomida  $400\mu\text{g/ml}$ . Aumento 100x.

## **Talidomida sobre las vías de señalización mediadas por IL-6.**

En la figura 17, podemos observar que al tratar las células con Talidomida hay una inhibición de la activación de la vía Ras-MAP quinasas, analizada por la fosforilación de ERK1,2. A la concentración de 400µg/ml de la droga, la activación de ERK1,2 es un 28% menor con respecto al nivel basal. Así mismo, cuando las células son tratadas con Talidomida e IL-6, la activación de ERK1,2 es un 30% menor con respecto a la activación alcanzada con IL-6 sola.

Al analizar el efecto de esta droga sobre la vía JAK1,2-STAT1,3 particularmente sobre la fosforilación de STAT3, se observa una inhibición de un 50% en la activación de STAT3 con respecto a la condición basal. Cuando las células son tratadas con Talidomida e IL-6 se observa una activación de la vía que es un 70% menor que la activación provocada por IL-6 sola.

La activación de la vía PI3K/AKT es también afectada por el tratamiento con Talidomida. Los niveles de fosforilación de AKT1 en células tratadas con Talidomida son menores en un 20% a los niveles en la condición control. Cuando las células son tratadas con la droga e IL-6, se observa una disminución en la activación de AKT1 de un 32% con respecto a la activación de IL-6 sola.

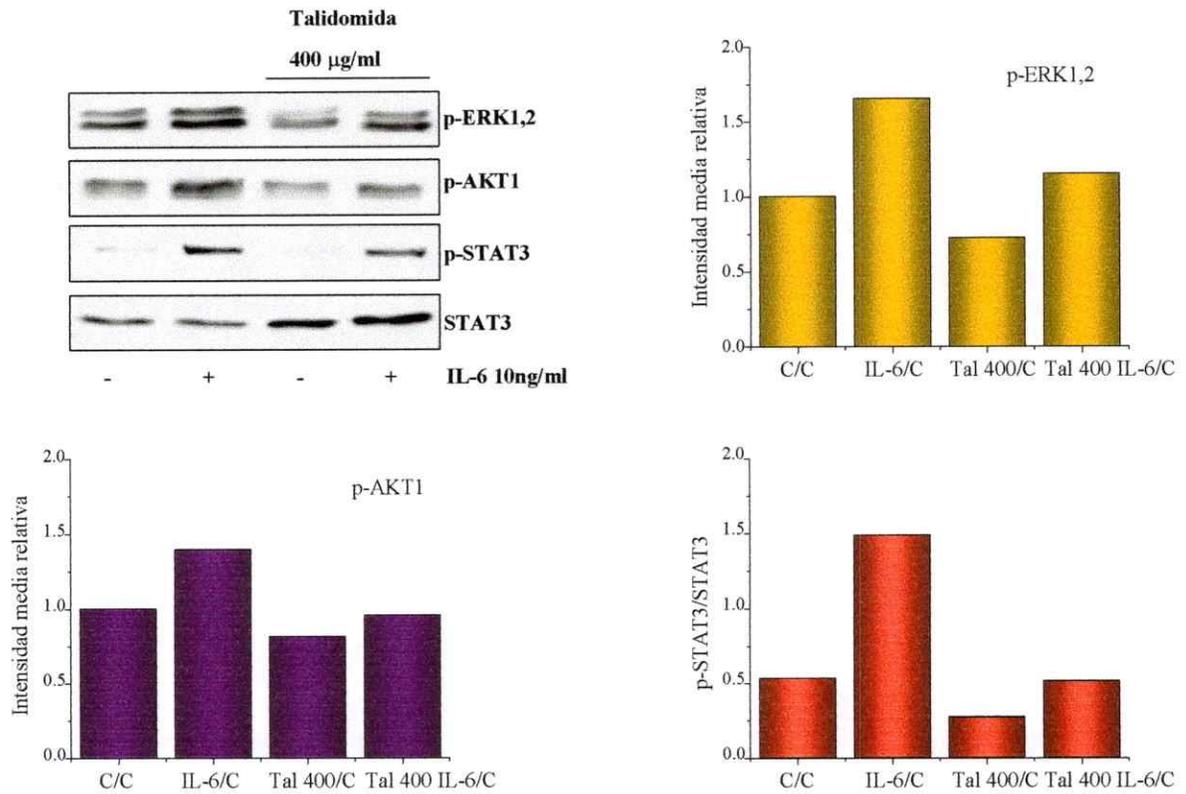


Figura 17. Efecto de Talidomida sobre las vías de activación Ras-MAP quinasas, JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT mediadas por IL-6. Inmunoblot de lisados de células tratadas con Talidomida 400µg/ml por 30 minutos y estimuladas con IL-6 10ng/ml por 15 minutos. En el panel superior se observa el efecto sobre la forma activa de ERK1, 2, y en los siguientes paneles el efecto sobre las formas activas de AKT y STAT3 respectivamente. En el último panel se usó como carga la forma inactiva de STAT3. Los gráficos representan los valores obtenidos del análisis densitométrico de las bandas. Intensidad media relativa corresponde al valor de la banda/ valor de la banda control.

## DISCUSION

Debido a la complejidad de la patofisiología del Mieloma Múltiple que involucra numerosas vías de señalización mediadas por citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, asociadas a procesos como angiogénesis, proliferación, migración, resistencia a drogas entre otras, nos encontramos con diversos blancos posibles para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Hussein, 2002). IL-6 es una citoquina que tiene un papel central en esta patología puesto que regula la proliferación y supervivencia de las células de MM (Urashima y col, 1996; Kawamura y col, 2000; Chatterjee y col, 2002). Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar en la línea de MM, U266, el efecto de IL-6 sobre las vías Ras-MAP quinasas, JAK1,2-STAT1,3 y PI3K/AKT. Al igual que lo descrito en la literatura para otras líneas celulares como OCI-My5, H929, OPM-2 y RPMI8226 (Qiang y col, 2002; Tu y col, 2000; Hsu y col, 2002) nuestros resultados indican que IL-6 activa rápidamente (a partir de los cinco minutos) las tres vías antes mencionadas (Figura 5). Para corroborar la acción de IL-6 en estas vías de señalización, usamos inhibidores específicos de cada una de ellas: PD98059 para la vía de las Ras-MAP quinasas, AG490 para JAK1,2-STAT1,3 y LY294002 para la vía PI3K/AKT. Como era de esperar el uso de PD98059 provocó una inhibición de la activación por IL-6 de ERK1,2 (Figura 6A). Como ya dijimos IL-6 es capaz de activar rápidamente la vía PI3K/AKT, esta activación es sensible al uso de LY294002. Al tratar las células U266 con distintas concentraciones de LY294002 observamos inhibición parcial de la activación de AKT por IL-6; esta inhibición es dosis dependiente. Nuestros resultados indican también, que la activación de Ras-MAP quinasas por IL-6 es inhibida parcialmente usando LY294002, lo que está de acuerdo

con datos de la literatura, donde se señala que al tratar las células de MM con este inhibidor hay una inhibición parcial de la activación de ERK1,2 sugiriendo una interrelación (cross-talk) en la regulación de Ras-MAP quinasas por PI3K/AKT (Figura 6B) (Qiang y col, 2002; Hideshima y col, 2001). El uso del inhibidor AG490, inhibe parcialmente la activación por IL-6, no sólo de JAK1,2-STAT1,3, sino también de las otras dos vías estudiadas (Figura 6C). Este efecto podría deberse a que JAK2, activada por la homodimerización de gp130 luego de la unión del complejo IL-6/IL-6R, provoca a su vez la activación de proteínas involucradas en las tres vías de interés. Por consiguiente la inhibición de la vía JAK1,2-STAT1,3 podría afectar negativamente las otras dos vías. Otros estudios en los que se tratan células de MM con AG490 también muestran que hay una inhibición de la activación de STAT3 y ERK1,2 mediada por IL-6 (DeVos y col, 2000).

Debido a que el uso de los inhibidores disminuye la activación de las vías de señalización mediadas por IL-6 y que éstas se encuentran relacionadas con la proliferación y supervivencia de la línea celular U266, estudiamos el efecto de éstos sobre la proliferación.

Las principales vías asociadas a la proliferación en MM son la Ras-MAP quinasas y PI3K/AKT (Qiang y col, 2002; Tu y col, 2000.). El uso de los inhibidores específicos de estas vías provoca una disminución de la proliferación de las células U266 sin que se logre un bloqueo de este proceso; al usar PD98059, inhibidor de Ras-MAP quinasas, no observamos una inhibición total de este proceso celular, lo que sugiere que las células podrían proliferar vía PI3K/AKT. En este mismo sentido al usar LY294002, inhibidor de PI3K las células podrían proliferar vía Ras-MAP quinasas.

Nuestros resultados sugieren que la vía PI3K/AKT tendría una mayor participación en este proceso celular ya que la inhibición de la proliferación es mayor con LY294002 que con PD98059. Sería interesante entonces estudiar el efecto de la combinación de LY294002 y PD98059 sobre la proliferación de las células U266 con el objeto de evaluar un posible efecto sinérgico de ambos inhibidores.

Como ya dijimos el uso de AG490 afecta las tres vías de señalización, y por lo tanto a pesar de que la vía JAK1,2-STAT1,3 se asocia principalmente al rol protector de IL-6 frente a la apoptosis, se podría también esperar una disminución en la proliferación celular. Nuestros resultados corroboran esta interrogante por cuanto observamos una fuerte inhibición de este proceso (Figura 7) al igual que lo descrito en otros estudios (De Vos y col, 2000). Sin embargo, esta inhibición no es un efecto sinérgico, es decir no hay una disminución equivalente a la suma de las inhibiciones provocadas por los inhibidores PD98059 y LY294002 por separado. Esta disminución es mayor que la observada cuando se usa PD98059, pero es menor que la provocada con LY294002. Esto plantea la posibilidad de que la vía PI3K/AKT no solo sea activada o regulada por la homodimerización de gp130 provocada por la unión del complejo IL-6/IL6R sino que por una vía distinta.

Otro de los procesos celulares regulados por estas vías de señalización es la apoptosis. Estudios previos en los cuales se usó inhibidores de PI3K/AKT indican que la activación de esta vía es importante tanto en la respuesta proliferativa dependiente de citoquinas como en la respuesta anti-apoptótica de las células de MM. En esta tesis analizamos el efecto de LY294002, inhibidor de PI3K y también de AG490 inhibidor de JAK1,2-STAT1,3 sobre el ciclo celular y apoptosis de la línea celular U266. Cuando las

células U266 son tratadas con LY294002 observamos un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G0-G1 y una disminución también dosis dependiente tanto de la fase G2-M como de la fase S; no observamos apoptosis con ninguna de las concentraciones utilizadas (Tabla I y Figura 8). El uso de LY294002 indica que la activación de la vía PI3K/AKT es importante en la respuesta proliferativa inducida por IL-6 en células de MM. La activación de PI3K afectaría la maquinaria del ciclo celular promoviendo la transición de la fase G1 a S (Tu y col, 2000.). Nuestros datos concuerdan con la literatura en el sentido de que LY294002 no induce apoptosis (Hsu y col, 2002.) y provoca retención de las células en la fase G1 del ciclo celular (Hideshima y col, 2001.).

Por otra parte cuando las células U266 son tratadas con distintas concentraciones de AG490 observamos un aumento significativo del porcentaje de células en la fase G0-G1 y una disminución significativa del porcentaje de células en las fases G2-M y S. Se observa un considerable aumento del porcentaje de células en apoptosis. (Tabla II, Figura 9 y 10)

Estudios realizados con células IM-9 y HS-Sultan muestran que inmediatamente después de que las células son tratadas con BMP-2 hay una inactivación de STAT3, provocando un arresto del ciclo celular en G1 y apoptosis de las células de MM (Kawamura y col, 2000.). Según estos datos podríamos esperar que el uso del inhibidor específico de JAK/STAT, AG490 provoque efectos similares en las células U266. Un estudio de De Vos y col (2000) mostró que el inhibidor de JAK2 induce apoptosis en células XG-2 de MM. Nuestros resultados apoyan lo señalado

anteriormente puesto que AG490 produjo retención del ciclo celular en la fase G0-G1 e inducción de apoptosis en las células U266.

Talidomida se usa en la actualidad como nueva alternativa terapéutica en el MM, debido a sus propiedades anti-angiogénicas. Este agente provoca respuesta en un 32-64% de los pacientes con MM en recaída, sin embargo esta respuesta no se relaciona necesariamente con una inhibición de la angiogénesis en la MO, sugiriendo que la actividad anti-MM de la Talidomida es a través de un mecanismo distinto o no sólo de su acción antiangiogénica (Rosñol y col, 2004.). A la fecha aún no se conoce el mecanismo exacto a través del cual Talidomida ejerce su acción anti-MM; probablemente Talidomida ejerza su acción a varios niveles. Al respecto existen evidencias que indican que Talidomida inhibe directamente el crecimiento de las células de MM, modula la expresión de moléculas de adhesión en el microambiente de la MO e induce la secreción de INF- $\gamma$  e IL-2 por células CD8 (Rosñol y col, 2004; Bruno y col, 2004; Anderson, 2003; Hideshima y col, 2000.). Nuestros resultados señalan que Talidomida es capaz de inhibir la proliferación de las células U266; esta inhibición depende de la dosis de la droga. Cuando las células son tratadas con 200  $\mu\text{g/ml}$  y 400  $\mu\text{g/ml}$  e IL-6 la inhibición de la proliferación es menor con respecto a la observada a igual concentración de Talidomida sola (Figuras 11). Por otra parte, Talidomida induce apoptosis en las células U266 a partir de las 48 horas de tratamiento; este efecto no se observa cuando las células son tratadas con Talidomida e IL-6 por 48 horas (Figura 14). A las 72 horas de tratamiento la inducción de la apoptosis es dosis dependiente y sólo es inhibida parcialmente cuando las células están en presencia de IL-6 (Figuras 12 y 13).

También analizamos el efecto de Talidomida en el ciclo celular de U266 y observamos que el porcentaje de células en la fase G0-G1 aumenta significativamente en presencia de Talidomida 200  $\mu\text{g/ml}$  y 400  $\mu\text{g/ml}$  y que la fase S disminuye significativamente en presencia de Talidomida 100  $\mu\text{g/ml}$  a 400  $\mu\text{g/ml}$ . En presencia de Talidomida e IL-6 el porcentaje de células en la fase G0-G1 no cambia significativamente con respecto a Talidomida sola. Al tratar las células con Talidomida 50  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{g/ml}$  e IL-6 el porcentaje de células en la fase S aumenta significativamente con respecto a Talidomida sola. Otro factor de interés en la sobrevida de las células de MM es la translocación de NF $\kappa$ - $\beta$  al núcleo donde se une al ADN para regular la expresión de numerosos genes relacionados con proliferación y sobrevida celular; NF $\kappa$ - $\beta$  también es capaz de regular la expresión de ciertas citoquinas relacionadas con estos procesos, como es el caso de IL-6 (Mitsiades y col, 2002a; Hideshima y col, 2002; Bharti y col, 2004). Nuestros resultados sugieren que Talidomida inhibe la translocación de NF $\kappa$ - $\beta$  al núcleo puesto que los núcleos tratados con Talidomida no presentan marca fluorescente asociada a NF $\kappa$ - $\beta$  a diferencia de los núcleos controles. Estos resultados corroboran los datos de literatura que señalan que Talidomida inhibe la activación de NF $\kappa$ - $\beta$  (Mitsiades y col, 2002a; Hideshima y col, 2002). Junto con analizar el efecto de Talidomida en la translocación de este factor analizamos el contenido nuclear de las células tratadas con la droga. Observamos fragmentación del contenido nuclear cuando las células son tratadas con la mayor concentración de Talidomida, a diferencia de lo observado en los núcleos de células controles (Figura 15). También fue de nuestro interés analizar el efecto de los inhibidores AG490 y LY294002 en la translocación de NF $\kappa$ - $\beta$ . Reportes anteriores

señalan que la activación de AKT induciría diferentes mecanismos de supervivencia celular. Cuando AKT es fosforilado por la estimulación de PI3K, activa IKK, un regulador positivo de NF $\kappa$ - $\beta$ , el cual regula la expresión de genes con actividad anti-apoptótica. (Fresno y col, 2004.). Por lo tanto, al usar el inhibidor de PI3K estamos inhibiendo la fosforilación de AKT y por consiguiente la activación de I $\kappa$  $\kappa$ , lo que impediría la activación y posterior translocación de NF $\kappa$ - $\beta$  al núcleo. Nuestros resultados muestran que al inhibir la vía PI3K/AKT efectivamente se bloquea la activación o translocación del factor de transcripción al núcleo. Las células tratadas con el inhibidor LY294002, presentan los núcleos vacíos, sin marca fluorescente, a diferencia de las células controles en las que se observa NF $\kappa$ - $\beta$  tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 16). Analizamos además el efecto de AG490, que como se señaló anteriormente también es capaz de inhibir la vía PI3K/AKT, sobre la activación de NF $\kappa$ - $\beta$ . Al igual que con LY294002 en las células tratadas con AG490 la localización de NF $\kappa$ - $\beta$  es citoplasmática, no observándose marca fluorescente en los núcleos (Figura 16). El efecto de los inhibidores en la localización de NF $\kappa$ - $\beta$  es similar al provocado con Talidomida, no se observa marca fluorescente para NF $\kappa$ - $\beta$  en los núcleos.

Como era de esperar dado las acciones de Talidomida sobre los procesos celulares ya mencionados, las vías Ras-MAP quinasas, PI3K/AKT y JAK1,2-STAT1,3 fueron también inhibidas por acción de la droga (Figura 17).

En resumen, nuestros resultados indican que Talidomida es capaz de disminuir la proliferación celular, detener el ciclo celular en G0-G1 e inducir apoptosis en las células U266, a través de modificar las vías de señalización intracelular Ras-MAP

quinasas, PI3K y JAK/STAT inhibiendo la fosforilación de ERK1,2, AKT1 y STAT3 respectivamente.

Con el objeto de precisar el nivel al cual actúa Talidomida en las vías de señalización sería interesante estudiar su acción sobre proteínas río arriba de las ya estudiadas como por ejemplo RAS, RAF, MEKK que median principalmente el crecimiento celular, sobrevida y diferenciación y JNK y p38 relacionadas con efectos pro-apoptóticos e inhibición del crecimiento celular (Platanias, 2003).

Así también y dado que en el MM el tumor se localiza en la médula ósea, estudios como los aquí mostrados pero en células de MM en presencia de células estromales del microambiente medular, aportarían información que probablemente se relacione mejor con lo que ocurre *in vivo*. A la fecha las acciones de Talidomida sobre el microambiente de MO que han sido descritas se refieren a una disminución de la adhesión de las células de MM al estroma medular ya que modula la densidad de las moléculas de adhesión. La adhesión de las células de MM a células de estroma favorece la proliferación y sobrevida de las células malignas y les confiere resistencia a drogas (Hideshima y Anderson, 2002; Bruno y col, 2004). Talidomida disminuye la resistencia a las drogas convencionales que se utilizan como terapia, ya que estaría inhibiendo la transcripción y secreción de algunas citoquinas asociadas a estos procesos (Hussein, 2002; Anderson, 2003). Sin embargo se desconocen los mecanismos por los cuales Talidomida estaría alterando dichos procesos en las células de MM (Hideshima y Anderson, 2002; Hussein, 2002; Bruno y col, 2004).

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que los efectos provocados por Talidomida en los distintos procesos celulares analizados en la línea celular U266 de MM, se deben a que esta droga es capaz de modificar, las vías de señalización (Ras-MAP quinasa, PI3K/AKT y JAK1,2-STAT1,3) asociadas a dichos procesos.

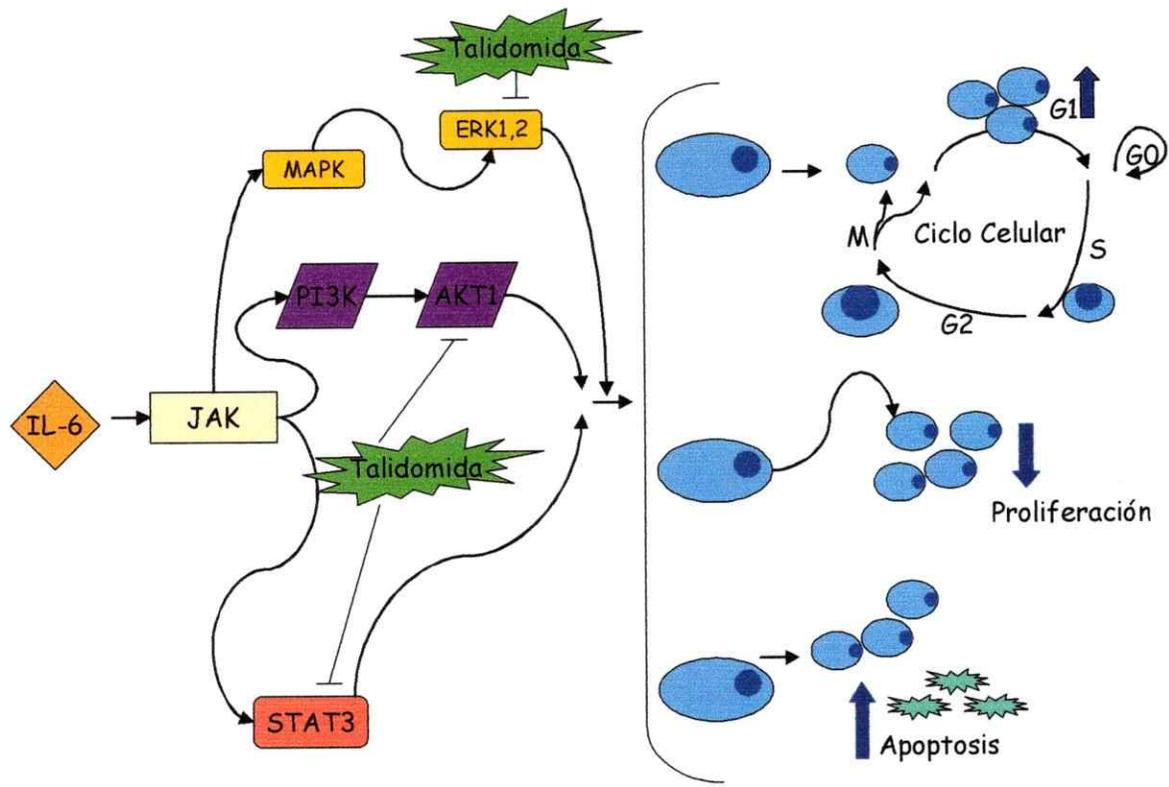


Figura 18. Modelo propuesto para la acción de Talidomida en células de U266 de MM. → Estimula  
 └ Bloquea.

## **BIBLIOGRAFIA.**

**Anderson K.C.**, 2003. Novel therapies for Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* 12: 10-17.

**Anderson K.C.**, Kyle R, Dalton W, Landowski T, Shain K, Jove R, Hazlehurst L, y Berenson J, 2000. Multiple Myeloma: New insights and therapeutic approaches. *Hematology* 147-165.

**Baeuerle P y Baltimore D.** 1996. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 87:13-20.

**Barlogie B**, Zangari M, Spencer T, Fassas A, Anaissie E, y Badros A, 2001. Thalidomide in the management of multiple myeloma. *Semin Hematol*; 38: 250-9.

**Bataille R y Harousseau JL,** 1997. Multiple Myeloma. *Medical Progress* 336(23): 1657-1664.

**Bharti A**, Shishodia S, Reuben J, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, Estrov Z, Talpaz M, y Aggarwal B, 2004. Nuclear factor- $\kappa$ B and STAT3 are constitutively active in CD138<sup>+</sup> cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood*. 103:3175-3184.

**Bruno B**, Rotta M, Giaccone L, Massaia M, Bertola A, Palumbo A, y Boccadoro M, 2004. New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet oncol* 5: 430-442.

**Chatterjee M**, Hönemann D, Lentzsch S, Bommert K, Sers C, Herrmann P, Mathas S, Dörken B, y Bargou R.C, 2002. In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway. *Blood* 100: 3311-3318.

**Chen RH**, Chang MC, Su YH, Tsai YT, y Kuo ML, 1999. Interleukine-6 Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathways. *The journal of Biological Chemistry* 274(33): 23013-23019.

**Davies F**, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D, Treon SP, Richardson P.G, Schlossman R.L, Morgan G.J, Muller G.W, Stirling D.I, y Anderson K.C, 2001. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 98: 210-216.

**De Vos J**, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C, y Klein B, 2000. JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *British journal of Haematology* 109: 823-828.

**Franks M, Macpherson G, Figg W, 2004. Thalidomide. *Lancet* 363: 1802-1811.**

**Fresno J, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, y González-Barón M, 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews* 30: 193-204.**

**Hattori Y e Iguchi T, 2004. Thalidomide for the treatment of multiple myeloma. *Congenital Anomalies* 44:125-136.**

**Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies F.E, Tai YT, Treon S.P, Lin B, Schlossman R.L, Richardson P, Muller G, Stirling D.I, y Anderson K.C, 2000. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96(9): 2943-50.**

**Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, y Anderson K.C, 2001. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5991-6000.**

**Hideshima T y Anderson K.C, 2002. Molecular Mechanisms of Novel Therapeutic Approaches For Multiple Myeloma. *Nature Rev.Cancer* 2: 927-937.**

**Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, y Anderson K.C, 2002. NF- $\kappa$ B as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *J.Biol.Chemistry* 277(19): 16639-47.**

**Hirano T, 1998. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. *International Reviews of Immunology* 16: 249-284.**

**Hsu J, Shi Y, Hu L, Fisher M, Franke T.F, y Lichtenstein A, 2002. Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses. *Oncogene* 21: 1391-1400.**

**Hussein M, 2002. Nontraditional Cytotoxic Therapies for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *The Oncologist* 7(suppl 1): 20-29.**

**Jones S.A, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, y Fuller G.M, 2001. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15: 43-58.**

**Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, e Ikeda Y, 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 96(6): 2005-11.**

**Kawano M, Hirano T, y Matsuda T, 1988.** Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for Human Multiple Myeloma. *Nature* 332: 83-85.

**Kishimoto T, Akira S, Narazaki M y Taga T, 1995.** Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86: 1243-1254.

**Kuehl W.M, y Bergsagel P.L, 2002.** Multiple Myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nature Rev.Cancer* 2: 175-187.

**Kumar S, Witzig T.E y Rajkumar S.V, 2004.** Thalidomide: Current Role in the Treatment of Non-Plasma Cell Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 22: 2477-2488.

**Liou H.C y Baltimore D, 1993.** Regulation of the NF- $\kappa$ B/rel transcription factor and I $\kappa$ B inhibitor system. *Current Opinion in Cell Biology* 5: 477-487.

**Mitsiades N, Mitsiades C.S, Poulaki V, Chauhan D, Richardson P.G, Hideshima T, Munshi N, Treon S.P y Anderson K.C, 2002a.** Biologic sequelae of nuclear factor- $\kappa$ B blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99(11): 4079-86.

**Mitsiades N, Mitsiades C.S, Poulaki V, Chauhan D, Richardson P.G, Hideshima T, Munshi N, Treon S.P y Anderson K.C, 2002b.** Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 99: 4525-4530.

**Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, y Kishimoto T, 1993.** IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260: 1808-1810.

**Naka T, Nishimoto N, y Kishimoto T, 2004.** The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis res* 4(suppl3): S233-S242.

**Ogata S, Chauchan D, Teoh G, Treon S.P, Urashima M, Schlossman R.I, y Anderson K.C, 1997.** IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J.Immunol* 159: 2212-2221.

**Platanias L.C, 2003.** Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101: 4667-4679.

**Qiang Y.W, Kopantzev E, y Rudikoff S, 2002.** Insulinlike growth factor-1 signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood* 99: 4138-4146.

**Rawstron A**, Fenton J, Ashcroft J, English A, Jones R.A, Richards S.J, Pratt G, Owen R, Davies F.E, Child J.A, Jack A.S, y Morgan G, 2000. The intereukin-6 receptor alpha-chain (CD126) is expressed by neoplastic but not normal plasma cells. *Blood* 96(12): 3880-3886.

**Rosiñol L**, Ciberia M, Segarra M, Cid M, Filella X, Aymerich M, Rozman, Arenillas L, Esteve J, Bladé J, y Montserrat E, 2004. Response to thalidomide in multiple myeloma: impact of angiogenic factors. *Cytokine* 26: 145-148.

**Saito M**, Yoshida K, Hibi M, Taga T y Kishimoto T, 1992. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor associated signal transducer gp130, and its regulated expression in vivo. *J. Immunol* 148: 4066-4071.

**Schuringa J.J**, Jonk L.J.C, Dokter W.H.A, Vellenga E, y Kruijer W, 2000. Interleukine-6 induced STAT3 Transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem. J.* 347: 89-96.

**Singhal S**, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, y Eddlemon P, 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 341: 1565-71.

**Terstegen L**, Gatsios P, Bode J.G, Schaper F, Heinrich P.C, y Graeve L, 2000. The inhibition of Interleukine-6-dependent STAT Activation by Mitogen-activated Protein Kinase Depends on Tyrosine 759 in the Cytoplasmic Tail of Glycoprotein 130. *The journal Biological Chemistry* 275(25): 18810-18817.

**Tosi P**, Ronconi S, Zamagni E, Cellini C, Ronconi S, Patriarca F, Ballerini F, Musto P, Di Raimondo F, Ledda A, Lauria F, Masini L, Gobbi M, Vacca A, Ria R, Grafone T, y Cangini D, 2001. Salvage therapy with thalidomide in multiple myeloma patients relapsing after autologous peripheral blood stem cells transplantation. *Haematologica* 86: 409-13

**Treon S.P y Anderson K.C**, 1998. Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasis. *Current.opinion in hematology* 5: 42-48.

**Tricot G**, 2000. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet* 355: 248-250.

**Tu Y**, Gardner A, y Lichtenstein A, 2000. The Phosphatidylinositol3-Kinase/AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cell: Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses. *Cancer Res* 60: 6763-6770.

**Urashima M**, Ogata A, Chauhan D, Vidriales M, Teoh G, Hoshi Y, Schlossman R.L, DeCaprio J.A, y Anderson K.C, 1996. Interleukin-6 Promotes Multiple Myeloma Cell Growth Via Phosphorylation of retinoblastoma Protein. *Blood* 88: 2219-2227.