



INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS, INTA
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“INFLUENCIA DEL AMBIENTE OBESOGENICO EN LA
MEDULA ÓSEA
PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL
MIELOMA MULTIPLE”**

TESIS PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAGISTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
MENCIÓN NUTRICIÓN CLÍNICA DEL ADULTO

Tesista

Ana Lucía Ledesma Orellana

Medico Cirujano, Universidad de Chile

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Mireya Fernández

CO-DIRECTORA DE TESIS
Dra. Sandra Hirsh, *MD*

Santiago, Marzo 2009

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3-11
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	12
OBJETIVOS.....	12
METODOLOGÍA.....	13-21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	
RESULTADOS.....	23-31
DISCUSION.....	32-34
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES.....	36-37
BIBLIOGRAFÍA.....	38-44

INTRODUCCION

La obesidad constituye un problema creciente de salud pública. La OMS estima que existen 300 millones de personas obesas en el mundo. En Chile, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad en la población adulta corresponde aproximadamente al 60% (1, 2). La obesidad abdominal junto con otros factores como la hipertensión, la insulinoresistencia y la dislipidemia constituyen el Síndrome Metabólico, enfermedad que predispone a adquirir diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, mortalidad temprana (3) y mayor riesgo relativo (RR) de desarrollar distintos tipos de cáncer.

Existen numerosos estudios de corte epidemiológico que dan cuenta del mayor RR de desarrollar cáncer, si se tiene un IMC mayor de 25. Este riesgo relativo aumenta más aún, si el IMC es mayor de 30 ó se es obeso mórbido. Las neoplasias asociadas a obesidad son adenocarcinoma de esófago, cáncer de mama, endometrio, colon, recto, hígado, páncreas, vejiga y riñón, así como linfoma de Hodking y Mieloma Múltiple (MM) (4).

Desde el año 1994 se describe una asociación entre la obesidad y el Mieloma Múltiple (5). Se estudiaron dos cohortes de pacientes que fueron seguidas durante 21 y 24 años respectivamente, encontrándose un RR mayor de desarrollar MM en aquellos pacientes con sobrepeso y obesidad, lo cual no se explicaba por el factor diabetes mellitus, por lo que los autores plantean otros factores nutricionales implicados en su etiopatogenia. En el 2007 se publicó un meta-análisis (6) en el cual los autores concluyeron que tanto los individuos con sobrepeso como los obesos tienen aumentado el RR de desarrollar MM (1.12 a 1.43 en sobrepeso y 1.27 a 1.82 en obesos).

El MM es una neoplasia de células B que se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas malignas en la médula ósea (MO). Un linfocito B inmaduro en condiciones fisiológicas migra hacia la MO sufriendo un reordenamiento en sus genes para cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas, quedando como un linfocito B virgen, éste migra hacia tejido linfoide secundario o periférico, donde estimulado por antígenos, prolifera y madura hacia célula plasmática. Estas células generalmente secretan IgM y son de vida corta. Las células B estimuladas también pueden entrar en un nódulo linfático y madurar en el folículo, donde se produce una activa hipermutación de los genes para cadenas pesadas (IgH) y los genes para las cadenas livianas (IgL) de las inmunoglobulinas. Este proceso resulta en la obtención de una célula plasmática productora de un anticuerpo altamente específico. Dicha célula B productora de IgM, tiene dos caminos: pasar a la circulación como célula de memoria o diferenciarse a plasmocitos de centros postgerminales. Este clon, entonces puede migrar a la MO y finalmente diferenciarse a una célula plasmática de larga vida y secretar grandes cantidades de anticuerpos (7). En el MM el clon de célula B, se establece y multiplica en la MO, manifestándose clínicamente con hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones osteolíticas (9). Este cáncer corresponde al 2,5% de todas las neoplasias y al 10% de las hematológicas. La edad media de diagnóstico es a los 63 años, siendo mas frecuente en hombres y en afrocaribeños que en caucásicos (8).

En nuestro país no existen estudios sobre la epidemiología del MM. Los únicos datos disponibles corresponden a las tasas de mortalidad del periodo 1985-1999 (Fuente: Minsal <http://epi.minsal.cl/>) (10). Un trabajo publicado el año 2007 en la Revista Médica de Chile, estima la mortalidad de la enfermedad para nuestro país en 2,2 por 100.000

habitantes; los autores destacan además que es una patología que va en aumento tanto en nuestro país como a nivel mundial y que la media de edad al diagnóstico se ha desplazado a edades más tempranas (9).

La etiología del MM es desconocida, está asociado a anomalías del número de cromosomas, traslocaciones génicas, activación de oncogenes y fenómenos epigenéticos. En este sentido casi todos los casos de MM presentan anomalías cromosómicas (11, 12) pudiéndose clasificar en 2 subtipos: los hipodiploides/pseudodiploides y los hiperdiploides. Esto es de gran importancia clínica debido a que los MM hipodiploides tienen peor pronóstico (12, 13, 14). Se describen múltiples traslocaciones para el gen de la IgH, una de ellas es la del locus 14 q32 que se encuentra en el 20-40% de los pacientes con MM (15, 16). Otras traslocaciones estudiadas son: la (11; 14)(q13;q32), la (4;14)(p16;q32), y la (6;14)(p21;q32) (12). También se ha estudiado la delección del cromosoma 13q en las células de MM, que constituye un factor independiente de mal pronóstico (8, 12, 17). Algunas de estas traslocaciones inducen la expresión de moléculas de adhesión, como la integrina β_7 en las células de MM y la producción del factor de crecimiento endotelial en las células de estroma de la MO (8, 18). Otras traslocaciones son responsables de la desregulación de las ciclinas D (proteínas que participan en la regulación del ciclo celular), éstas podrían hacer que las células de MM fuesen más susceptibles a estímulos proliferativos, produciéndose una expansión selectiva, como resultado de la interacción con las células del estroma, que aumentarían su producción de IL-6 y de otras citoquinas (8).

En cuanto a la activación de oncogenes, se ha encontrado aberraciones en el locus para el gen de c- MYC, mutaciones en N-RAS y K-RAS. En el desarrollo del MM ocurren fenómenos epigenéticos (18), es decir se modifica la expresión génica sin cambiar la secuencia de los

nucleótidos del DNA, mediante procesos de metilación y de modificación de histonas, lo que se ha asociado a una mayor expresión de proteínas que regulan el ciclo celular como p15 y p16 (12, 19).

Hay que recordar que el MM se establece en la MO y en este sentido, ya desde hace algunos años, se le ha asignado mayor importancia al rol que tiene el microambiente de la MO en el desarrollo del MM. El microambiente (estroma) tanto en individuos sanos como en los con diagnóstico de MM, está conformado por elementos extracelulares de matriz y elementos celulares, tales como células fibroblásticas, células endoteliales, osteoblastos, osteocitos y células del sistema inmune. Las interacciones de estos tipos celulares están mediadas por citoquinas, moléculas de adhesión, receptores celulares y solubles. En la fisiopatología del MM, el fenómeno de interacción genera factores paracrinos involucrados en la supervivencia, diferenciación, proliferación, resistencia a drogas, osteoclastogénesis, inhibición de la osteogénesis, angiogénesis, deficiencia humoral y celular y anemia (20).

Las células de MM al migrar hacia la médula ósea establecen una primera relación con las células del endotelio, gatillando inducción de la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión en las células de MM, las que facilitan su posterior adhesión a las células del estroma de la médula ósea. La adhesión de éstas, a las células del estroma produce la activación del factor NF- κ B que participa en la transcripción y secreción de interleucina-6 (IL-6) (8).

IL-6 se une inicialmente a su receptor, una glicoproteína de 80-kd (gp80) ubicada en la membrana celular, ó a una forma soluble de este (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 (21, 22, 23, 24). 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. De este modo, 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 inducir la proliferación de células que no posean gp80 (receptor de 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 (25).

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, que dan cuenta de su poder antiapoptótico, proliferativo y de supervivencia. Las vías que activa IL-6 son las siguientes: 1) JAK2/STAT3 2) Ras-MAP quinasas 3) PI3K/Akt . La señalización intracelular iniciada por gp130 activa el receptor asociado a 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 (23, 24). La fosforilación de STAT3 provoca su dimerización y posterior traslocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción regulando la expresión génica (26, 27). La activación de la vía MAP quinasa es iniciada por la fosforilación de la proteína SHP2 que gatilla la activación secuencial de las proteínas Ras, Raf, MEK, ERK 1-2, esta última se trasloca al núcleo para regular la expresión de algunos genes (22). Por otra parte, PI3K fosforilada por JAK es capaz de activar Akt en residuos de serina y treonina. Akt tiene efectos pleiotrópicos en la fisiología celular, puesto que participa en el metabolismo de la glucosa mediado por citoquinas, en la regulación del crecimiento celular, modula el ciclo celular afectando los niveles de p53 y ciclina D1 e inhibe directamente a proteínas proapoptóticas reguladoras de factores de transcripción y además indirectamente

modulando a reguladores de muerte celular como p53, NF-kb y telomerasas (20).

Es conocido que la IL-6 promueve la proliferación de las células de Mieloma Múltiple. La producción autocrina de esta citoquina se ha asociado con un fenotipo altamente maligno, mayor tasa de proliferación y respuesta deficiente a las drogas inductoras de apoptosis (8). Estudios realizados en el INTA, dirigidos por la profesora Mireya Fernández, en los que se comparó la capacidad adhesiva de estromas de médula ósea de individuos normales, tratados ó no con IL-6, mostraron un aumento significativo en la cantidad de células de MM adheridas cuando los estromas fueron tratados con la citoquina.

En condiciones fisiológicas, las células que producen IL-6 son células linfoides y no linfoides, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células mesangiales y algunos tipos de cáncer. IL-6 promueve la diferenciación de las células T, macrófagos, megacariocitos y osteoclastos. IL-6 participa también en la reacción de fase aguda, aumentando la producción de la proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno, α -antitripsina y amiloide A, simultáneamente disminuyendo la producción de albúmina (28).

Las células en las que se ha documentado la expresión de receptores para IL-6 son: linfocitos TCD8, fibroblastos, sinoviocitos, osteoblastos, megacariocitos, células endoteliales, neuronas simpáticas, neuronas corticales, células enterocromafines de la médula adrenal, células retinales pigmentadas, mastocitos, queratinocitos, células de Langerhans, astrocitos adultos y fetales, neutrofilos, monocitos, eosinófilos, células epiteliales del colon, células beta de los islotes pancreáticos y células de MM.

Existen enfermedades en las que se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 tales como la psoriasis, la osteoporosis, la artritis reumatoide (28) y la enfermedad inflamatoria intestinal (29). También se ha descrito que la concentración sérica de IL-6 aumentaría con el envejecimiento, lo que sería significativo en individuos mayores de 75 años (30). En la obesidad se ha descrito un aumento de los niveles séricos de IL-6, lo que estaría explicado en parte por el infiltrado de monocitos en el tejido adiposo, que se ha documentado en éstos pacientes.

Estudios realizados in-vitro han demostrado que endotelios de individuos normales al ser tratados con IL-6 aumentan su adhesividad a linfocitos, no así a monocitos o polimorfonucleados (31).

Podemos decir entonces que, IL-6 es una citoquina de acciones pleiotrópicas y la encontraríamos participando activamente en ambientes inflamatorios, autoinmunes, infecciosos y neoplásicos.

El tejido adiposo comprende células de estroma tales como células troncales mesenquimáticas, células precursoras de adipocitos, adipocitos y células del endotelio. El tejido adiposo normal no solo tiene la función de almacenar energía, si no que también secreta una gran variedad de hormonas y moléculas de señalización que tienen efectos locales y sistémicos. En un individuo normal el tejido adiposo secreta el 10-30 % de la cantidad total de IL-6 (32). Los niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionan directamente con el IMC e inversamente con la insulinosensibilidad (33, 34).

La obesidad es una enfermedad en la que se encuentra aumentado el tejido adiposo y en la que se ha documentado un aumento de los niveles séricos de IL-6, IL-8, TNF-alfa, angiotensina II, leptina, PAI-1 y una disminución de los niveles de adiponectina, de modo tal que en la actualidad se la considera un estado pro-inflamatorio (35). El

componente central de este estado, estaría dado por la progresiva infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, mientras se está ganando peso, y estas células inflamatorias son las que producen IL-6 (36).

En el caso del paciente obeso, la producción de IL-6 y otras citoquinas están influenciados por la distribución del tejido adiposo; así en pacientes con mayor proporción de grasa visceral, los niveles de IL-6 sérica serán mayores que en aquellos obesos con predominio de grasa subcutánea (37).

La función que tendría IL-6 sobre el tejido adiposo es desconocida, pero se sabe que IL-6 tiene un rol importante en la producción de fibrinógeno, PCR, en la disminución de los niveles de HDL, en el aumento de la adhesividad de las plaquetas y en la inducción de moléculas de adhesión en las células del endotelio (38).

Como aparece mencionado en párrafos anteriores el paciente obeso tiene aumentado sus niveles de IL-6 circulante, lo cual no es ajeno a la MO y su ambiente. Dado los efectos fisiológicos y fisiopatológicos que gatilla IL-6 en los tejidos, se puede sugerir que el estroma de la MO del paciente obeso podría ser distinto en algún grado al de un paciente normopeso, entre otras causas por la acción de la IL-6 sobre éste. No existen estudios sobre las características funcionales de la MO de pacientes con sobrepeso u obesos y por ende no hay estudios que evalúen la capacidad del estroma de la MO para adherir células de MM en estos pacientes. Tampoco se encuentra en la literatura estudios que evalúen los niveles de citoquinas en la MO de pacientes normopesos, con sobrepeso u obesos.

Dada la evidencia epidemiológica que relaciona el MM con el sobrepeso y la obesidad y la imbricación del desbalance de citoquinas proinflamatorias que encontramos en ambas patologías, resulta

interesante investigar si el ambiente de la MO de pacientes obesos puede ser facilitador para la adhesión y proliferación del MM.

HIPOTESIS DE TRABAJO

El estroma de la médula ósea del paciente con sobrepeso y/u obeso tiene aumentada su capacidad para adherir células de Mieloma Múltiple con respecto a estromas de sujetos normopeso (controles).

Los niveles de IL-6 en la MO de los pacientes obesos y/o con sobrepeso están aumentados respecto a los controles normopeso.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar si en la MO de pacientes obesos y/o con sobrepeso existen condiciones favorables para el establecimiento del MM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad del estroma de la MO de pacientes obesos y/o con sobrepeso, normopesos y MM para adherir células plasmáticas de Mieloma Múltiple
2. Evaluar niveles de Interleuquina-6 en el microambiente de la MO de pacientes obesos y/o con sobrepeso, de normopesos y con MM.

METODOLOGIA

1. Pacientes

1.2 Criterios de inclusión

Pacientes de ambos sexos, que fueron sometidos de forma electiva a cirugía de endoprótesis de cadera, por cualquier causa, mayores de 18 años.

1.3 Criterios de exclusión (39, 40, 41, 42)

1.3.1 Psoriasis

1.3.2 Artritis reumatoide

1.3.3 Diabetes Mellitus

1.3.4 Enfermedad inflamatoria intestinal.

1.3.5 Osteoporosis

1.3.6 Enfermedades crónicas en general.

1.4 Casos

Dos grupos de pacientes definidos de acuerdo a su IMC (IMC= índice de masa corporal = peso (kg)/ talla (m)²)

2.1 Sobrepeso: IMC entre 25-29,9 kg/m².

2.2 Obeso: IMC mayor igual a 30 kg/m².

1.5 Controles

1.5.1 Controles negativos

Aquellos pacientes con un IMC entre 18,5 - 24.9 kg/m², clasificados como Normopesos.

1.5.2 Controles positivos

Pacientes con diagnóstico de MM.

1.6 Rango de edad (30)

Individuos entre 18-75 años.

2. Obtención de MO

La muestra de MO se extrajo con una jeringa heparinizada, del raspado endomedular que se practica antes de introducir la prótesis, luego el contenido se almacenó en otra jeringa con 2500 UI de heparina, que se mantuvo a 4°C mientras se trasladaba al laboratorio.

3. Obtención de plasma de MO

La muestra de MO se introdujo en un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos para separar el plasma de la médula ósea de los elementos figurados. El plasma se guardó a -80°C, hasta su uso.

4. Establecimiento de cultivos celulares

Las células obtenidas de las muestras de MO se separaron por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, técnica descrita por Boyum en 1968 (43, 44). Luego las células mononucleadas se resuspendieron en α -MEM (Minimal Esencial Medium alpha) suplementado con 20% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomina, se plaquearon a una concentración de 2×10^5 células/ml y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Luego de 21 días, las células adheridas a las placas de cultivo (estromas) se soltaron con tripsina/EDTA al 1% (durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂) y se subcultivaron hasta confluencia (45).

5. Medición de los niveles de Interleuquina 6 y su receptor soluble

Se midió cuantitativamente IL-6 y su receptor soluble (sIL-6R) en los plasmas de las muestras de MO.

Test de Elisa para IL-6 y para sIL-6R

Se empleó el Kit *Quantikine HS* para determinación de IL-6 en orina, plasma y suero; (*R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place NE Minneapolis, United States of America*). Los Kits de ELISA contienen un anticuerpo monoclonal específico, en este caso para IL-6, que ha sido pre-adherido en los micropocillos de la placa de ensayo. Cuentan además con medidas estándar de proteína de IL-6, con las cuales se realiza una curva de calibración con diluciones crecientes de IL-6, con dicha curva se calcula la cantidad de IL-6 contenida en las muestras en estudio. Medidas estandarizadas de la proteína y alícuotas de las muestras son pipeteadas dentro de los micropocillos, así la IL-6 presente en las muestras se une al anticuerpo inmovilizado. Luego se lavan los pocillos para extraer cualquier sustancia que no se ha unido al anticuerpo, posteriormente un anticuerpo policlonal para IL-6 se agrega a los pocillos, el cual está ligado a una enzima. Se lava nuevamente con el objeto de retirar lo que no se ha unido a los anticuerpos, para luego agregar una solución sustrato a los micropocillos, la que reacciona con la enzima unida al segundo anticuerpo. Después de un periodo de incubación, una solución amplificadora es adicionada a los pocillos obteniéndose un color, cuya intensidad será directamente proporcional a la cantidad de IL-6 que se unió en el primer paso de la reacción. Se detiene la reacción del color y se mide su intensidad a 490 nm y a

630nm. Luego se calcula la cantidad de IL-6 para cada muestra interpolando en la curva de calibración.

El mismo procedimiento se realizó para el sIL-6R.

6. Evaluación de la expresión del RNA mensajero de IL-6

Para estos ensayos se contó con un total de 13 muestras: 4 normopesos, 5 obesos /sobrepeso y 4 MM.

Se determinó la cantidad relativa de RNA mensajero producido por las células de estroma de los pacientes, empleando la técnica de RT-PCR (Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa).

Extracción del RNA total

Se sembraron 4×10^5 células en placas de cultivo de 60mm en α -MEM/10% SFB. Una vez alcanzada la confluencia se soltaron de las placas con tripsina 0,25% /EDTA 0,05% en PBS y se centrifugaron a 1800 rpm por 7 minutos. El pellet de células resultante se resuspendió en 1ml de TRIzol Reagent ®. La células en TRIzol se disgregaron con una jeringa de insulina de modo tal de facilitar su rompimiento y liberar su contenido. La extracción del RNA se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante, separando el RNA total con cloroformo y precipitándolo con isopropanol, seguido de posteriores lavados con etanol 75%. Para ello, se agregó 200 μ l de cloroformo por cada ml de TRIzol y se centrifugó a 12000g por 15 minutos, para separar la mezcla en fases. La fase que contenía el RNA se separó y traspasó a otro tubo, donde se agregó 500 μ l de isopropanol para precipitar el RNA, se centrifugó a 12000g por 10 minutos. El RNA precipitado se resuspendió en 1ml de etanol 75%, se centrifugó

nuevamente a 7500g por 5 min y el pellet obtenido se resuspendió en 23µl de agua.

El RNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm y se almacenó a -80°C hasta la síntesis de cDNA.

La integridad del RNA se evidenció mediante el uso de geles denaturantes de agarosa, preparados con 0,72 g de agarosa en 45 ml de agua DEPC (tratada con dietilpirocarbonato) calentados en horno microondas; una vez que la temperatura alcanzó los 65°C, se agregó MOPS 10X (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid 0,4 M pH 7,0, Acetato de Sodio 0,1 M y EDTA 0.01 M) y formaldehído al 37% en una proporción de 9:6. Luego, 4µl de los RNA de cada muestra fueron mezclados con 9µl de formamida, 3µl de formaldehído, 2µl de MOPS 10X y 0,5µl de bromuro de etidio. Posteriormente las muestras preparadas fueron denaturadas a 70°C por 10min, luego enfriadas en hielo e inmediatamente cargadas en el gel previamente descrito, donde se corrieron durante 40 minutos 80V.

Todos los implementos se lavaron con cloroformo o eran libres de RNAasa, se utilizó mascarilla y guantes durante todo el procedimiento.

RT-PCR

El cDNA complementario se sintetizó en un termociclador a partir de 1µg del RNA obtenido, con la transcriptasa reversa M-MLV (New England Biolabs), mediante un ciclo de 10 minutos a 70°C seguido de un ciclo de 90 minutos a 42°C.

Para amplificar el mensajero de IL-6 se empleó la siguiente pareja de primers: Sense: 5` GAGGGCTCTTCGGCAAAT 3`, Antisense: 5` CTGGCTCTGAAACAAAGGATA 3`, que amplifican un fragmento de 313 bp, con una TM de 56°C.

Como control de carga se utilizó GPDH, amplificado por los siguientes primers: Sense: 5`ACCACAGTCCATGCCATCAC 3`, Antisense: 5`TACAGCAACAGGGTGGTGGGA 3`, los cuales amplifican un fragmento de 498 bp, con una Tm de 60°C. Para crear ambas parejas de primers, se buscaron las secuencias del RNA mensajero humano del gen correspondiente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, a partir de la cual se diseñaron los partidores con el programa "Primer Premier".

La reacción de PCR se llevó a cabo tomando 300ng de cDNA y mezclándolo con la siguiente mezcla de reacción: 22,3 µl de agua, 3 µl de Buffer de reacción 10x (Invitrogen), 0,9 µl de MgCl (1,2 mM), 0,6µl de dNTPs (0.2mM), 0,6 µl de primers (0.2pmol/µl) y 0,5 µl de Taq polimerasa (0,25 U).

El producto de PCR tanto para IL-6 y como para GPDH obtenido se evidenció en un gel de agarosa 2%.

Las bandas del gel se cuantificaron en el programa "Kodak Digital Science" según su intensidad neta. La intensidad de las bandas de IL-6 fue corregida por la del control de carga (GPDH). Esta intensidad relativa es directamente proporcional a la cantidad del mRNA para IL-6 en las células.

7. Medición de la adhesión celular (47,48)

Se contó con 13 muestras de estroma de MO: 4 normopesos y 5 obeso /sobrepeso y 4 MM.

Luego de obtener estromas como lo descrito en el punto 4, las células se soltaron de la placa de cultivo utilizando 1 ml TRIS- EDTA al 1%, por botella, se incubaron por 5-7 minutos a 37°C y se detuvo la reacción con α -MEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, se tomaron alícuotas de 5×10^4 células y se siembran en placas de

1cm de diámetro, luego de 7 días o de llegar a confluencia estuvieron listas para el ensayo. Para realizar el ensayo se utilizó la línea celular U266 (ATCC, *American Type Culture Collection*) la cual no ha sido modificada genéticamente y mantiene las características de una célula de mieloma in-vivo, requieren medio RPMI al 15 % de suero fetal Bovino. El RPMI contiene: 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato sódico, 4500 mg/L glucosa, y 1500 mg/L bicarbonato de sodio. Luego de ser lavadas con PBS las células fueron incubadas con RPMI suplementado al 2% con suero fetal bovino. Con la luz de la campana de flujo apagada, se adicionaron 5×10^5 U266 por pozo contenidas en un volumen de 1000 μ l, se realizaron movimientos circulares y oblicuos para distribuir las células en la placa, se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Para permitir su medición por citometría de flujo, las U266 fueron marcadas con un fluoróforo, el CFSE (flourocromo que reacciona a una determinada longitud de onda). Luego del tiempo indicado, se aspiró el medio de los pozos, y se lavó 5 veces cada pozo con PBS tibio, se adicionó 200 μ l de tripsina-EDTA al 1% a cada pozo, durante 5 minutos a 37°C. Luego se detiene la reacción de la tripsina con 300 μ l de RPMI al 15%, quedando un volumen final de 500 μ l/pozo, el que se aspira y se coloca en un tubo eppendorf. Para impedir la degradación de las células se agregó 50 μ l de formaldehido puro a cada tubo. Se guardaron las muestras en oscuridad y en frío por un máximo de 48 hrs hasta ser analizadas por el citómetro de flujo. Para realizar el marcaje con CFSE las U266 se centrifugan en un tubo de 15 ml a 400g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con PBS de modo tal de lavar las células y se centrifugó nuevamente en idénticas condiciones. Se adicionó el CFSE a una concentración de

2,5 μM , se homogeniza y se deja incubar en oscuridad durante 10 minutos.

La adhesión se expresó por una relación numérica entre el número de células U266 y el número de células mesenquimáticas, expresado como fracción.

Citometría de flujo

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de *análisis celular multiparamétrico* cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula, como el tamaño y el inmunofenotipo entre otras.

El tipo de energía producida por la interacción entre las células y el laser puede ser de dispersión y de fluorescencia (marcaje con fluorocromo) que se emplea en este estudio.

Un *fluorocromo* es una molécula química que absorbe luz a una determinada longitud de onda y emite a una longitud superior (menor energía). Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula. Así obtendremos la cantidad de U266 adheridas por pozo y por número de células de estroma.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados se analizaron por grupos con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, comparando los tres grupos: normopeso, sobrepeso/obeso y MM, con un nivel de confianza del 95% y un $p < 0,05$. La medida de tendencia central utilizada fue la mediana.

Cuando hubo diferencias estadísticamente significativas se realizó un test de Bonferroni para evaluar la dirección de las diferencias.

Se empleó el programa Analyse-it for Excell.

RESULTADOS

El número total de pacientes fue de 40. Los pacientes normopeso, sobrepeso/obeso (n=33) en su totalidad fueron mujeres. En el grupo de pacientes con MM (n=7) hubo un paciente de sexo masculino.

Edad:

La mediana de edad para el grupo normopeso fue de 73 años, para el grupo sobrepeso/obeso de 69,5 años y para el grupo MM fue de 68 años (Tabla 1). No hubo diferencias significativas con respecto a la edad.

Concentración de IL-6:

Se midió IL-6 en el plasma de MO de las 40 muestras. Como se muestra en Tabla 2 y en la Figura 1, la concentración de IL-6 en el grupo normopeso (2,51 pg/ml) fue significativamente menor que en el grupo sobrepeso-obeso (4,04 pg/ml; $p=0,04$), en el grupo MM (6,02 pg/ml) fue significativamente mayor que el grupo normopeso ($p=0,02$) y entre el grupo sobrepeso/obeso y el grupo mieloma no hubo diferencias ($p=0,42$)

Concentración de sIL-6R:

Se midió sIL-6R en plasma de MO en 20 de las 40 muestras, en las otras veinte no se contó con la cantidad necesaria para realizar la medición. Como se detalla en la Tabla 3 y la Figura 2, entre el grupo normopeso (39.800 pg/ml) y el grupo sobrepeso-obeso (28.080 pg/ml) no hubo diferencias ($p=1,6$), el grupo MM (62.280 pg/ml) fue estadísticamente mayor que el grupo normopeso ($p=0,0092$) y que el grupo sobrepeso-obeso ($p=0,0008$).

Ensayos de Adhesión Celular:

Los ensayos de adhesión celular se efectuaron en 13 muestras, en 2 ocasiones distintas y cada vez en duplicado o triplicado, dependiendo del número de células de estroma de MO con que se contare.

Como se ilustra en la Tabla 4 y en la Figura 3, el grupo normopeso (2,03) fue significativamente menor que el grupo sobrepeso-obeso (3,8; $p=0,0091$) así como también del grupo mieloma (3,3; $p = 0,0025$), entre el grupo sobrepeso/obeso y el grupo mieloma no hubo diferencia significativa ($p = 1,2$).

Medición de mRNA para IL-6:

La medición de mRNA se efectuó en 13 muestras, las mismas empleadas para los ensayo de adhesión. Se estableció una relación entre el área de la banda de mRNA de IL-6 y de mRNA de GPDH, medida en la fotografía. Entre el grupo normopeso y el grupo sobrepeso-obeso el p fue de 2,47, entre el grupo normopeso y MM fue de 2,47, y entre el grupo sobrepeso-obeso y MM fue de 3. No hubo diferencias entre los grupos(Figura 4 y 5).

Morfología de los estromas:

Este resultado no estaba dentro de los objetivos del estudio, se encontró luego de la observación periódica de los tejidos de estroma de MO.

La Figura 6 corresponde a la de un individuo normopeso, la Figura 7 a un individuo sobrepeso/obeso y la Figura 8 a la de un individuo MM.

En el individuo normopeso se observa que la relación núcleo/citoplasma es cercana a la unidad, en cambio en los individuos con sobrepeso/obesidad y MM la dicha relación es menor a 1.

En el tejido del individuo normopeso se aprecia que para un mismo campo de aumento de microscopia óptica hay mas células por campo que en el individuo sobrepeso/obeso y MM.

Por ultimo, la disposición de las células en el paciente normopeso tiende a haber un contacto estrecho célula-célula, en cambio las células del paciente sobrepeso/obeso y del paciente MM se encuentran mas dispersas y con menos puntos de contacto célula-célula.

Tabla 1	Normopeso (a)	Sobrepeso-obeso (b)	Mieloma (c)	p
EDAD (años)	N= 6	N= 27	N=7	
Mediana	73	68,7	68	a y b = 2,1
Promedio	69.5	69,5	68	b y c = 2,4
Rango	61,5 – 74,6	66-73	65-73	a y c = 1,9

Tabla 1. Descripción de las edades por grupo de pacientes. No hubo diferencias entre los grupos. Se compararon los grupos utilizando el test de Kruskal-Wallis, se consideró significativo cuando el valor de **p** fue menor a 0,05.

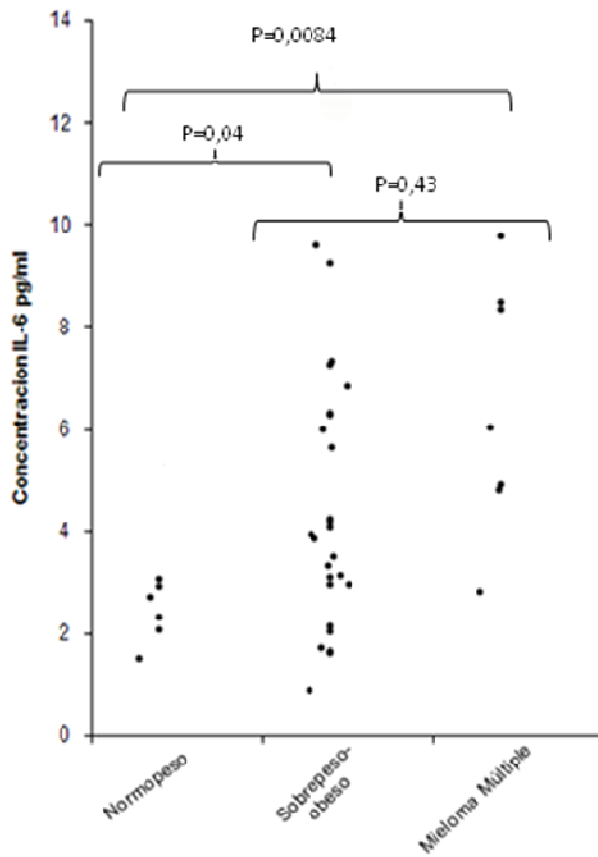


Figura 1. Gráfico que muestra la relación entre la concentración de IL-6 y los distintos grupos. En el eje de las Y se describen los distintos valores de la concentración IL-6 en pg/ml, en el eje de las X aparecen las categorías de peso y la categoría de MM. Cada punto en el área del gráfico corresponde a un individuo en dicha categoría. La concentración de IL-6 en el grupo normopeso (2,51 pg/ml) fue significativamente menor que en el grupo sobrepeso-obeso (4,04 pg/ml; $p=0,04$), en el grupo MM (6,02 pg/ml) fue significativamente mayor que el grupo normopeso ($p=0,02$) y entre el grupo sobrepeso/obeso y el grupo mieloma no hubo

Tabla 2	Normopeso (a) N= 6	Sobrepeso-obeso (b) N=27	Mieloma (c) N= 7	P
Concentración IL-6 (pg/ml)	2,51	4,09	6,02	$p= 0,0132$ a y b $p=0,04$ a y c $p=0,0084$ b y c $p=0,43$
Rango	2,1-3,05	2,14-13,7	2,82-9,78	

Tabla 2. Detalle de la concentración de IL-6 para cada categoría, los resultados se describen con la mediana, y se muestran los rangos de los valores para cada grupo. Se compararon los grupos utilizando el test de Kruskal-Wallis, se consideró significativo cuando el valor de **p** fue menor a 0,05.

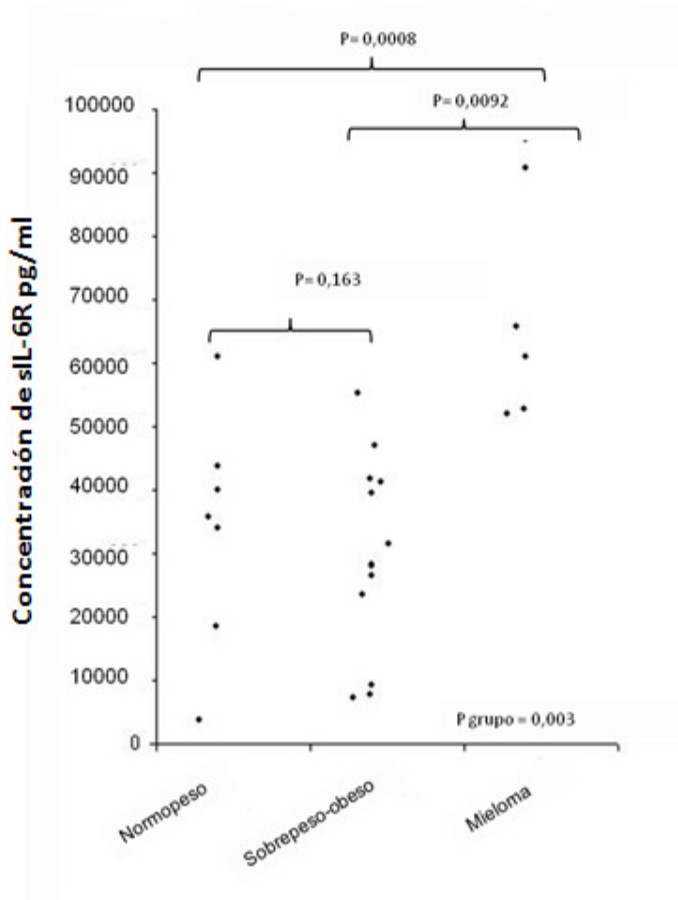


Figura 2. Gráfico que muestra la relación entre la concentración de sIL-6R y los distintos grupos. En el eje de las Y se describen los distintos valores de la concentración sIL-6R en pg/ml, en el eje de las X aparecen las categorías de peso y la categoría de MM. Cada punto en el área del gráfico corresponde a un individuo en dicha categoría. Entre el grupo normopeso (39.800 pg/ml) y el grupo sobrepeso-obeso (28.080 pg /ml) no hubo diferencias (p=1,6), el grupo MM (62.280 pg/ml) fue estadísticamente mayor que el grupo normopeso (p=0,0092) y que el grupo sobrepeso-obeso (p=0,0008).

Tabla 3	Normopeso (a) N= 3	Sobrepeso-obeso (b) N=11	Mieloma (c) N= 6	P
Concentración receptor IL-6 (pg/ml)	39.800	28.080	63.280	p= 0,0033 a y b p =0,163 a y c p =0,0092 b y c p =0,0008
Rango	33.930-43.830	7.280-46.930	52.080-95.100	

Tabla 3. Detalle de la concentración de sIL-6R para cada categoría, los resultados se describen con la mediana, se muestran los rangos de los valores para cada grupo. Se compararon los grupos utilizando el test de Kruskal-Wallis, se consideró significativo cuando el valor de **p** fue menor a 0,05.

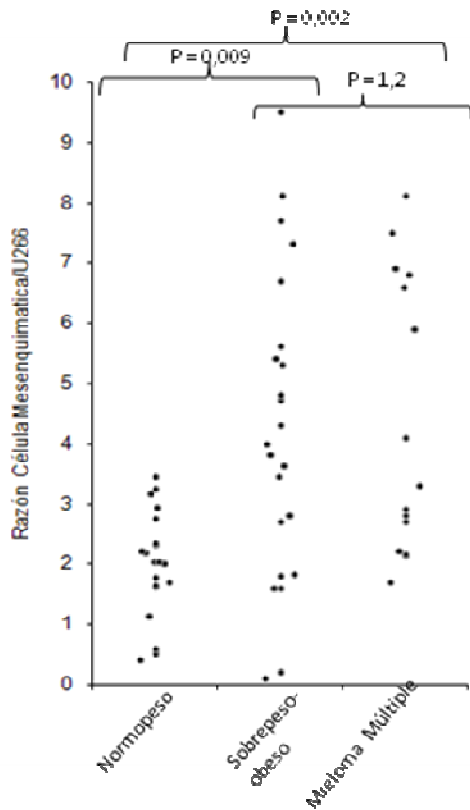


Figura 3. Gráfico que muestra la relación entre la relación entre la razón U266/Célula Mesenquimática y los grupos normopeso sobrepeso/obeso y MM. En el eje de las Y se describen los distintos valores de la relación U266/célula Mesenquimática. En el eje de las X aparecen las categorías de peso y la categoría de MM. Cada punto en el área del gráfico corresponde a un individuo en dicha categoría. El grupo normopeso (2,03) fue significativamente menor que el grupo sobrepeso-obeso (3,8; $p=0,0091$) así como también del grupo mieloma (3,3; $p = 0,0025$), entre el grupo sobrepeso/obeso y el grupo mieloma no hubo diferencia significativa ($p = 1,2$).

Tabla 4	Normopeso (a) N= 4	Sobrepeso-obeso (b) N=5	Mieloma (c) N=4	p
Relación U266/célula Mesenquimática	2,03	3,8	3,3	$p= 0,028$ a y b $p =0,0091$ a y c $p =0,0025$ b y c $p = 1,2$

Tabla 4. Detalle de la relación U266/celula mesenquimática para cada categoría, los resultados se describen con la mediana. Se compararon los grupos utilizando el test de Kruskal-Wallis, se consideró significativo cuando el valor de **p** fue menor a 0,05.

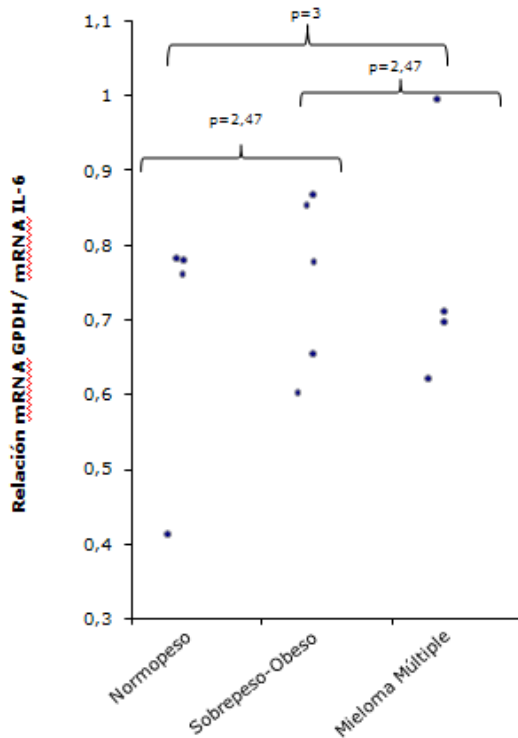
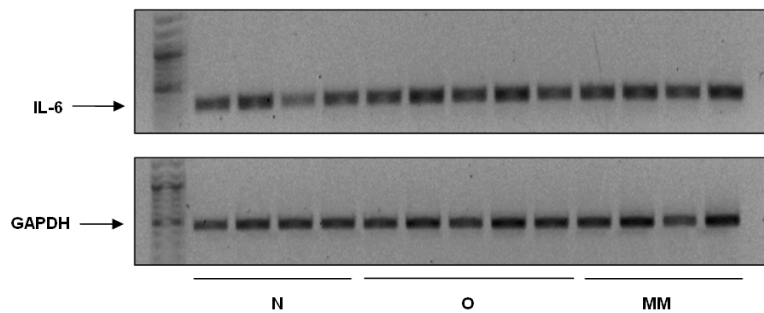


Figura 4. Gráfico que muestra la relación entre la razón mRNA GPDH/mRNA IL-6 y los grupos. En el eje de las Y se describen los distintos valores de la relación mRNA GPDH/mRNA IL-6. En el eje de las X aparecen las categorías de peso y la categoría de MM. Cada punto en el área del gráfico corresponde a un individuo en dicha categoría. Entre el grupo normopeso y el grupo sobrepeso-obeso el p fue de 2,47, entre el grupo normopeso y MM fue de 2,47, y entre el grupo sobrepeso-obeso y MM fue de 3. No hubo diferencias entre los grupos

Figura 5. Análisis por RT-PCR de la expresión del RNA mensajero de IL-6 en células de estroma de médula ósea de sujetos normopeso (N), obesos (O) y de pacientes con mieloma múltiple (MM). Cada carril corresponde a la muestra de un individuo.



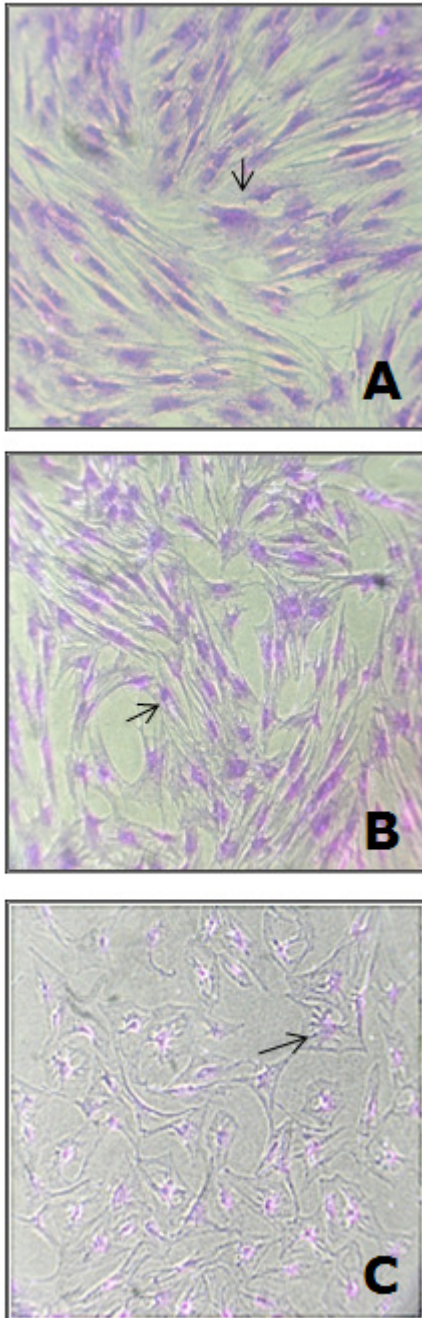


Figura 6. Fotografías de Estroma de Medula ósea a los 7 días de Cultivo por microscopia óptica, aumento 40X.

Células de paciente Normopeso(A), Células de paciente con sobrepeso/obesidad (B), Células de paciente con diagnóstico de MM(C). Las flechas señalan los núcleos celulares.

Destaca que en la histología del paciente (A) las células mantienen un contacto celular mas estrecho que en el paciente (B) y que le paciente (C).

DISCUSIÓN

La relación epidemiológica entre la obesidad y el MM, abre múltiples posibles explicaciones biológicas. El desbalance de citoquinas subyacente en ambas enfermedades tiene algunos elementos comunes como lo es el aumento de IL-6 y de moléculas de adhesión. En este sentido nos fue interesante estudiar el comportamiento de esta citoquina en la MO de pacientes sanos, sobrepeso-obeso y con MM, y evaluar la capacidad adhesiva de los estromas de dichos grupos de pacientes.

El nivel de IL-6 en el plasma de la MO de los pacientes con sobrepeso-obeso fue comparable al de los pacientes con MM y significativamente mayor que el nivel encontrado en los sujetos controles; esto podría contribuir a crear un ambiente propicio para la proliferación de células plasmáticas de MM.

El nivel del sIL-6R en el plasma de la MO de los pacientes obesos fue similar al de los controles, sin embargo los niveles aumentados de IL-6 en los pacientes sobrepeso-obeso podrían incrementar la cantidad de complejo IL-6/sIL-6R capaz de unirse a gp 130 para ejercer su acción celular (21, 22). Por otra parte estudios in-vitro han demostrado que la adición de sIL-6R en cultivos celulares de líneas de MM puede incrementar en hasta diez veces la sensibilidad de estas células a la IL-6 (50), de modo tal que en el caso de los pacientes sobrepeso-obeso el hecho de que los niveles de sIL-6R no difieran en relación al grupo control, podría ser interpretado como una ventaja en relación al grupo MM que presenta niveles de sIL-6R significativamente mayores que el grupo control y el grupo sobrepeso-obeso. Estos niveles aumentados en el grupo MM podría estar dado por las células tumorales presentes al momento del diagnóstico (7, 8, 13, 21, 50, 51).

No existen referencias en la literatura con respecto los niveles de sIL-6R en plasma de medula ósea de pacientes sanos, obesos ni con MM, pero si existen estudios que evalúan los niveles de estas proteínas en sangre periférica (52), reportando que los pacientes con diagnóstico de MM tienen niveles mayores de IL-6 y sIL-6R en relación a donantes sanos, lo cual es similar a lo encontrado por nuestro grupo.

Se sabe que la expresión de IL-6 por células del estroma de la médula ósea aumenta como consecuencia de la adhesión de células plasmáticas de MM (21). La expresión de mRNA para IL-6 en los tres grupos fue similar probablemente por la ausencia de células de MM en los cultivos de células de estroma de los pacientes con MM.

Para el grupo sobrepeso-obeso que presentó niveles de IL-6 comparables a los del grupo MM, el hecho que tenga niveles de mensajero igual a los otros grupos, sugiere que la IL-6 medida en el plasma de MO podría provenir de tejidos periféricos, particularmente de las células inflamatorias que infiltran el compartimento graso de los pacientes con sobrepeso y obesidad (53, 54, 55). Así estos pacientes tendrían aumentados los niveles circulantes de IL-6, lo cual no sería un hecho menor ya que se ha documentado que los niveles séricos de IL-6 se encuentran aumentados en pacientes con diagnóstico de desordenes linfoproliferativos, como el MM, leucemias, cáncer de mama, ovario, carcinoma de pulmón de células pequeñas, gástrico y colorectal (56).

En la literatura se describen efectos de la adhesión de células de MM sobre células de estroma de MO, en relación con la secreción de IL-6, aumentado su expresión tanto en estromas de individuos sanos como de individuos con MM (51, 57), sin embargo no hay estudios que evalúen la capacidad adhesiva de los estromas clasificándolos de acuerdo al IMC del donante. La mayor adhesividad que encontramos en el grupo de los pacientes obesos con respecto a los controles, sugiere

que las células de estroma de la médula ósea de dichos pacientes, tiene aumentada la expresión de moléculas de adhesión, lo que ha sido descrito en el endotelio de pacientes obesos (31, 38, 53, 53, 55) y no ha sido estudiado en las células del estroma de la MO. Éste fenómeno de mayor adhesión sugiere que en este grupo de pacientes los estromas de MO tienen modificada su fisiología, siendo más propicio para la proliferación de las células de mieloma.

Diversos estudios consignan que la célula de MM es capaz de modificar el estroma de la MO haciéndolo más propicio para su establecimiento (7, 8, 50, 51). Sin embargo, y dado que en la MO del paciente obeso no ha habido interacción de células de MM con el estroma, podemos sugerir que es la condición de obesidad la que modificaría la capacidad adhesiva de este tejido. De similar forma, la morfología de los estromas de los pacientes obesos es muy semejante a la de los pacientes con diagnóstico de MM, lo que es concordante con su comportamiento al ser expuesto a las células U266.

Los primeros estudios epidemiológicos que relacionaron el IMC con el RR de desarrollar MM, hipotetizaban acerca del posible rol de la IL-6, aumentada en individuos obesos, con el desarrollo y proliferación del MM (6). Por tanto, la regulación alterada de la acción de IL-6 y la mayor adhesividad de las células estromales de la MO podría constituir un aspecto de los mecanismos celulares que subyacen a la relación entre Obesidad y MM.

CONCLUSIONES

De la investigación podemos concluir que para el grupo estudiado:

1. Los pacientes obesos tienen una concentración de IL-6 en el plasma de MO mayor que individuos normopesos, lo cual no ha sido descrito en la literatura.
2. Los pacientes obesos, tienen modificada la fisiología de la MO, como se demostró en los resultados de las adhesiones y en la observación de los estromas de MO, lo que los haría susceptibles al establecimiento del Mieloma Múltiple.
3. Esta investigación reafirma el rol de la Obesidad en la génesis de las enfermedades crónicas no transmisibles, como lo es el Cáncer.

RECOMENDACIONES

La relación entre la Obesidad y el Cáncer, va tomando una forma mas sólida a medida que se avanza en los estudios básicos y clínicos, compartiendo ambas enfermedades a lo largo de su desarrollo fenómenos de inflamación crónica, con alteración de niveles de citoquinas que en muchos casos son comunes para ambas enfermedades.

Como señala el Segundo Informe de Expertos de la *World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research* (58) la mayor parte de los canceres puede ser prevenido, lo que contrasta con el determinismo clásico que se enseña en las escuelas de medicina en relación a que la herencia sería uno de los principales factores determinantes de su desarrollo. Las recomendaciones apuntan entre otras, a la mantención del IMC a lo largo de la vida lo mas cercano a lo normal (58), es decir normopeso, muy contrapuesto a la realidad de nuestro país, en que aproximadamente el 60% de la población adulta presenta Sobrepeso y Obesidad (59).

Así la relación entre la Obesidad y el desarrollo del Cáncer abre un gran campo de estudio y trabajo en el cual es fundamental la participación de científicos de las ciencias básicas y clínicas, de modo tal de llegar a un entendimiento mas profundo de su fisiopatología, la respuesta de interrogantes y la aplicación de probables soluciones.

Ya existe un gran camino avanzado en el estudio de la Obesidad y los Canceres sólidos, no así de los hematológicos.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación, entregan una aproximación a la relación entre el MM y Obesidad, afirmando el rol propuesto para la IL-6. También es cierto que se debe aumentar el número de pacientes del estudio para corroborar nuestros resultados y

sería interesante estudiar el rol de otras citoquinas en el desarrollo y establecimiento del Mieloma Múltiple en la médula ósea.

BIBLIOGRAFIA

1. Vio F, Albala C. Epidemiología de la Obesidad en Chile. *Rev Chil Nutr* 2000; **27**: 97-104.
2. Uauy R, Kain J. The epidemiological transition: need to incorporate obesity prevention into nutrition programmes. *Public Health Nutr* 2002; **5**: 223-9.
3. Ardern CI, Janssen I. Metabolic syndrome and its association with morbidity and mortality. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; **32**:33-45.
4. Calle E, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun M. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med* 2003; **348**:1625-38.
5. Friedman GD, Herrinton LJ Obesity and multiple myeloma. *Cancer Causes Control*. 1994 Sep; 5(**5**):479-83.
6. Larsson SC, Wolk A. Body mass index and risk of multiple myeloma: A meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007 Aug 6.
7. Seidl S, Kaufmann H, and Drach J . New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *THE LANCET Oncology Vol 4* September 2003.
8. De Raeve. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol* (2005) **20**: 1227-1250
9. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Research Vol 4* Suppl 3.
10. Conté G, Figueroa G, Lois V, Cabrera M, León A, García H, Rojas H. Mieloma múltiple en Chile. Características clínicas y sobrevida. *Rev Méd Chile* 2007; **135**: 1111-1117
11. Minsal <http://epi.minsal.cl/>
12. Zandecki , Lai , Facon . Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 1996; **94**: 217-27.

13. Seidl S, Kaufmann H, and Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *THE LANCET Oncology*, **Vol 4** September 2003.
14. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 2003; **17**: 427–36.
15. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; **98**:2229–38.
16. Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 2001; **97**: 822–25.
17. Moreau P, Facon T, Leleu X. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002; **100**: 1579–83.
18. Avet-Louseau, Daviet A., Sauner S. and Bataille R. Intergroupe Francophone du Myelome. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Haematol.* 2000; **111**: 1116-1117.
19. Hurt E.M., Wiestner A., Rosenwald A., Shaffer A.L., Campo E., Grogan T., Bergsagel P.L., Kuehl W.M. and Staudt L.M. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004; **5**: 191-199.

20. Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol* 2002; **118**: 1034–40.
21. Hideshima T, Podar H, Chauhan D. Cytokines and signal transduction. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **Vol. 18**, No. 4, pp. 509–524, 2005.
22. Murakami y cols, Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993 Jun **18**; 260(5115):1808-10.
23. Ogata S, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol.* 1997 Sep 1; **159**(5):2212-21.
24. Hirano. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol.* 1998;**16**(3-4):249-84.
25. Schuringa JJ, Jonk LJ, Dokter WH, Vellenga E, Kruijer W. Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J.* 2000 Apr 1;**347** Pt 1:89-96.
26. Tertegen Gatsios P, Bode JG, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130. *J Biol Chem.* 2000 Jun 23; **275**(25):18810-7.
27. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y. Bone morphogenetic protein-2

- induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood*. 2000 Sep 15; **96**(6):2005-11.
28. Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*. 2002; **4** Suppl 3:S233-42. Epub 2002 May 9.
 29. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **13**(2002) 357-368.
 30. Forsey R.J., Thompson J.M. , Ernerudh J. , Hurst T.L. , Strindhall J.,B. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mechanisms of Ageing and Development*. **124** (2003) 487- 493.
 31. Watson C., Whittaker S., Smith N. et al. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1996, **105**:112-119.
 32. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998, **22**, 1145-58.
 33. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, **85**, 3338-42.
 34. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002, **87**, 2084-9.
 35. Hans Hauner. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the nutrition society* (2005), **64**, 163-169.

36. Vettor R., Milan G., Rossato M., Federspil G.. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **22** (Suppl. 2): 3–10.
37. Fried et al. Omental and subcutaneous adipose tissue of obese subjects release interleukin-6: depot differences and regulation by glucocorticoids. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998; **83**,847-850.
38. Woods A, Brull DJ, Humphries SE and Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of IL-6. *European Heart Journal*. 2000; **21**, 1574-1583.
39. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002; **13** 357–368.
40. Stavros C. Manolagas, Teresita Bellido and Robert I. Jilka. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of il-6 and gp130. *Int. J Immunopharmacol*. Vol **17**. No. 2. pp. 109-116, 1995.
41. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A. The immune system in extreme longevity. *Experimental Gerontology* (2007) .Article in press.
42. Khosla S, Peterson J, Egan K, Jones J, Riggs L. Circulating Cytokine Levels in Osteoporotic and Normal Women. *Endocrinology Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. **79**, No. 3.
43. Boyum, A. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Suppl., 21, 51. (1968).
44. R. S. Bascht, Y. H. Kourit, and S. Karparkin. Expression of CD4 by human megakaryocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990).
45. Ichiro S, Benjamín L et al. Expansion of human adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields

- of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells* 2002; **20**:530-541.
46. Knüpfer H, Preiss R. Epub 2006 Aug 23. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Apr; **102**(2):129-35.
 47. Bono M, Reyes L, Roseblatt M. A flow cytometric procedure for the quantification of cell adhesion in complex mixtures of cells. *Journal of Immunological Methods* .**223**(1999)27–36.
 48. Bergui L., Schena M., Gaidano G., Riva M. & Caligaris-Cappio, F. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 613-618
 49. Nilsson K, et al. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin. Exp. Immunol.* **7**: 477-489, 1970
 50. Klein, B., Housseau, J.L. & Bataille, R. (1993) Cytokine and cytokine receptors in human multiple myeloma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **6**, 273–284.
 51. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews* August 2007. **Vol 7**.(585-598)
 52. Wierzbowska A, Urbanska-rys H and Robak T. Circulating IL-6-type cytokines and sIL-6R in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 1999, **105**, 412–419.
 53. Kathryn E. Wellen and Gökhan S. Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol **115**. 1111-1119, 2005.
 54. Stuart P. Weisberg, Daniel McCann,¹ Manisha Desai, Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, and Anthony W. Ferrante. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**:1796–1808 (2003).

55. Haiyan Xu, Glenn T. Barnes, Qing Yang, Guo Tan, Daseng Yang, Chieh J. Chou, Jason Sole, Andrew Nichols, Jeffrey S. Ross, Louis A. Tartaglia, and Hong Chen. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**:1821–1830 (2003).
56. Łukaszewicz M, Mroczo B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej.* 2007; **117** (5-6).
57. Uchiyama H, Barut B, Mohrbacher A, Chauhan D, and Anderson K. Adhesion of Human Myeloma-Derived Cell Lines to Bone Marrow Stromal Cells Stimulates Interleukin-6 Secretion. *Blood.* **Vol 82**, No 12 1993: pp 3712-3720
58. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007
59. Encuesta Nacional de Salud, 2003. MINSAL. <http://www.minsal.cl/>