

Ariel Gaspar Ramírez Labrada

Mecanismo de la apoptosis  
inducida por el inhibidor de  
quinasas sorafenib en células de  
mieloma humano

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Naval Iraberri, Javier  
Marzo Rubio, María Isabel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**MECANISMO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR  
EL INHIBIDOR DE QUINASAS SORAFENIB EN  
CÉLULAS DE MIELOMA HUMANO**

Autor

**Ariel Gaspar Ramírez Labrada**

Director/es

Naval Iraberri, Javier  
Marzo Rubio, María Isabel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013



# Universidad de Zaragoza

## TESIS DOCTORAL

Mecanismo de la apoptosis inducida por el  
inhibidor de quinasas sorafenib en células  
de mieloma múltiple humano

Ariel Gaspar Ramírez Labrada

1.-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....	1
2.-INTRODUCCIÓN .....	3
2.1.-MUERTE CELULAR .....	3
2.1.1.-Clasificación de la muerte celular.....	3
2.1.2.-Apoptosis o muerte celular Tipo I.....	5
2.1.2.1.-Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis.....	5
Caspasas .....	6
Familia de proteínas Bcl-2 .....	8
2.1.2.1.-Vía intrínseca .....	13
2.1.2.2.-Vía extrínseca .....	16
2.1.3.-Necrosis programada o muerte celular tipo III .....	20
2.1.3.1.-Inducción de la necroptosis.....	21
2.1.3.2.-Ejecución de la necroptosis .....	22
2.1.4.-Muerte celular asociada a autofágica o muerte celular de tipo II.....	24
2.1.4.1.-Macroautofagia .....	25
2.1.4.1.-Vías de señalización de la autofagia .....	25
2.1.4.2.-Autofagia y muerte celular .....	28
2.2.-MIELOMA MÚLTIPLE HUMANO.....	33
2.2.1.- Microambiente de las células de mieloma .....	34
2.2.2.-Características celulares .....	35
2.2.2.1.-Cariotipo.....	35
2.2.2.2.- Alteraciones genéticas.....	36
2.2.2.3.- Antígenos de superficie.....	37
2.2.3.-Células madre y cáncer.....	38
2.2.3.1-Células madres tumorales (CSCs).....	39
2.2.3.2-Células madres tumorales en mieloma múltiple humano (MM-CSCs)....	41
2.2.4.-Farmacoterapia del mieloma múltiple humano .....	44
2.2.5.-Sorafenib .....	47
2.2.5.1.-Las proteínas Raf.....	47
2.2.5.2.-Mecanismo de acción del sorafenib.....	49
2.2.6.-Inhibidores de mTORC.....	51
2.2.7.-Inhibidor de Jak .....	52
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	55

3.1.- Cultivos celulares .....	55
3.1.1.- Materiales y medios de cultivo celulares .....	55
3.1.2.- Líneas celulares utilizadas .....	55
3.1.3.- Mantenimiento de cultivos celulares .....	56
3.1.4.- Congelación y descongelación de líneas celulares .....	56
3.1.5.- Co-cultivo de células estromales con células de mieloma múltiple .....	57
3.2.- Estudio de proliferación, citotoxicidad, apoptosis y necrosis celular .....	57
3.2.1- Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad .....	57
3.2.2.- Fármacos citotóxicos y citostáticos .....	58
3.2.3.- Contaje y determinación de la viabilidad celular .....	58
3.2.4.- Determinación de la proliferación celular .....	58
3.2.5.- Determinación simultánea del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la translocación de fosfatidilserina.....	59
3.2.6.- Citometro de flujo .....	60
3.2.7.- Análisis del ciclo celular.....	61
3.3.- Análisis de la expresión de proteínas .....	61
3.3.1.- Materiales y reactivos para análisis de la expresión de proteínas.....	61
3.3.1.1.- Reactivos para la extracción e inmunoprecipitación de proteínas.....	61
3.3.1.2.- Materiales y reactivos para electroforesis de proteínas y transferencia a membranas .....	61
3.3.1.3.- Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos.....	62
3.3.2.- Métodos para el análisis de proteínas por western blot.....	63
3.3.2.1.- Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes .....	63
3.3.2.2.- Inmunoprecipitación de proteínas .....	64
3.3.2.3.- Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS .....	64
3.3.2.4.- Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF.....	65
3.3.2.5.- Análisis de proteínas por inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos .....	65
3.3.3.- Análisis de la expresión de proteínas por citometría .....	66
3.3.3.1.- Cambio conformacional de Bak y Bax.....	66
3.3.3.2.- Determinación de caspasa 3 activa .....	66
3.3.3.2.- Determinación de Citocromo c.....	67
3.3.4.- Análisis de la localización de proteínas por microscopía de fluorescencia ..	67
3.3.5.- Marcaje de antígenos de superficie .....	68

3.4.- Transfecciones transitorias .....	68
3.4.1.- Materiales y reactivos usados en las transfecciones transitorias .....	68
3.4.2.- Transfección mediante electroporación con Nucleofector® .....	68
3.5.-Análisis de RNA .....	69
3.5.1.- Reactivos utilizados en el análisis de RNA .....	69
3.5.1.1.- Reactivos utilizados en la extracción y cuantificación de RNA total.....	69
3.5.1.2.- Reactivos para la retro-transcripción de RNA (RT-PCR) .....	69
3.5.1.3.- Reactivos usados para el análisis de mRNA mediante RT-MLPA.....	69
3.5.1.4.- Reactivos utilizados en el análisis de RNA a tiempo real (Real Time PCR).....	70
3.5.1.5.- Productos utilizados para la electroforesis de DNA en gel de agarosa.	70
3.5.2.-Métodos utilizados en el análisis de RNA .....	70
3.5.2.1.- Extracción y cuantificación de RNA total .....	70
3.5.2.2.- Retrotranscripción del RNA a cDNA (RT).....	71
3.5.2.3.- Análisis de la expresión de RNA por RT-MLPA.....	71
3.5.2.4.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa .....	72
3.5.2.5.- Análisis de RNA mediante PCR en tiempo real (Real Time PCR) .....	73
3.5.2.5.- Desarrollo de la PCR cuantitativa .....	74
3.6- Obtención y análisis de células obtenidas a partir de muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple.....	75
3.6.1.- Obtención de células plasmáticas a partir de aspirados de médula ósea ....	75
3.6.2.- Inmunofenotipado y marcaje de células plasmáticas.....	76
3.6.3.- Separación de poblaciones celulares mediante MACS (separación celular basada en campos magnéticos) .....	76
3.7.-Sobreexpresión mediante infecciones retrovirales.....	77
3.7.1.-Generación de los retrovirus .....	77
3.7.2.-Infección de células eucariotas con retrovirus .....	78
3.7.3.-Obtención de líneas estables mediante clonaje por dilución limite.....	78
3.8.- Desarrollo tumoral en ratones .....	79
3.9.- Análisis de células madres tumorales de mieloma múltiple .....	79
3.9.1.- Marcaje con la sonda aldefluor .....	79
3.10.- Análisis informático de datos .....	80
3.10.1.- Estadística .....	80
3.10.2.- Análisis del efecto de la combinación de drogas .....	80

4.-RESULTADOS .....	81
4.1.-El sorafenib induce apoptosis en células de mieloma múltiple .....	81
4.1.1.-El sorafenib inhibe la traducción de señales en células de mieloma múltiple	81
4.1.2.-El sorafenib induce muerte en células de mieloma múltiple .....	82
4.1.3.-La muerte celular inducida por el sorafenib es a través de la vía intrínseca de la apoptosis .....	85
4.1.4.-Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel crucial en la apoptosis inducida por el sorafenib .....	91
4.2.-El sorafenib muestra actividad antitumoral en modelos de mieloma múltiple <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> .....	101
4.2.1.-El sorafenib muestra el mismo perfil de actividad frente a muestras de pacientes que el observado en las líneas celulares.....	101
4.2.2.-El sorafenib es activo <i>in vivo</i> en tumores generados en ratones nude.....	103
4.3.-El sorafenib induce autofagia células de mieloma múltiple .....	104
4.4.-El sorafenib induce necroptosis en células de mieloma múltiple .....	108
4.5.-El Sorafenib muestra potencial en terapia combinada .....	109
4.5.1.-La combinación de Sorafenib y Bortezomib debe ser personalizada .....	110
4.2.2.- El Sorafenib sensibiliza a células a Apo2L/TRAIL .....	112
4.2.3.-Sorafenib muestra un gran potencial en la combinación con varios fármacos .....	115
4.6.-Optimización del análisis de presuntas células madres de mieloma múltiple.....	122
5.-DISCUSIÓN .....	129
5.1.-El sorafenib induce apoptosis en células de mieloma múltiple de líneas celulares y de muestras de pacientes.....	129
5.2.-El sorafenib induce autofagia y necroptosis en células de mieloma múltiple.....	133
5.3.-El Sorafenib muestra potencial en terapia combinada .....	136
5.4.- Optimización del análisis de presuntas células madres de mieloma múltiple....	143
6.-CONCLUSIONES.....	147
6.-BIBLIOGRAFÍA .....	149



# 1.-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el pasado los fármacos antineoplásicos se identificaban mediante la detección a gran escala de sustancias químicas semisintéticas, sintéticas o productos naturales eficaces contra sistemas tumorales en animales, generalmente leucemias murinas. La mayoría de los agentes descubiertos en esta etapa (1950-1970) interactuaban con el DNA o sus precursores e inhibían la síntesis del material génico o causaban daño irreparable al DNA. En años recientes la identificación de nuevos fármacos se ha ampliado desde el área de los productos naturales y sustancias semisintéticas hasta campos totalmente nuevos basados en los avances en el conocimiento de la biología de las células normales y tumorales. El desarrollo de nuevos fármacos se basa en el diseño de moléculas que sean capaces de modular procesos moleculares vitales para las células.

Uno de estos procesos celulares es la apoptosis. Esta fue descrita por Kerr en 1972 (Kerr et al. 1972) aunque no ha sido hasta los últimos 20 años que se ha dilucidado el mecanismo molecular por el que transcurre. Este es el principal mecanismo de supresión tumoral que es ejecutado por células no malignas como un mecanismo de protección para eliminar células dañadas o no saludables y que pueden ser potencialmente dañinas.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por reducción del volumen celular, fragmentación y condensación nuclear, formación de “*blebbing*” y finalmente separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos. Durante la apoptosis ocurren una serie de eventos moleculares y bioquímicos que hacen que este sea un tipo de muerte muy controlado sobre el cual se ha tratado de influir mediante el uso de diferentes fármacos (Kroemer et al. 2009).

Nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en el estudio de la apoptosis y de fármacos antitumorales capaces de inducir apoptosis en células tumorales, principalmente de células procedentes de neoplasias hematológicas como leucemias y mieloma múltiple aunque también en células de tumores sólidos como colon, páncreas y mama (Gamen et al. 1997; Perez-Galan et al. 2002; Gomez-Benito et al. 2005; Galan-Malo 2010; Lopez-Royuela et al. 2010).

El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, después del linfoma no Hodgkin y constituye, aproximadamente, el 10% de todas las neoplasias hematológicas, y el 1% de todos los cánceres y causa el 2% de las muertes por cáncer. En Europa tiene una incidencia de 4,5-6,0/100000/año y una mortalidad de 4,1/100000/año (Harousseau and Dreyling 2010; Rajkumar 2011). Actualmente es una enfermedad incurable, aunque en los últimos años gracias a los nuevos fármacos ha aumentado la media de supervivencia, pasando de 3 a 7 años.

No obstante se siguen necesitando nuevas moléculas que mejoren el tratamiento y las esperanza de vida de los pacientes de mieloma múltiple. Por ello, este trabajo se ha centrado en esta enfermedad y en el posible uso terapéutico del sorafenib, un fármaco aprobado para

su uso en carcinoma renal y hepático en 2005 por la FDA. Este fármaco fue desarrollado inicialmente por la empresa Bayer como un inhibidor de la quinasa Raf y de esta forma de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, que controla la proliferación celular

El sorafenib es un potente inhibidor tanto de la forma normal de B-Raf, como de la forma mutada y aunque se diseñó originalmente para inhibir las isoformas de Raf también resultó ser un potente inhibidor de la autofosforilación de los receptores tirosín-quinasa VEGFR 1/2/3, PDGFR- $\beta$ , FGFR-1 y otros receptores tirosín-quinasa involucrados en tumorigénesis como c-Kit, FLT-3 y RET. Todas estas moléculas están implicadas en la etiología de muchas formas de cáncer humano (Wilhelm et al. 2006). En células de diferentes tipos tumorales se ha demostrado que el la inhibición de estas vías de traducción de señales induce apoptosis. Debido a esto nos hemos planteado la siguiente hipótesis general:

**El sorafenib es capaz de inhibir varias vías de traducción de señales esenciales para la supervivencia y proliferación de las células de mieloma múltiple. La inhibición de estas vías de traducción de señales induciría la muerte en células plasmáticas mielomatosas.**

Para demostrar esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos generales:

**1.- Caracterizar el mecanismo de muerte celular inducido por el sorafenib en líneas de MM humano, así como en muestras de células plasmáticas mielomatosas extraídas de pacientes.**

**2.- Identificar las posibles utilidades terapéuticas de las combinaciones entre el sorafenib y otros nuevos fármacos (ligando mortal APO2/TRAIL, inhibidores de mTOR, inhibidor del proteosoma bortezomib) que puedan ser de utilidad en la práctica clínica.**

**3.- Optimizar las técnicas de identificación y purificación de las presuntas células madres tumorales de mieloma múltiple para determinar la efectividad del sorafenib sobres esta población celular.**

## 2.-INTRODUCCIÓN

### 2.1.-MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado no sólo con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos, sino también, con mecanismos de defensa de varios tipos de enfermedades humanas. Según la definición del NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*) (Kroemer et al. 2009) una célula se considera muerta cuando se dan uno o varios de los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

- La célula ha perdido la integridad de la membrana.
- La célula, incluyendo el núcleo, ha sufrido fragmentación completa, mostrando los llamados cuerpos apoptóticos.
- Los fragmentos de la célula han sido fagocitados por las células adyacentes.

Aunque durante muchos años las investigaciones en el campo de la muerte celular han estado dominadas por criterios morfológicos, son posibles varias clasificaciones en función de distintos parámetros que permiten una mejor clasificación de la muerte celular, como son: criterios bioquímicos, características inmunológicas o aspectos funcionales.

#### 2.1.1.-Clasificación de la muerte celular

Debido a las posibles clasificaciones y a la discrepancia existente en la bibliografía, el comité de nomenclatura de muerte celular, ha emitido publicaciones de forma periódica para unificar criterio y proporcionar una clara y veraz clasificación funcional y bioquímica de la muerte celular que pueda servir de guía a los investigadores (Kroemer et al. 2005; Kroemer et al. 2009; Galluzzi et al. 2011).

Según la última clasificación publicada por el NCCD en el 2011 (Tabla 2.1) existen diferentes mecanismos que pueden conducir a la muerte celular. Y debido a los avances en la dilucidación de los mecanismos moleculares que subyacen en los diferentes tipos de muerte celular es aconsejable utilizar éstos en lugar de las características morfológicas para clasificar y caracterizar los diferentes tipos de muerte.

**Tabla 2.1.** Clasificación funcional basada en características bioquímicas de los tipos de muerte celular. Modificado de (Galluzzi et al. 2011).

Nomenclatura	Hallazgos bioquímicos	Dependencia de caspasas	Inhibidores
Anoikis	Disminución de EGFR. Inhibición de ERK1. Ausencia de $\beta$ 1-integrina. Sobreexpresión de BIM. Activación de caspasa-3 (-6,-7).	+ +	Sobreexpresión de Bcl-2. Administración de Z-VAD-fmk.
Muerte celular asociada a autofagia	Lipidación de MAP1LC3. Degradación de SQSTM1/p62.	- -	Inhibidores de VPS34. Silenciamiento génico de AMBRA1, ATG5, ATG7,

			ATG12 o BCN1.
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	MOMP. Disipación Irreversible del $\Delta\Psi_m$ .	++	Sobrexpresión de Bcl-2. Administración de Z-VAD-fmk.
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	Liberación de proteínas IMS. Inhibición de la cadena respiratoria.	--	Sobrexpresión de Bcl-2.
Cornificación	Activación de la transglutaminasa. Activación de la caspasa-14	+	Silenciamiento génico de la caspasa-14 Silenciamiento génico de TG1, TG3 O TG5.
Entosis	Activación de RHO. Activación de ROCK1	--	Silenciamiento génico de la metalotionina. Inhibidores lisosomales.
Apoptosis extrínseca por receptores mortales	Señalización de receptores mortales. Activación de caspasa-8 (-10). Proteólisis de BID y MOMP (en células tipo II). Activación de caspasa-3 (-6, -7)	++	Expresión de CrmA. Silenciamiento génico de la caspasa-8 y -3. Administración de Z-VAD-fmk.
Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia	Señalización por receptores de dependencia. Activación de PP2A. Activación de DAPK1. Activación de caspasa-9. Activación de caspasa-3, (-6,-7).	++	Silenciamiento génico de de la caspasa-9 y -3. Silenciamiento génico de PP2A. Administración de Z-VAD-fmk.
Catástrofe mitótica	Activación de la caspasa-2. Activación de TP53 Y TP73. Arresto mitótico.	--	Inhibición farmacológica o genético de la caspasa-2. Silenciamiento de TP53.
Necroptosis	Señalización por receptores mortales. Activación de RIP1 y/o RIP3. Inhibición de caspasas.	--	Administración de necrostatinas. Silenciamiento génico de RIP1 y/o RIP3.
Netosis	Inhibición de caspasas Liberación de NET. Activación de NADPH oxidasa.	--	Inhibición de autofagia. Silenciamiento génico de PAD4. Inhibición de la NADPH oxidasa.
Partenatos	Disipación Irreversible del $\Delta\Psi_m$ . Acumulación de PAR mediada por PARP1. Depleción de NADH y ATP. Translocación nuclear de AIF y unión de AIF a PAR.	--	Inhibición farmacológica o genética de AIF. Inhibición de PARP1.
Pirotosis	Activación de caspas-1. Activación de caspasa-8. Secreción de interleukina-1 $\beta$ e interleukina-18	++	Administración de Z-YVAD-fmk. Silenciamiento génico de la caspasa-1

Aunque los parámetros bioquímicos ofrecen grandes ventajas sobre los morfológicos, es importante tener en cuenta que un sólo parámetro no puede usarse como indicador inequívoco de una modalidad precisa de muerte celular ya que en ocasiones un mismo proceso molecular puede ser compartido por más de un tipo de muerte celular.

Como se aprecia en la Tabla 2.1 existen muchos tipos de muerte celular, pero sólo algunos de ellos tienen importancia desde el punto de vista farmacológico a la hora de inducir

muerte celular en células tumorales. Por lo que esta revisión se centrará, fundamentalmente, en los mecanismos de muerte celular por apoptosis (Tipo I), muerte celular asociada a autofagia (Tipo II) y necrosis (Tipo III), específicamente necroptosis.

## **2.1.2.-Apoptosis o muerte celular Tipo I**

La muerte celular programada es el principal mecanismo de supresión tumoral que es ejecutado por células no malignas como un mecanismo de protección para eliminar células dañadas o no saludables y que pueden ser potencialmente dañinas. El término “*apoptosis*” fue introducido por Kerr y Wyllce, (Kerr et al. 1972), para definir una muerte celular regulada con características morfológicas distintas a la muerte celular por necrosis.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por reducción del volumen celular, fragmentación y condensación nuclear, formación de burbujas y finalmente separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos. Durante la apoptosis ocurren una serie de eventos moleculares y bioquímicos que hacen que este sea un tipo de muerte muy controlado, con una función biológica clara dirigida a eliminar de forma silenciosa células que ya han realizado su función o que están dañadas irreversiblemente (Kroemer et al. 2009).

Uno de los eventos tempranos durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina a la superficie externa de la membrana plasmática, la cual representa una señal quimiotáctica para las células fagocíticas para eliminar estas células y los cuerpos apoptóticos resultantes de este proceso, contribuyendo, a evitar que se liberen componentes extracelulares al medio que desencadenen procesos inflamatorios (Fadok et al. 1998).

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías de señalización:

1) la vía intrínseca o mitocondrial, donde las señales de muerte provienen del interior de la célula, normalmente en respuesta a señales de estrés celular, daño en el DNA, niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS), infecciones virales o activación de oncogenes.

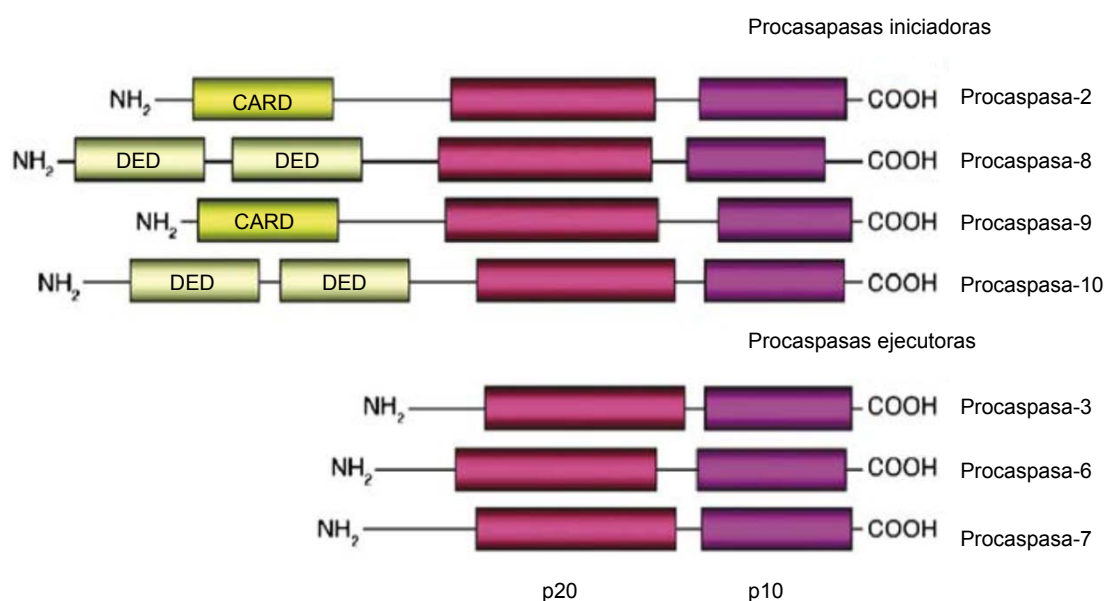
2) la vía extrínseca, la cual involucra la activación de receptores en la superficie celular por unión de ligando extracelulares. Ambas vías de activación de la apoptosis eventualmente convergen en la activación de enzimas proteolíticas llamadas caspasas que median rápidamente el desmantelamiento de las proteínas celulares y la estructura de la célula (Nicholson et al. 1995).

### ***2.1.2.1.-Proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis***

La activación de la apoptosis es un proceso controlado estrictamente y regulado por la interacción de un gran grupo de proteínas. Entre estas proteínas se distinguen dos grupos o familias ampliamente estudiadas: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2. Esta última familia se subdivide su a vez en tres grupos: antiapoptóticas, proapoptóticas y sólo-BH3.

## Caspasas

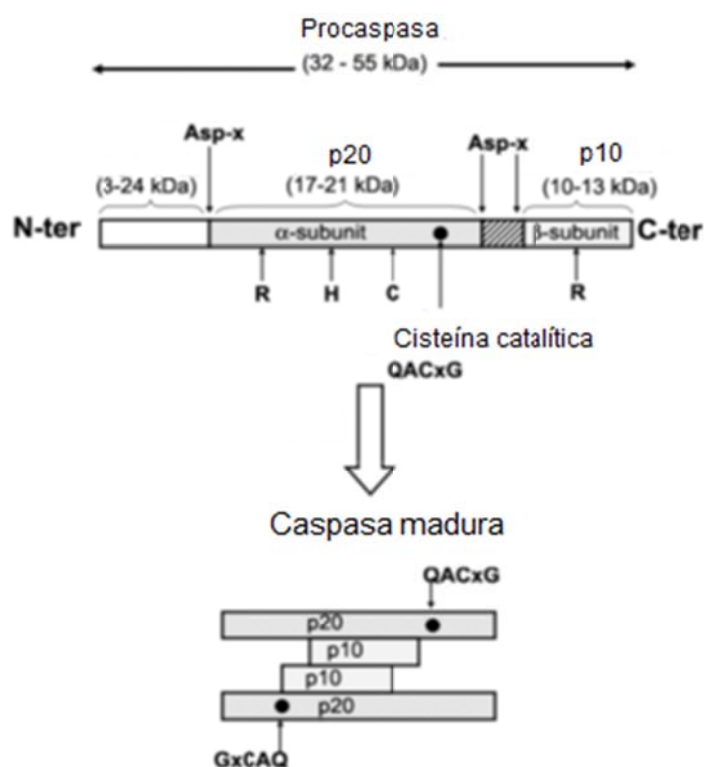
Las caspasas son una familia de proteínas que contienen un residuo nucleofílico de cisteína en el centro activo que participa en la ruptura proteolítica de motivos que contienen residuos de ácido aspártico, de aquí proviene su nombre (Caspases: “*Cysteiny-ASPartic-acid-proteASES*”) y fue adoptado por convenio en 1996 (Alnemri et al. 1996). La familia de las caspasas está compuesta por 15 miembros los cuales se pueden dividir en dos grupos: las caspasas procesadoras de citoquinas e involucradas en inflamación, también llamadas caspasas del grupo I y las caspasas involucradas en apoptosis (Figura 2.1), en las cuales centraremos la atención. Estas se pueden subdividir en caspasas iniciadoras o del grupo II (caspasas -8, -9 y -10) y caspasas ejecutoras o del grupo III (caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7).



**Figura 2.1.**-Procasasas involucradas en la apoptosis. Procaspasas iniciadoras (-2,-8,-9,-10) y procaspasas ejecutoras (-3,-6,-7). Modificado de (Rupinder et al. 2007).

Las caspasas se expresan en forma de zimógenos como precursores inactivos. Sin embargo, las caspasas iniciadoras son capaces de activarse autocatalíticamente, mientras que las caspasas ejecutoras necesitan activarse mediante su ruptura proteolítica por las caspasas iniciadoras (Siegel 2006). Todas las caspasas tienen un dominio proteasa de alta homología, este dominio puede ser dividido en dos subunidades una mayor de aproximadamente 20kDa y otra menor de aproximadamente 10kDa. Las caspasa iniciadoras poseen además una cola N-terminal de longitud variable en la que se pueden encontrar diferentes motivos reguladores, como el dominio efector de muerte (DED: *death effector domain*), presente en las procaspasas -8 y -10 o el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD: *caspase activation recruitment domain*), presentes en las procaspasas -2 y -9 (Figura 2.1). Estos dominios son muy importantes para la activación de estas caspasas ya que median las interacciones homo y heterofílicas entre las caspasas y con sus adaptadores (Rupinder et al. 2007).

Una vez las caspasas se activan (Figura 2.2), se asocian en forma de tetrámeros de dos subunidades p10 en el interior y dos subunidades p20 en el exterior formando dos centros activos por cada tetrámero. En la subunidad mayor es donde se encuentran los aminoácidos responsables de la acción catalítica, el residuo sulfhidrilo de la cisteína 285 y el residuo imidazólico de la histidina 237., No obstante el centro activo está formado por restos aminoacídicos tanto de la subunidad pequeña como de la subunidad grande. Durante el proceso de activación de la procaspasas es eliminado proteolíticamente tanto la cola N-terminal y los motivos que contienen así como el segmento peptídico que une las dos subunidades catalíticas p20 y p10 (Chowdhury et al. 2008).



**Figura 2.2.**-Procesamiento de las procaspasas y formación del tetrámero para constituir las caspasas activas. Se requieren tres cortes proteolíticos para eliminar el DD y el segmento de péptido que une las subunidades p10 y p20. Modificado de (Chowdhury et al. 2008).

La activación de las caspasas iniciadoras puede ser tanto por oligomerización (autoactivación) como por acción proteolítica. Y puede ser desencadenada tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo, la activación de las caspasas efectoras sólo puede ser por acción de enzimas proteolíticas ya sean caspasas iniciadoras u otras enzimas como las caspasas efectoras, la granzima B, catepsina G, calpains, y la serin-proteinasa apoptótica p24. Una vez activadas las caspasas se inicia una muerte programada por destrucción de componentes claves de la estructura celular (Rupinder et al. 2007; Chowdhury et al. 2008).

Debido al papel tan importante que juegan estas proteasas en la célula, existen diferentes mecanismos de regulación. Uno de ellos está compuesto por una familia de proteínas capaces de unirse e inhibir a las caspasas, llamadas IAPs (*inhibitor of apoptosis*

*protein*). Estas son una familia de proteínas originalmente identificadas en células de insectos infectadas por baculovirus (Crook et al. 1993). La familia de las IAP está formada por 8 proteínas muy conservadas en mamíferos y con diferentes patrones de expresión en varios tejidos. En los humanos se han identificado 6 de estas proteínas: NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*), survivina y BRUCE, y todas se caracterizan por la presencia del dominio de 70-80 aminoácidos llamado BIR (*baculoviral IAP repeat*), de forma que todos los miembros de esta familia contienen de uno a tres copias de este dominio. Las IAPs se unen a las caspasas inhibiendo su acción, en particular se unen a las caspasas -9, -3 y -7 pero son incapaces de unirse y por tanto de inhibir a la caspasa 8 (Roy et al. 1997; Deveraux and Reed 1999; Mace et al. 2010).

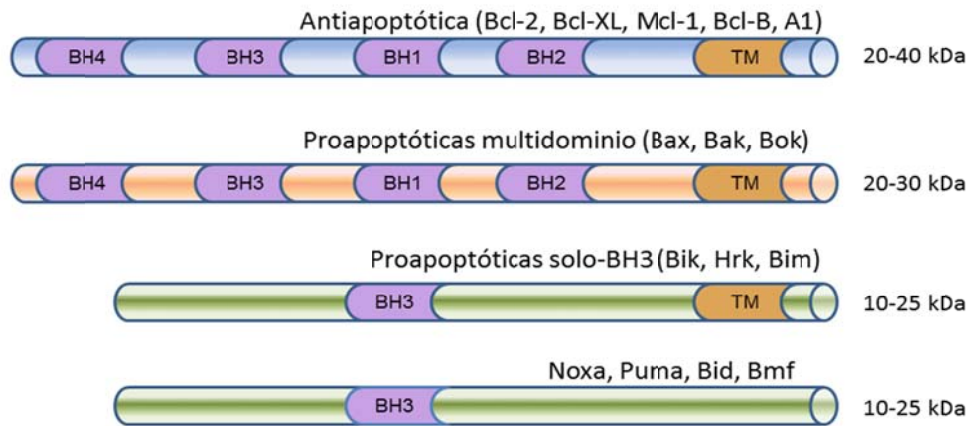
Las IAPs no son las únicas proteínas capaces de inhibir a las caspasas. Existen otras proteínas como c-FLIP la cual es capaz de inhibir la activación de la caspasa-8 inducida por la vía extrínseca de activación de la apoptosis. Esta proteína posee dos copias del dominio DED en su extremo N-terminal el cual es esencial para su mecanismo de acción. Existen tres isoformas principales descritas de esta proteína: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> y c-FLIP<sub>R</sub> (Golks et al. 2005). Cuando cualquiera de estas isoformas son sobreexpresadas inhiben la activación de la caspasa 8 por la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo la presencia en bajas concentraciones de la isoforma larga (c-FLIP<sub>L</sub>) facilita la activación de la caspasa 8 por heterodimerización (Boatright et al. 2004).

### ***Familia de proteínas Bcl-2***

Esta familia de proteínas desempeña un papel clave en el control de la vía intrínseca de la apoptosis. Las proteínas de esta familia contienen de uno a cuatro dominios de homología con Bcl-2 (BH), llamados BH1, BH2, BH3 y BH4. Esta familia de proteínas se divide en dos subgrupos basados en su similitud estructural y funcional: las proteínas antiapoptóticas y las proteínas proapoptóticas (Figura 2.3) (Adams 2003; Youle and Strasser 2008; Chipuk et al. 2010).

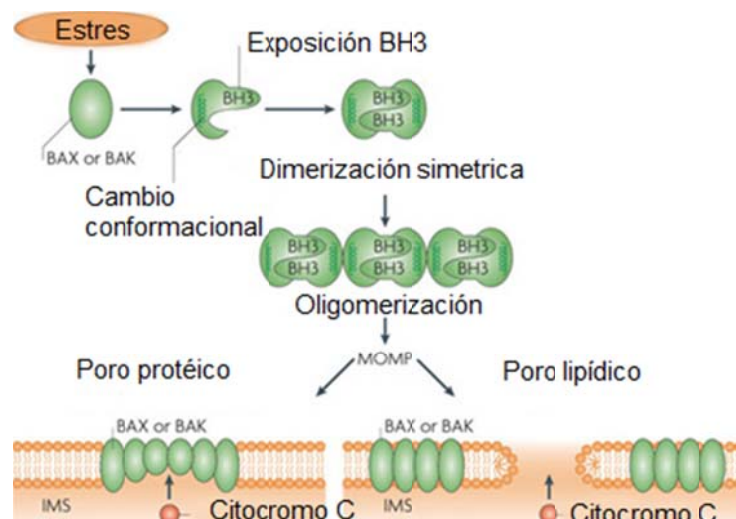
Las proteínas antiapoptóticas son las proteínas Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-W, Bcl-B y A1, y excepto Mcl-1 y A1, todas contienen los cuatro dominios BH. Los dominios BH1, BH2 y BH3 forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con las proteínas sólo-BH3 (Cory and Adams 2002; Michels et al. 2005; Certo et al. 2006). Además, poseen un dominio hidrofóbico C-terminal que facilita su inserción en la membrana externa mitocondrial (OMM: *outer mitochondrial membrane*) donde se encuentran generalmente, aunque también se pueden encontrar en el citosol o unidas a la membrana del retículo endoplasmático. Estas proteínas evitan la ejecución de la apoptosis por unión directa a las proteínas proapoptóticas (Chipuk et al. 2010).





**Figura 2.3.**-Familia de las proteínas Bcl-2. Se subdivide en tres grupos: antiapoptóticas, proapoptóticas y sólo-BH3. Las antiapoptóticas y las proapoptóticas presentan los cuatro dominios, mientras que las sólo BH3, como su nombre lo indica, sólo el dominio BH3, estas también pueden presentar o no el dominio transmembrana.

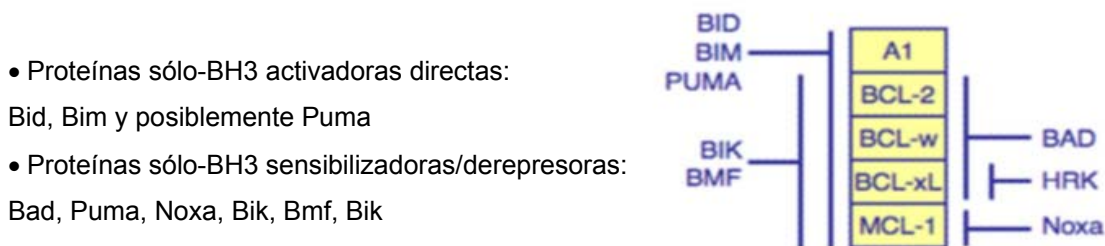
Por otro lado, las proteínas proapoptóticas se dividen en dos subtipos: las multidominios o efectoras y las sólo-BH-3 (figura 2.3). Originalmente se planteó que las proteínas proapoptóticas multidominios carecían del dominio BH4, es decir, las proteínas Bak y Bax sólo contenían los dominios BH1, BH2 y BH3 (Wei et al. 2001). Sin embargo, un estudio estructural más reciente revelan la presencia de un motivo BH4 conservado en estas proteínas al igual que en Mcl-1 (Kvansakul et al. 2008).



**Figura 2.4.**-Cuando Bax y Bak son activadas sufren un cambio conformacional que hace que se exponga el dominio BH3 a través del cual dimerizan para formar el MOMP. Existen dos teorías que tratan de explicar la formación de este poro. Una postula que se forma un canal proteico por la oligomerización de Bax o Bak mientras que el otro plantea que estas proteínas facilitan la formación de un poro lipídico. Modificado de (Tait and Green 2010).

La activación de estas proteínas conduce a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (OMM) (Figura 2.4) por la formación del poro mitocondrial, MOMP (*mitochondrial outer membrane pore permeabilization*) (Rasola and Bernardi 2007). En condiciones normales, estas proteínas existen como monómeros inactivos, Bax en el citosol y Bak anclado en la membrana externa mitocondrial y una vez activadas Bax es traslocada a la OMM y ambas sufren cambios conformacionales que les permiten oligomerizar y formar el poro mitocondrial, lo cual desencadena diferentes acontecimientos a nivel mitocondrial y celular.

Las proteínas sólo-BH3 juegan un papel crucial como sensores del estrés celular y como su nombre indica, tienen sólo el dominio BH3. Este dominio, formado por 9 aminoácidos, es necesario y suficiente para inducir apoptosis (Huang and Strasser 2000; Willis and Adams 2005; Shibue and Taniguchi 2006). Miembros de la subfamilia de las proteínas sólo-BH3 son las proteínas Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf, Hrk y Bik entre otras. A su vez estas se pueden subdividir en función de su capacidad para interactuar con las proteínas antiapoptóticas o con las proteínas multidominio. Las que interactúan sólo con las antiapoptóticas se llaman “sensibilizadoras” y/o “de-represoras”, en cambio las que pueden interactuar tanto con las antiapoptóticas como con las proapoptóticas se les llama “activadoras directas” (Bid, Bim y posiblemente Puma) y son capaces de inducir la activación de Bax y Bak (Figura 2.5). Estas proteínas están muy reguladas, tanto a nivel transcripcional, como es el caso de Puma, Noxa y Hrk, como a nivel post-transcripcional, como Bad y Bim. Esta última puede ser regulada por fosforilación por Erk, que activa su degradación por el proteasoma. También algunas proteínas sólo-BH3 puede ser activadas por cortes proteolíticos como Bid que es cortada por la caspasa 8 generando su forma activa tBid; que expone el dominio BH3. Además, cada una de estas proteínas tiene un perfil único y característico de unión a las proteínas antiapoptóticas lo que posiblemente permite un control más fino y específico en cada tejido y para cada estímulo apoptótico (Chipuk et al. 2010).



**Figura 2.5.**-Clasificación de las proteínas sólo-BH3 y patrón de interacción con las antiapoptóticas. Bid y Bim serían las activadoras directas, aunque según algunas publicaciones Puma también podría ser incluida en este apartado, en cambio el resto de las proteínas sólo-BH3 serían sensibilizadoras o derepresoras. Modificado de (Chipuk et al. 2010)

La activación de las proteínas de la familia de Bcl-2 determina que se ejecute la apoptosis en la célula. De todas estas proteínas, la activación de Bax y Bak provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial y que se activen las caspasas y se lleve a cabo

el desmantelamiento de la célula. La activación de Bax/Bak va a depender de las interacciones entre las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, las proteínas sólo-BH3 y las propias proteínas Bax y Bak. Existen diferentes modelos (Figura 2.6) que tratan de explicar los mecanismos por los que interactúan todas las proteínas de esta familia e inducen la activación Bax y Bak:

**El modelo directo:** se basa en que existen al menos dos proteínas sólo-BH3 que son capaces de inducir directamente la activación de las proteínas multidominio Bax y Bak. Estas son Bid y Bim, aunque posiblemente Puma también podría realizar esta función, aunque existen datos contradictorios. Estas dos proteínas son capaces de inducir el cambio conformacional y la oligomerización de Bax y Bak. En el caso de la activación de Bax por Bid el primer paso es la asociación de Bid a la OMM, seguido del reclutamiento de Bax, el cual se encuentra en forma soluble en el citosol, luego Bax se ancla a la OMM y finalmente oligomeriza (Willis et al. 2007; Gavathiotis et al. 2008). Según este modelo el resto de las proteínas sólo-BH3 actuarían desplazando a las activadoras de su unión con las antiapoptóticas, permitiéndole la activación de Bax y Bak (Figura 2.6A).

No obstante, la observación de que la apoptosis dependiente de Bax/Bak puede ser realizada en ausencia de Bim y Bid sugiere la existencia de un mecanismo alternativo en el cual serían innecesarios los activadores directos (Willis et al. 2007).

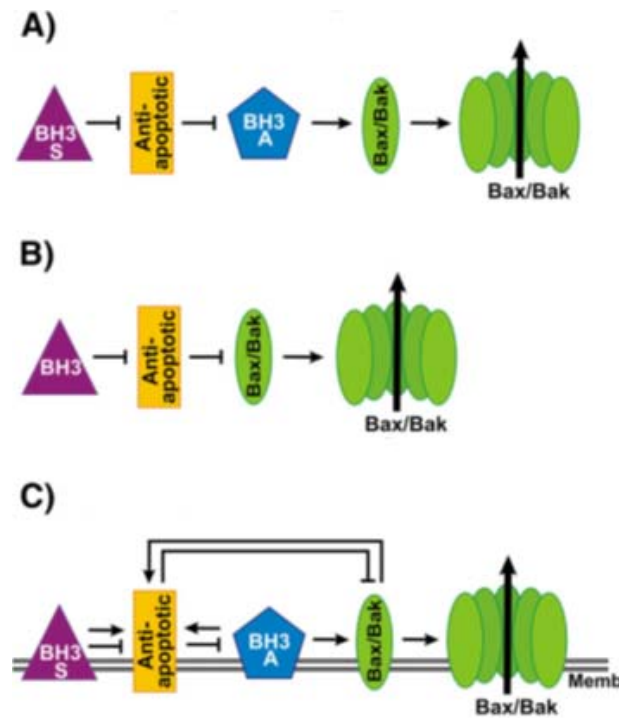
**El modelo indirecto o de desplazamiento:** las proteínas sólo-BH3 actúan fundamentalmente uniéndose a las proteínas antiapoptóticas y no a las proapoptóticas Bax/Bak, ya que este modelo supone que existe una cierta actividad basal de Bax y Bak que es inhibida por las antiapoptóticas al unirse a ellas. Por lo que Bax/Bak son liberada de su inhibición, al unirse, las proteínas sólo-BH3, a las antiapoptóticas con mayor afinidad, permitiendo de este modo la activación y oligomerización de Bax/Bak. Según este modelo Mcl-1 y Bcl-XL se unirían a Bak mientras que el resto de las proteínas antiapoptóticas se unirían a Bax y debido a la interacción selectiva de las proteínas sólo-BH3 a un espectro específico de proteínas antiapoptóticas, se necesitaría la acción conjunta de varias proteínas sólo-BH3 para inducir la apoptosis en células que expresaran varias antiapoptóticas. A pesar de que este modelo se basa en la observación de que Bax y Bak pueden ser activadas en ausencia de tBid y de Bim y una cantidad muy reducida de Puma, no se valora la actividad residual de Puma y de otras proteínas como p53 y Drp1 que podrían activar directamente a Bax/Bak (Figura 2.6B) (Chipuk et al. 2004; Willis et al. 2007; Gavathiotis et al. 2008; Montessuit et al. 2010; Shamas-Din et al. 2010).

Mientras que ambos modelos proponen una función diferente para las proteínas antiapoptóticas, ambos modelos surgieron que la especificidad se consigue por las diferencias en la afinidad de las proteínas sólo-BH3 por las proteínas antiapoptóticas. Sin embargo, ninguno de los modelos tiene en cuenta las membranas como un ente activo. Estas son vistas sólo como un ente pasivo que sirve de soporte a las proteínas de la familia Bcl-2.

Para salvar estas deficiencias, y otras observaciones que no consiguen explicar ninguno de estos modelos por separados se ha propuesto un modelo unificado o mixto al cual se le han

incorporado las características específicas aportadas por las membranas lipídicas y ha sido llamado “*Embedded together model*” (Shamas-Din et al. 2010).

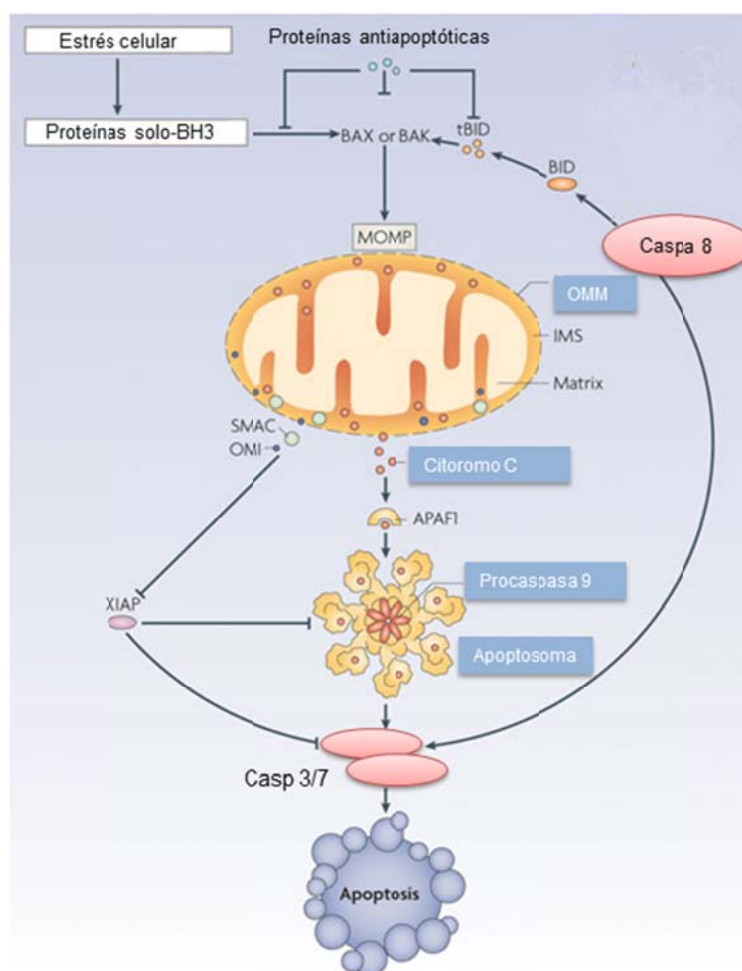
**Modelo mixto en membrana (*Embedded together model*):** en este modelo destaca el papel activo de la OMM donde se encuentran insertadas las proteínas de la familia Bcl-2 y ocurren los cambios conformacionales necesarios para la función de estas proteínas. Según este modelo, las proteínas antiapoptóticas citoplasmáticas son reclutadas a las membranas y activadas, tanto por proteínas sólo-BH3 sensibilizadoras como activadoras, así como por Bax y Bak. Una vez en las membranas las proteínas antiapoptóticas inhiben a las proteínas sólo-BH3 activadoras y a Bax y Bak, inhibiendo la oligomerización y la formación del MOMP. Para que la apoptosis tenga lugar, las proteínas sólo-BH3 sensibilizadoras desplazan a las activadoras y a Bax/Bak de las antiapoptóticas y las proteínas sólo-BH3 activadoras reclutan a Bax desde el citosol a la OMM. Estas interacciones son reversibles y gobernadas por un equilibrio constante que es alterado por la concentración e interacciones entre estas proteínas y las membranas (Figura 2.6C) (Leber et al. 2007; Bogner et al. 2010; Leber et al. 2010; Shamas-Din et al. 2010).



**Figura 2.6.-**Modelos propuestos para explicar como se activan Bax y Bak para crear el MOMP. A) modelo directo, las proteínas sólo-BH3 sensibilizadoras desplazan a las activadoras directas de su inhibición por las antiapoptóticas, permitiendo que las activadoras activen a Bax y Bak. B) modelo indirecto, asume que existe una fracción de Bax y Bak activa constitutivamente que es inhibido por las antiapoptóticas y son desplazadas por las sólo-BH3 sensibilizadoras. Y C) modelo mixto, en este se tiene en cuenta a la membrana como un ente activo en el mecanismo de activación de Bax y Bak y además combina los dos modelos anteriores. Modificado de (Shamas-Din et al. 2010).

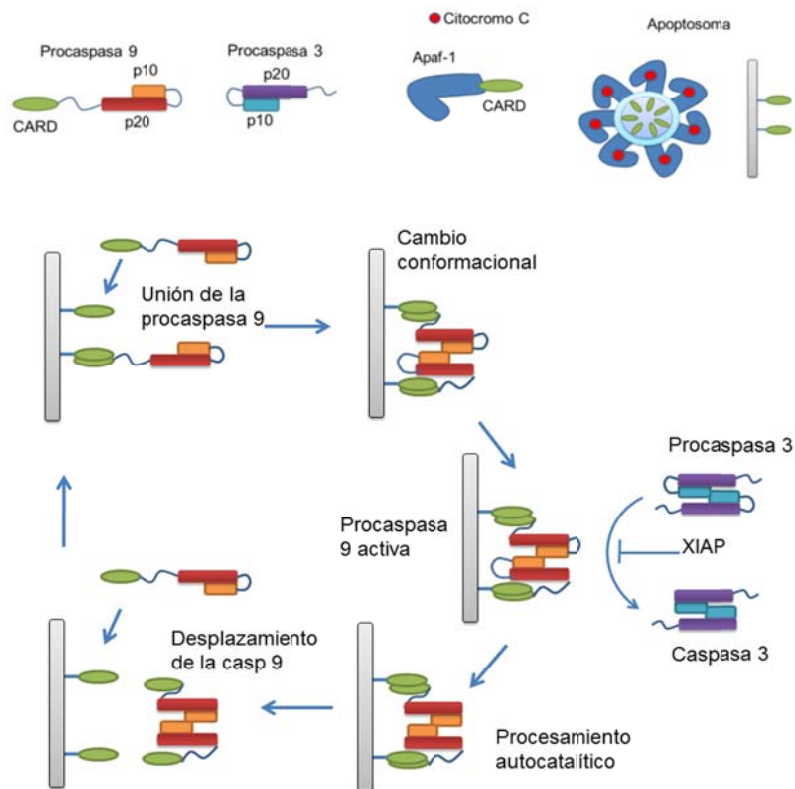
### 2.1.2.1.-Vía intrínseca

También llamada vía mitocondrial por la participación de éste orgánulo celular. Es una vía bien caracterizada de activación de caspasas en la que participan las proteínas de la familia Bcl-2 y es desencadenada en respuesta a una gran variedad de estímulos que inducen estrés celular como puede ser agentes quimioterapéuticos, radiaciones UV, estrés oxidativo, ausencia de factores de crecimiento, daños en el DNA, acumulación de proteínas mal plegadas entre otros. Aunque existen una gran variedad de estímulos que pueden desencadenar esta vía de activación de la apoptosis todos convergen en la mitocondria y de ahí el nombre de vía mitocondrial (Figura 2.7) (Galluzzi et al. 2011).



**Figura 2.7.-**Vía intrínseca de la apoptosis. La mitocondria ocupa el eje central de esta vía. Una vez activada Bax/Bak se forma el MOMP lo que permite la salida de todos los factores apoptogénicos de la mitocondria, además de la interrupción de la fosforilación oxidativa y el colapso energético de la célula. Modificado de (Tait and Green 2010)

La mitocondria está formada por una matriz rodeada por una membrana interna, el espacio intermembrana y la membrana exterior. La membrana interna contiene proteínas tales como la ATP sintasa, los componentes de la cadena transportadora de electrones entre otras. En condiciones fisiológicas normales, estas moléculas permiten a la cadena transportadora de electrones crear un gradiente electroquímico o potencial de membrana, además, en el espacio intermembrana se encuentran diferentes moléculas como citocromo c, Endo G, Diablo/Smac y AIF (*apoptosis inducing factor*), entre otras. Cuando, por un estímulo apoptótico, se activan las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak y se forma el poro MOMP, el potencial de membrana se disipa, se deja de producir ATP y son liberadas una serie de proteínas apoptogénicas desde el espacio intermembrana al citosol. Por lo que la activación de la vía intrínseca induce la activación de diferentes mecanismos efectores de la apoptosis acoplado a una catástrofe bioenergética y metabólica.



**Figura 2.8.**-Formación del apoptosoma y activación de la caspasa 9 por cambio conformacional y por procesamiento proteolítico. La caspasa 9 a su vez activa a la procaspasa 3. Una vez formada la caspasa 3 esta es desplazada del apoptosoma por la procaspasa 9 comenzando un nuevo ciclo.

De las proteínas apoptogénicas liberadas del espacio intermembrana una vez formado el MOMP una de las mas importante es el citocromo c, el cual una vez en el citosol junto con Apaf1 y (d)ATP participan en la formación del apoptosoma, lo que provoca la activación de la caspasas 9 y esta a su vez activa a la caspasa 3 a través de una cascada proteolítica (figura 2.8). El apoptosoma esta formado por 7 moléculas de Apaf-1 lo que proporciona 7 dominios CARD a través de los cuales se puede unir la procaspasa 9 al apoptosoma por la interacción de los dominios CARD $\leftrightarrow$ CARD. Esto provoca cambios conformacionales que inducen su

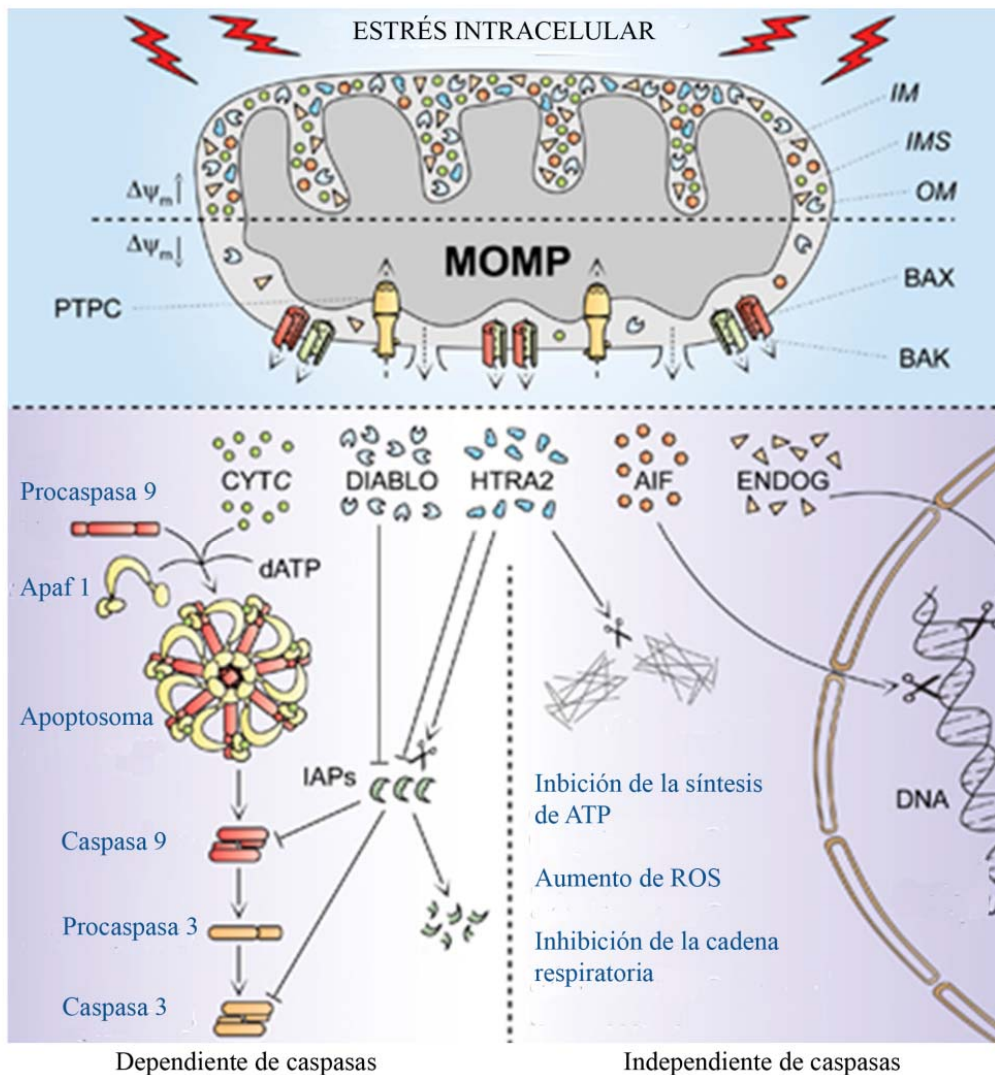
activación sin necesidad de ser procesada proteolíticamente, ya en este estado es capaz de activar a la caspasa 3 por corte proteolítico. No obstante la procaspasa 9 es también activada tanto autocatalíticamente como por procesamiento por la caspasa 3 ya activada, lo que hace que sea desplazada del apoptosoma por moléculas de procaspasa 9, comenzando de esta forma un nuevo ciclo de activación de caspasa 9 (Figura 2.8) (Li et al. 1997; Zou et al. 1997; Wurstle et al. 2012).

Sin embargo, para que la activación de las caspasas pueda realizarse es necesario eliminar el efecto inhibitorio de las proteínas IAP, algunas de las cuales ejerce un efecto muy potente, como XIAP. Para esto también son liberadas otras proteínas del espacio intermembrana, como SMAC/DIABLO y HtrA2 las cuales inhiben la función antiapoptótica de diferentes miembros de la familia de las IAP y por tanto contrarrestan la inhibición de las caspasas (Chai et al. 2000; Srinivasula et al. 2003; Yang et al. 2003).

Por otro lado, AIF y EndoG se trasloca al núcleo, donde median la fragmentación del DNA de forma independiente de las caspasas (Susin et al. 1999; Li et al. 2001). Adicionalmente, HtrA2 ejecuta un efecto proteolítico independiente de las caspasas debido a su actividad serín-proteasa (Hegde et al. 2002). Todo este mecanismo presenta un considerable grado de redundancia, demostrado por el hecho que en los ratones knockout o en líneas celulares con silenciamiento génico de alguna de estas proteínas individuales no se afecta la ejecución de la vía intrínseca de la apoptosis. En algunos casos, la inhibición de las caspasas ya sea química o genéticamente, sólo retrasa la ejecución de la muerte, la cual, eventualmente exhibe características morfológicas de necrosis (Kroemer and Martin 2005; David et al. 2006).

Debido a estas observaciones el NCCD sugiere la siguiente definición de apoptosis intrínseca: proceso de muerte celular mediada por MOMP, y por tanto siempre asociado a disipación irreversible del potencial mitocondrial, liberación de proteínas del espacio intermembrana y su relocalización en otros compartimentos subcelulares e inhibición de la cadena respiratoria. Según estos criterios la apoptosis por la vía intrínseca se puede dividir en: dependiente de caspasas e independiente de caspasas, basada en la magnitud de la citoprotección conferida por la inhibición de las caspasas, ya sea farmacológica o genética (Tabla 2.1 y Figura 2.9). Estas distinciones son particularmente relevantes *in vivo*, ya que *in vitro*, en el caso independiente de caspasas, la actividad de AIF o EndoG entre otros, o la depleción de ATP, tiende a prevalecer sobre la inhibición de las caspasas resultando en la muerte de la célula (Figura 2.9) (Chautan et al. 1999; Daish et al. 2004).





**Figura 2.9.**-Clasificación de la vía intrínseca de activación de la apoptosis en dependiente de caspasas e independiente de caspasas. Modificado de (Galluzzi et al. 2011).

### 2.1.2.2.-Vía extrínseca

El término apoptosis extrínseca ha sido ampliamente usado para definir la muerte celular apoptótica inducida por señales de estrés extracelular que son detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos. La vía extrínseca de la apoptosis es iniciada por la unión de un ligando de muerte, como Fas/CD95 ligando (FasL/CD95L), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) y Apo2L/ TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) a sus correspondientes receptores de muerte. De forma alternativa la vía extrínseca de inducción de la apoptosis también se activa por “receptores de dependencia” los cuales sólo ejercen su función letal cuando la concentración de su ligando disminuye por debajo de ciertos límites críticos (Wajant 2002; Schutze et al. 2008; Mehlen and Bredesen 2011).

El factor de necrosis tumoral  $TNF-\alpha$  es una citoquina que se describió por primera vez en 1975 (Carswell et al. 1975). Es una proteína compuesta por 185 aminoácidos que se sintetiza



como un precursor inactivo de 212 aminoácidos y que es procesada por la enzima convertidora de TNF- $\alpha$ , (*TACE: TNF-alpha converting enzyme*). Esta enzima media la rotura de una forma de TNF- $\alpha$  asociada a membrana, lo que induce la formación de la molécula activa (Goto et al. 2004). Esta molécula es secretada por muchos tipos de células tras su estimulación, como macrófagos, monocitos, neutrófilos, granulocitos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliales, células T y células NK. La molécula secretada es un complejo multimérico compuesto por dos, tres o cinco moléculas unidas no covalentemente (Beutler and Cerami 1986).

Su receptor inductor de apoptosis es el llamado TNFR1 (55 kDa). Este receptor se expresa principalmente en células hematopoyéticas, como macrófagos, monocitos, células dendríticas o linfocitos. La unión del TNF- $\alpha$  a su receptor desencadena varios tipos de señales, como la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que conduce a la expresión de multitud de genes implicados en respuestas proinflamatorias. Sin embargo, la unión del TNF- $\alpha$  a su receptor puede inducir apoptosis si la activación de NF- $\kappa$ B está bloqueada (Nagata 1997). Su papel en la muerte celular es esencial en la citotoxicidad mediada por macrófagos, aunque también está implicado en la muerte mediada por células T (Decker et al. 1987).

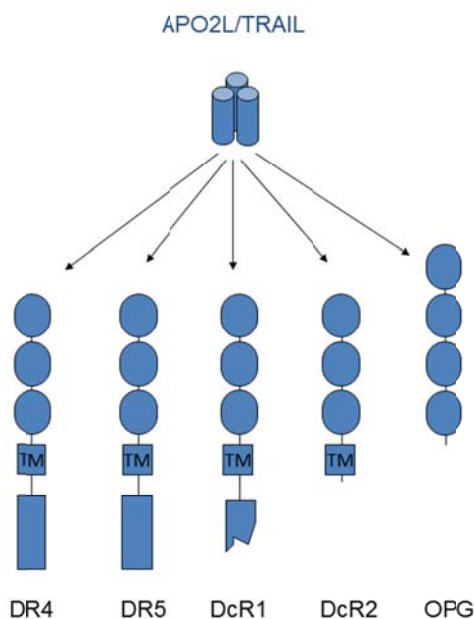
Otro de los ligandos mortales es CD95L/FasL. Este es una glicoproteína de membrana que se acumula en el citoplasma dentro de cuerpos multivesiculares y es secretado al exterior celular insertado en microvesículas (Martinez-Lorenzo et al. 1999; Monleon et al. 2001). FasL se expresa principalmente en linfocitos B, T, NK y células dendríticas y su capacidad de inducir apoptosis es fundamental tanto en la inmunidad antitumoral como en el mantenimiento de la homeostasis tisular. En el primer caso, la expresión de este ligando en las células efectoras del sistema inmune produce la muerte de la célula diana. En el segundo, su expresión produce la muerte de células T aloreactivas o permanentemente activadas en un proceso conocido como muerte celular producida por activación, AICD (*activation induced cell death*) (Brunner et al. 1996; Hildeman et al. 2002).

Por otra parte, FasL no sólo está implicado en muerte celular sino también en el desarrollo de la respuesta inmune puesto que se ha descrito su implicación en la proliferación y activación de linfocitos T (Bosque et al. 2007; Bosque et al. 2008).

Su receptor es Fas/Apo-1/CD95, una glicoproteína de membrana de tipo I, con un dominio mortal. En la superficie celular se encuentra en forma de trímeros pre-formados que se entrecruzan para formar agregados más complejos tras la unión del ligando mortal (Nagata and Golstein 1995).

El último de los ligandos mortales descrito ha sido Apo2L/TRAIL. Este ligando mortal, descubierto en el año 1995 por dos grupos independientes (Wiley et al. 1995; Pitti et al. 1996) es una proteína transmembrana que se expresa, en humanos, en todos los tejidos. La rotura de su extremo C terminal da lugar a la forma soluble de TRAIL. Este ligando se une a sus receptores en la superficie de la célula en forma de homotrímeros, potenciándose así la transmisión de la señal respecto a la unión de la forma monomérica (Kimberley and Screaton 2004).

Apo2L/TRAIL se puede unir a cinco receptores (Figura 2.10), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) y TRAIL-R4 (DcR2), aunque sólo dos de ellos inducen apoptosis: DR4 y DR5. Los receptores DcR1 y DcR2 se denominan receptores señuelo y, aunque su estructura extracelular es similar a la de los receptores mortales, son incapaces de transmitir la señal apoptótica, bien porque carecen del dominio mortal en su parte citoplasmática o porque lo tienen mutado, respectivamente (Ashkenazi and Dixit 1998). La osteoprotegerina (OPG) es un receptor señuelo soluble de RANKL que se puede unir también a Apo2L/TRAIL (Emery et al. 1998). Su función no es apoptótica sino que, en condiciones normales, es secretado por las células del estroma y actúa evitando la activación de los osteoclastos por RANKL, que producen destrucción ósea.



**Figura 2.10.-**Receptores de Apo2L/TRAIL. La unión de este ligando a los receptores mortales DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) produce una cascada de transducción de señal que conduce a la muerte de la célula. El resto de los receptores (DcR1, DcR2 y OPG) no son capaces de transmitir la señal apoptótica.

Cuando los ligandos mortales se unen a sus receptores específicos (Figura 2.11), se estabiliza la conformación en forma de trímero, que es como son activos estos receptores. Además, el ligando induce cambios conformacionales que permiten el ensamblaje de un complejo multiprotéico dinámico en la parte citosólica de dichos receptores, lo cual tiene lugar en un dominio de aproximadamente 80 restos aminoacídicos llamado dominio de muerte (DD) (Boldin et al. 1995). Entre las proteínas reclutadas por DD en la parte citosólica del receptor se encuentran: RIP1 (*receptor-interacting proteína kinase 1*), FADD (*FAS-associated protein with a DD*), múltiples isoformas de c-FLIP, múltiples c-IAP, E3 ubiquitin ligasas y procaspasa 8 (-10) (Wang et al. 2001; Lavrik et al. 2005a). El complejo supramolecular formado es llamado DISC (*death-inducing signaling complex*) y constituye la plataforma que regula la activación de la caspasa 8 (-10) (Kischkel et al. 1995). En el caso de TNF, el DISC formado, aunque presenta muchas similitudes también difiere en algunas proteínas con las anteriormente mencionadas.

La activación de los receptores de muerte no siempre transducen señales de muerte celular, también transducen señales intracelulares tan diferentes como proliferación o supervivencia (Schutze et al. 2008).

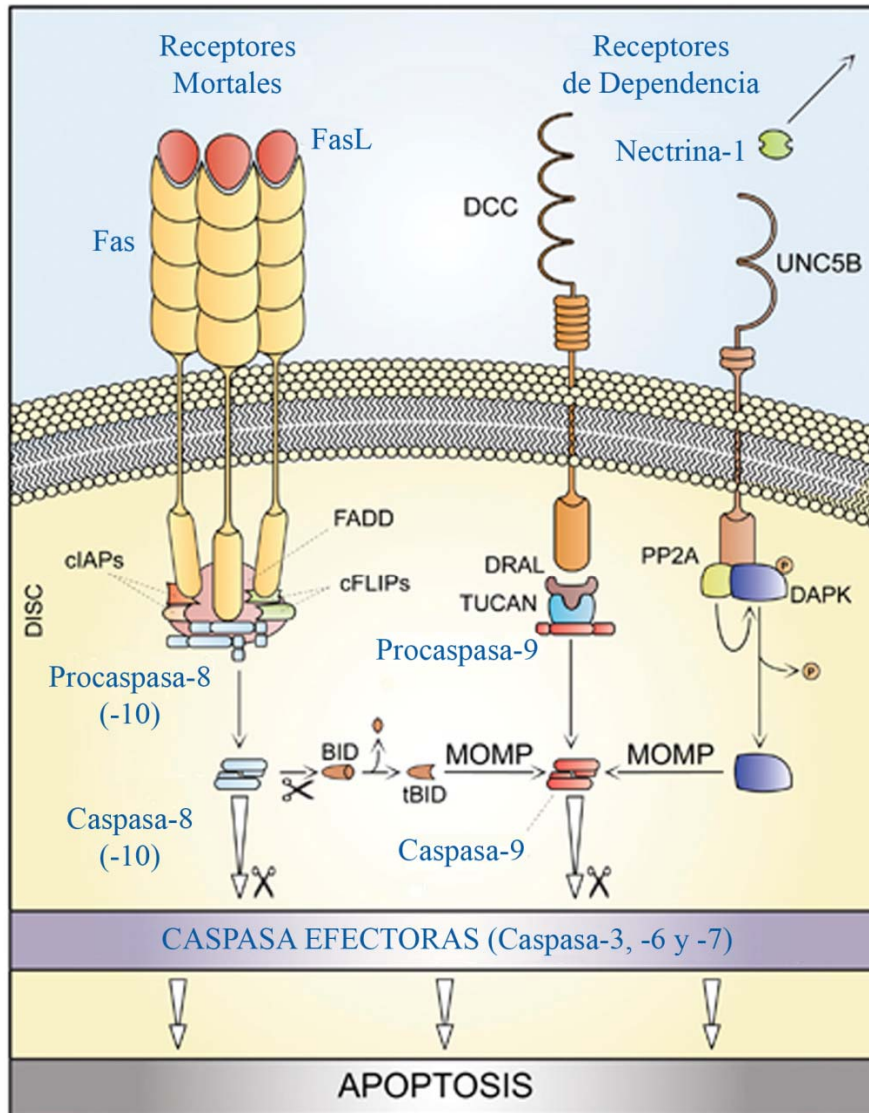
La unión de las caspasas iniciadoras al DISC, vía interacciones homotípica entre los dominios DED de FAAD y la correspondiente caspasa, induce su cambio conformacional, que las activa y permite que interaccionen entre ellas produciéndose una ruptura autoproteolítica que las activa completamente. La activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10 provoca la activación por proteólisis de las caspasas ejecutoras -3 y -7 (Lavrik et al. 2005b).

No obstante, existen células en las cuales se conecta la vía extrínseca con la intrínseca para que los receptores mortales puedan inducir eficientemente la muerte celular por apoptosis. Dependiendo de que esto ocurra o no, las células se pueden clasificar en dos tipos (Scaffidi et al. 1998; Ozoren and El-Deiry 2002; Lavrik et al. 2005b). En las células de tipo I (linfocitos), con altos niveles de expresión del complejo de señalización DISC y alta actividad de las caspasas iniciadoras; la activación de las caspasas -8 (-10) es suficiente para activar a las caspasas ejecutoras. En células de tipo II (hepatocitos y células  $\beta$  del páncreas), la baja expresión del DISC y la menor actividad de las caspasas iniciadoras hacen necesaria la cooperación con las mitocondrias para inducir apoptosis: las caspasas iniciadoras activan a la proteína sólo-BH3 Bid por corte proteolítico, lo que permite a la proteína truncada (tBid) activar a Bax/Bak e inducir la formación del MOMP en la mitocondria, conectando de esta forma la vía extrínseca de la apoptosis con la mitocondrial (Li et al. 1998; Luo et al. 1998).

Aunque estos son los receptores más ampliamente estudiados como inductores de muerte por señales extracelulares, no son los únicos. Y cada día emergen nuevas evidencias de las vías moleculares por la cual otros receptores también transducen señales intracelulares de muerte celular por apoptosis. Uno de estos son los receptores de dependencia (Figura 2.11) los cuales inducen la activación de las caspasas, en particular de la caspasa 3. Estos receptores, como Patched y DCC, en ausencia de su ligando, parecen interactuar con la proteína adaptadora citoplasmática DRAL que ensambla un complejo que activa a las caspasa 9. Otro receptor de dependencia como UNC5B, responde a la falta de netrina-1 con el reclutamiento de un complejo de señalización que incluye a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y a la proteína quinasa-1 asociada a muerte (DAPK-1). Estas interacciones multiproteicas conducirían a la desfosforilación de DAPK lo cual dispara el potencial proapoptótico de esta proteína (Bialik and Kimchi 2006; Mille et al. 2009; Guenebeaud et al. 2010).

Según estas consideraciones, el NCCD ha propuesto que la vía extrínseca de la apoptosis pueda definirse como la muerte celular por apoptosis, dependiente de caspasas, que puede inhibirse por inhibidores químicos como Z-VAD-fmk o por sobreexpresión de inhibidores virales de caspasas como CrmA (*caspases like cytokine response modifier A*) y que debe seguir una de las siguientes vías: 1) señalización por receptores de muerte y activación de la cascada: caspasa-8(-10)→caspasa-3; 2) señalización de los receptores de muerte y activación de la ruta: caspasa-8 →tBid→MOMP→caspasa-9→caspasa-3 y 3) señalización de receptores

de dependencia inducido por la privación de ligando, lo que induce activación de la caspasa-9 → caspasa-3 ya sea de forma directa o a través de MOMP (Galluzzi et al. 2011)



**Figura 2.11.**-Activación de la vía extrínseca de la apoptosis a través de los receptores mortales o a través de los receptores de dependencia. Modificado de (Galluzzi et al. 2011)

### 2.1.3.-Necrosis programada o muerte celular tipo III

La necrosis ha sido considerada un mecanismo de muerte celular accidental o totalmente fuera de control, sin embargo trabajos recientes de diferentes laboratorios han puesto de manifiesto que existe una muerte celular por necrosis que ocurre bajo condiciones estrictamente reguladas y que desempeña un importante papel en muchas condiciones fisiológicas y patológicas (Hitomi et al. 2008; Vandenabeele et al. 2010).

### 2.1.3.1.-Inducción de la necroptosis

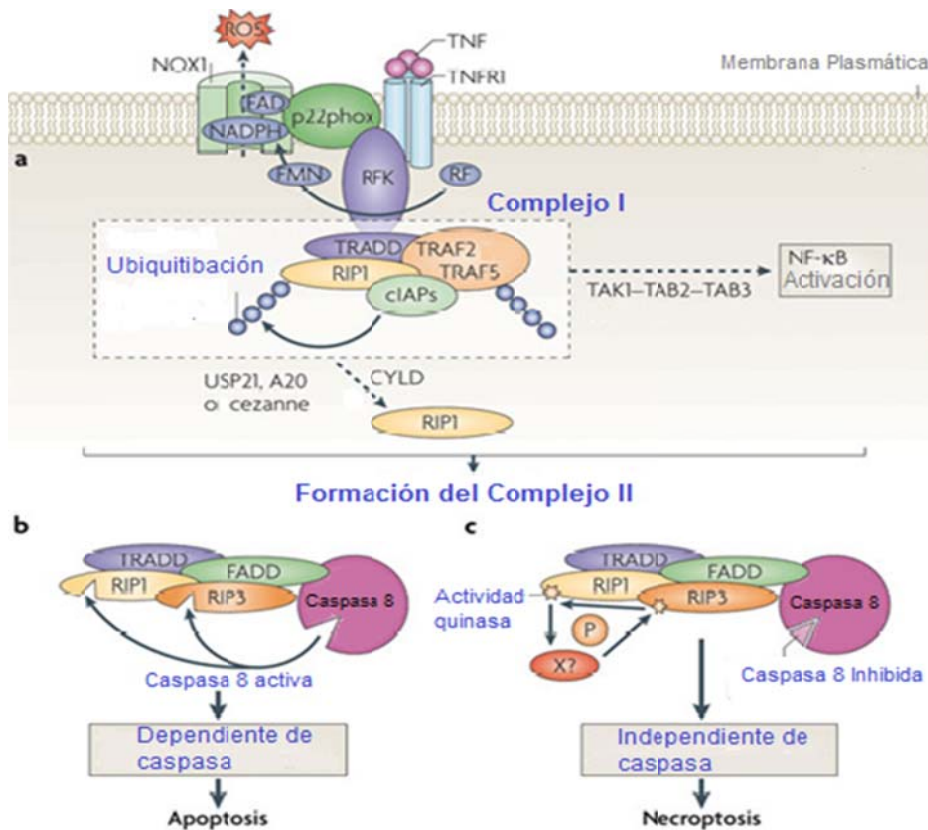
La necroptosis puede inducirse por los ligandos mortales, TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL. Estos receptores normalmente activan la vía extrínseca de la apoptosis, sin embargo en algunas líneas celulares, en presencia de inhibidores de caspasas, que bloquean la apoptosis, inducen una vía de muerte celular que parte de los receptores mortales y culmina con una muerte con morfología necrótica (Holler et al. 2000). Aunque esta es la vía de necrosis más ampliamente estudiada, existen otros estímulos que también pueden inducir necrosis programada. La necroptosis también puede ser inducida por miembros de la familia de los receptores de reconocimiento de patógenos como los receptores de tipo Toll asociados a la membrana plasmática o a endosomas, los receptores de tipo NOD (Francois et al. 2000; Kalai et al. 2002; Koterski et al. 2005; Ma et al. 2005; Willingham et al. 2007) y también por daño al DNA (Zong et al. 2004).

La vía de inducción de la necroptosis más ampliamente caracterizada es la iniciada por los ligandos mortales, específicamente a través del TNFR1. Dependiendo del tipo celular, factores microambientales y el estado de activación de la célula, la administración de TNF puede resultar en supervivencia celular, apoptosis o necroptosis, lo que refleja una intrincada red de señalización que determina la respuesta a ejecutar.

Una vez que el ligando se une al trímero de TNFR1 (Figura 2.12a), se inducen cambios conformacionales que permiten a la porción citosólica de dichos receptores reclutar múltiples proteínas que incluyen a TRADD, RIP1, RIP3, cIAP1, cIAP2, TRAF2 y TRAF5. La quinasa RIP1 es además ubiquitinada. A esta estructura supramolecular próxima a la membrana se le ha llamado "Complejo I", el cual activa señales de supervivencia a través de NF- $\kappa$ B (Legler et al. 2003; Micheau and Tschopp 2003).

Este Complejo I sufre cambios en la composición molecular que dan lugar a la formación del Complejo II (Figura 2.12). Este complejo II está formado por RIP1, RIP3, TRADD, FADD, FLIP y la caspasa-8. En este caso RIP1 necesita ser desubiquitinada. Una vez la caspasa-8 se activa (Figura 2.12b), esta inactiva a RIP-1 y RIP3 por procesamiento proteolítico e inicia la cascada de activación de caspasas induciéndose la apoptosis (Micheau and Tschopp 2003).

Cuando las caspasas, y en particular la caspasa 8, es inhibida (Figura 2.12c), ya sea farmacológicamente, por agentes como CrmA o por knockout del gen o silenciamiento génico con siRNA, el complejo II no puede iniciar la apoptosis y RIP1/RIP3 no son degradadas y llevan a cabo una serie de interacciones físicas y funcionales que resulta, al menos en algunos tipos celulares, en la activación y ejecución de la muerte celular por necrosis programada; por lo que el complejo II puede inducir tanto apoptosis como necrosis, recibiendo el nombre de DISC o necrosoma respectivamente (Micheau and Tschopp 2003; Vandenabeele et al. 2010).



**Figura 2.12.**-La señalización a través de TNF y otros ligandos mortales induce la formación de: a) Complejo I que provoca la activación de la vía de NF-κB. b) Complejo II, este puede inducir apoptosis o necroptosis si la caspasa 8 está inhibida. Modificado de (Vandenabeele et al. 2010)

En este complejo multiprotéico llamado necrosoma juegan un papel fundamental las quinasas RIP1 y RIP3, lo que se demuestra por el hecho de que la necrosis inducida por CD95L, TRAIL or TNF $\alpha$  en combinación con Z-VAD-fmk es inhibida en células deficientes de RIP1. De igual forma la necrostatina, una pequeña molécula descubierta en el año 2005 (Degterev et al. 2005), que bloquea alostéricamente la actividad quinasa de RIP1, inhibe el ensamblaje del complejo RIP1-RIP3 y por tanto la necroptosis. Esto demuestra que la actividad quinasa de RIP1 y RIP3 son esenciales para la actividad del necrosoma, también llamado ripoptosoma por el papel fundamental que juegan las quinasas RIP1 y RIP3, las cuales son reguladas tanto por ubiquitinación como por mutua fosforilación (Cho et al. 2009; Vandenabeele et al. 2010).

### 2.1.3.2.-Ejecución de la necroptosis

Diferentes mecanismos moleculares contribuyen a la ejecución de la necroptosis iniciada en el necrosoma (Figura 2.13). Algunos de ellos son compartidos con la apoptosis. Sin embargo, a diferencia de ésta, durante la necrosis se produce una mayor depleción de ATP, lo cual tiene un papel crítico en la necrosis inducida por esta vía. Durante la apoptosis, diferentes procesos que consumen ATP son rápidamente inhibidos. Uno de estos, es la actividad de PARP1, una enzima involucrada en la reparación del DNA y en regulación transcripcional. Sin

embargo, durante la necrosis existe una sobreactivación de esta enzima, quizás debido al daño en el DNA mediado por ROS, lo cual tiene un papel importante en la necrosis inducida por esta vía (Los et al. 2002; Kraus 2008).

La activación de PARP1 y la consecuente depleción de  $\text{NAD}^+$  y acumulación de poli-ADP-ribosa, estimula la liberación de AIF del espacio intermembranas de las mitocondrias, un proceso que parece ser dependiente de la activación de calpaina- $\text{Ca}^{2+}$ . El AIF citosólico rápidamente se relocaliza en el núcleo donde provoca una fragmentación de DNA a gran escala independiente de las caspasas, lo cual puede inducir una mayor activación de PARP1 y por tanto iniciar un ciclo vicioso (Yu et al. 2002; Cao et al. 2007; Moubarak et al. 2007). El papel de PARP1 parece ser crucial en la necroptosis, lo cual se demuestra por el hecho que inhibiciones farmacológicas o genéticas consiguen un marcado efecto citoprotector frente a estímulos que induzcan necroptosis. Incluso en algunos modelos experimentales, parece estar por encima de RIP1/RIP3 en la cascada de eventos que inducen este tipo de muerte celular (Xu et al. 2006).

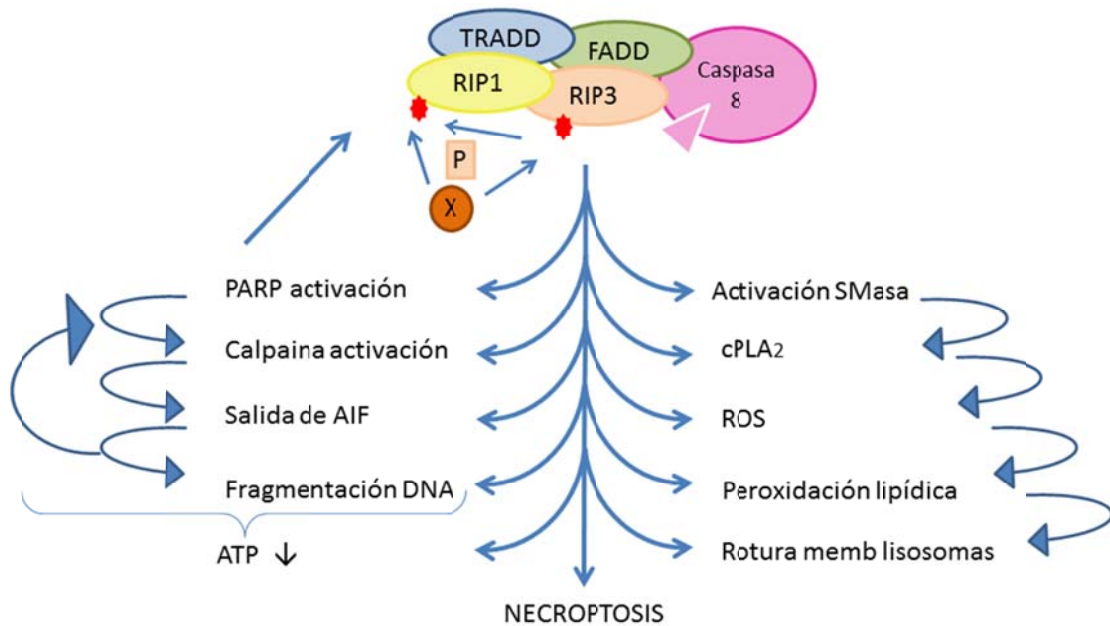
Por otro lado, la quinasa RIP1 parece inducir una depleción de ATP, que es atribuida a la inhibición, por parte de esta quinasa, del traslocador mitocondrial de nucleótidos de adenina (ANT), que reduce los niveles de ADP intramitocondrial, con la consiguiente inhibición inicial de la ATP sintasa, y luego la activación de la función contraria de esta misma enzima que produce la hidrólisis de ATP (Temkin et al. 2006; Vanden Berghe et al. 2010).

RIP3 señala induciendo una sobreproducción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial a través de la activación alostérica de diferentes enzimas (Zhang et al. 2009) mientras que RIP1 induce producción de ROS extramitocondrial a través de la NADPH oxidasa NOD1 de membrana plasmática, lo cual es detectado sólo pocos minutos tras exponer las células a  $\text{TNF}\alpha$ . Además, la producción de ROS es amplificada a través de diferentes reacciones (Kim et al. 2007b).

Todas las especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno formadas pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados y producir aldehídos reactivos los cuales pueden a su vez atacar otros lípidos y proteínas de membranas y por tanto comprometer la integridad y permeabilidad de las membranas celulares. De especial importancia resulta el efecto de este fenómeno en las membranas del retículo endoplasmático (ER) y en los lisosomas. La permeabilización de las membranas del ER induce un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mientras la permeabilización de las membranas lisosomales produce el vertido de enzimas hidrolíticas en el interior de las células. Ambos acontecimientos, están estrechamente relacionados con la necroptosis. A la permeabilización de las membranas de los lisosomas también contribuyen moléculas como la esfingosina que promueve el aumento de los niveles de calcio que activa a enzimas como fosfolipasa A2 o calpaina las cuales también inducen la permeabilización de la membrana lisosomal (Suffys et al. 1991; Kagedal et al. 2001; Kim et al. 2005; Won and Singh 2006; Burke and Dennis 2009; Vandenabeele et al. 2010).

Por otro lado, al igual que ocurre durante la apoptosis, se ha postulado que durante la

necrosis las células emiten señales para ser detectadas y eliminadas por células fagocíticas (Hirt and Leist 2003; Brouckaert et al. 2004) y el fallo de estos procesos de eliminación de células necróticas puede contribuir a la persistencia de la inflamación y al excesivo daño tisular y a enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes, arterioesclerosis y enfermedades autoinmunes como el lupus eritomatoso sistémico (Vandenabeele et al. 2010).



**Figura 2.13.**-Representación esquemática de los eventos que participan en la ejecución de la necroptosis una vez se forma el necroptosoma. La formación de especies reactivas de oxígeno junto con la depleción de ATP son componentes claves en la muerte por necrosis.

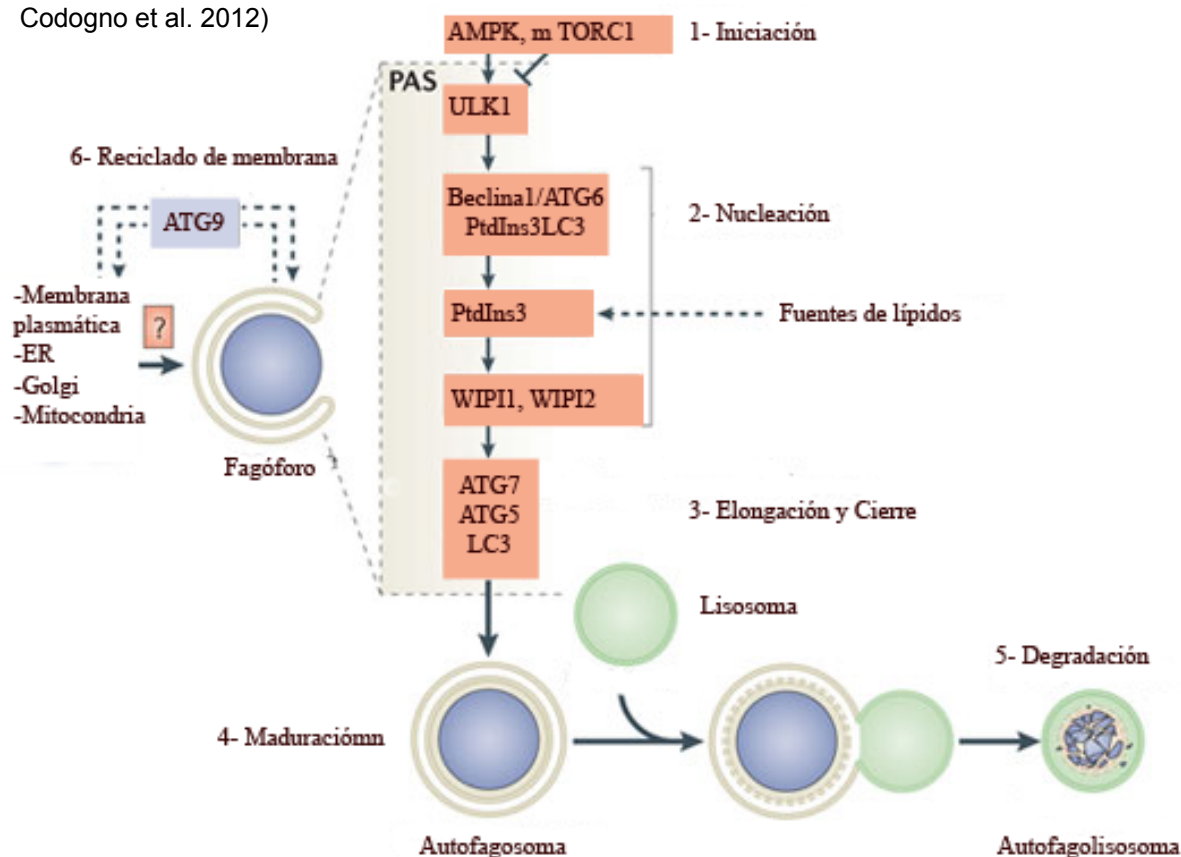
### 2.1.4.-Muerte celular asociada a autofágica o muerte celular de tipo II

La autofagia fue definida hace más de 50 años y este término engloba al menos tres mecanismos diferentes: macroautofagia (referida como autofagia), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia, se caracteriza por la formación de vacuolas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales secuestran material citoplasmático que finalmente es degradado al fusionarse con los lisosomas. Este proceso se mantiene a un nivel basal en la célula, donde actúa como un mecanismo de control citoplasmático eliminando agregados proteicos, proteínas mal plegadas o de larga vida, orgánulos dañados o patógenos y contribuye a la supervivencia celular durante los períodos de escasez de nutrientes u oxígeno. Y aunque ocurre a niveles basales puede ser inducido o inhibido según las condiciones celulares y señales fisiológicas como hormonas, factores de crecimiento o infecciones por patógenos (Yang and Klionsky 2010).



### 2.1.4.1.-Macroautofagia

En mamíferos el proceso de autofagia se divide en diferentes etapas (Figura 2.14): iniciación o inducción, nucleación, elongación, cierre, maduración y degradación (Kang et al. 2011). Y en ella intervienen un grupo de proteínas llamadas por consenso autofagicas (ATG *Autophagy-related protein*), y aunque se han descrito 31 de éstas proteínas, sólo 15 de ellas son necesarias para la ejecución de todas las etapas de la autofagia. (Nakatogawa et al. 2009; Codogno et al. 2012)



**Figura 2.14.**-Etapas y moléculas más representativas que participan en la formación del autofagolisosoma. Modificado de (Codogno et al. 2012).

### 2.1.4.1.-Vías de señalización de la autofagia

Diferentes estudios sugieren que en mamíferos la membrana donde ocurre la nucleación es el retículo endoplasmático, aunque no se descartan que otros orgánulos puedan contribuir como fuente de membrana para el proceso de autofagia. En mamíferos la inducción de la autofagia requiere de la proteína ULK1/2 que se encuentra formando un gran complejo con mATG13, FIP200 y ATG101 y es regulado por mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*). El complejo mTORC1 interactúa con ULK1/2 y las mantiene inhibida mediante fosforilación (Figura 2.15), sin embargo, en condiciones de escasez de nutrientes mTORC1 es inhibida y disociada de las quinasas ULK1/2, éstas son rápidamente desfosforiladas de los

sitios de inhibición y concomitantemente autofosforiladas en los sitios de activación. Las quinasas ULK1/2 activadas fosforilan a mATG13 y FIP200 y conducen a la subsecuente relocalización de dicho complejo del citosol a la membrana del retículo endoplasmático (Codogno et al. 2012).

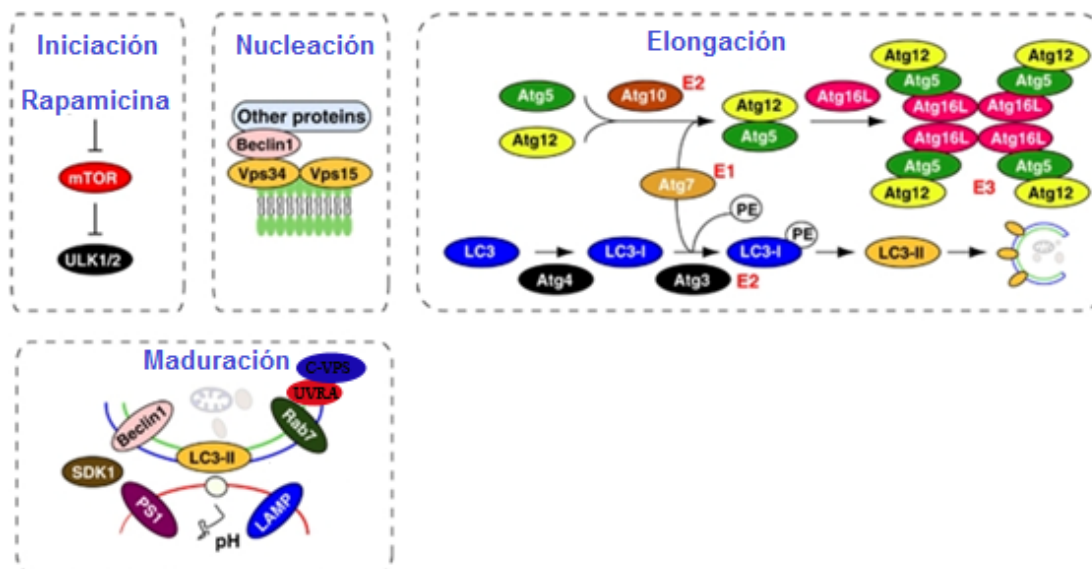
La activación del complejo ULK induce tanto la activación como el reclutamiento a la membrana del RE del complejo de fosfatidil-inositol 3-quinasa de clase III (PI3K CIII) específica de autofagia. Este complejo es esencial para la producción de fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) durante el estado inicial de nucleación del fagóforo y el núcleo central lo forman las proteínas beclina-1, la PI3K CIII Vps34 y Vps175/p150 (Figura 2.15). Estas proteínas a su vez facilitan el reclutamiento de otras proteínas ATG que pueden regular positivamente o negativamente este proceso. UVRAG, ATG14L y Ambra1 tienen dominios de unión a beclina-1 y regulan positivamente esta proteína e intervienen en diferentes pasos de la maduración y formación del autofagosoma. Otras moléculas como Rubicon funcionan como regulador negativo de la beclina-1.

La producción de PI3P, subsecuentemente, recluta otras proteínas efectoras de los siguientes etapas que incluyen a DFCP1 y proteínas de la familia WIPI constituyendo el omegasoma un ejemplo de sitio de ensamblaje del fagóforo o PAS (*Phagophore assembly site*). WIPI2, la principal isoforma en la mayoría de las células, parece ser la encargada del reordenamiento de membrana que promueve el desarrollo del omegasoma hacia un sistema de doble-membrana aislado y la subsecuente formación del autofagosoma.

La formación del estado final del autofagosoma, la elongación y el cierre de la membrana del fagóforo, requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Figura 2.15). El primero constituye el complejo ATG5-ATG12. La formación de este complejo es constitutiva y ocurre inmediatamente después de la síntesis individual de cada proteína por la actividad tipo ubiquitina E1 y E2 de ATG7 y ATG10 respectivamente. El complejo ATG5-ATG12 interactúa con ATG16 y forma un gran complejo múltimerico gracias a la capacidad oligomérica de ATG16. Este complejo es llamado ATG16L y se localiza en la superficie exterior de la membrana del fagóforo.

El segundo sistema interviene en la conjugación de ATG8 (MAPLC3 o LC3: *Microtubule Associated Protein Light Chain 3*). La LC3 es sintetizada como un precursor con una secuencia adicional en el carboxi terminal, la cual es eliminada inmediatamente después de su síntesis por la cistein-proteasa ATG4 dejando expuesto un residuo de glicina. Posteriormente, esta LC3 es conjugada a través del residuo de glicina al lípido fosfatidiletanolamina (PE) vía ATG7 y ATG3 suministrando, esta última, la actividad tipo ubiquitina E2, mientras que el complejo ATG16L suministra la actividad tipo ubiquitina E3. La lipidación de la LC3 ocurre sólo cuando se induce la autofagia y convierte la LC3 de su forma soluble en el citoplasma (LC3-I) a la forma asociada a los autofagosomas unida a la doble membrana (LC3-II), esta es localizada tanto en la superficie exterior como en la interior de la membrana del fagóforo (Nakatogawa et al. 2009).

ATG9 es otra de las proteínas implicadas en este proceso, ésta es la única proteína integral de membrana descrita entre las proteínas ATG y su función parece ser esencial para la formación de los autofagosomas. Esta proteína se encuentra en reservorios intracelulares formando pequeñas vesículas, las cuales contribuyen directamente como fuentes de membrana a la formación del autofagosoma, fundamentalmente durante el ensamblaje del PAS. Esta proteína se localiza en la membrana externa y no en la interna del autofagosoma y esta distribución asimétrica está relacionada con otras funciones de esta proteína como contribuir a la curvatura de la membrana (Yamamoto et al. 2012).



**Figura 2.15.**-Interacciones proteicas más importantes que intervienen en cada etapa de formación del autofagosoma. La iniciación depende de que se elimine la inhibición que ejerce mTORC1 sobre ULK1/2. La nucleación depende del complejo formado por Beclina 1/Vps34/vps15. En la elongación participan los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina para formar el complejo ATG5-ATG12 y ATG8-PE. Y en la maduración participan Rab7, LC3-II y LAMP entre otras proteínas. Modificado de (Kang et al. 2011)

El reclutamiento de la LC3-II al autofagosoma es la etapa limitante de la velocidad del proceso de expansión de la membrana. La LC3-II media el cierre de la membrana y la fusión con el lisosoma (Nakatogawa et al. 2007) y la cantidad de LC3-II en el PAS determina el tamaño del autofagosoma (Xie and Klionsky 2007). Una vez que el autofagosoma está totalmente expandido, la LC3-II de la cara externa del autofagosoma es desconjugada de la PE a través de la acción de Atg4 y es liberado de nuevo al citosol (Yu et al. 2012). Asimismo, el complejo Atg12-ATG5-Atg16 se disocia de la membrana del autofagosoma durante la maduración. Después de la maduración, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para formar el autofagosoma (Figura 2.15), lo que requiere la actuación de diferentes proteínas como Rab7 y Vti1p en células de mamíferos (Gutierrez et al. 2004; Jager et al. 2004). Curiosamente, UVRAG, tiene un segundo papel en las etapas posteriores de autofagia en el que regula la maduración de los autofagosomas de forma independiente a la Beclina-1. UVRAG facilita el reclutamiento de la proteína C vacuolar (C-VPS) al autofagosoma. La

interacción entre UVRAG y el complejo C-VPS estimula la actividad Rab7-GTPasa lo cual junto con otras proteínas como LAMP-1, LAMP-2, entre otras, resulta en la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (Liang et al. 2008). La fusión tiene lugar en la región perinuclear que está enriquecida en lisosomas. Para que esto ocurra, deben moverse los autofagosomas desde el citosol hacia el núcleo. El movimiento de autofagosomas se produce sobre los microtúbulos (Fass et al. 2006; Kochl et al. 2006) y esta mediado por la proteína motora dineína (Jahreiss et al. 2008). Finalmente, el material citoplasmático, proteínas u orgánulos englobados en los autofagolisosomas son degradados por las proteínas lisosomales (Eisenberg-Lerner and Kimchi 2009)

El material englobado por los autofagosomas es seleccionado a través de interacciones proteicas, por los receptores específicos de autofagia. Estas proteínas presentan dominios de interacción con las LC3-II llamado LIR (*LC3-interacting region*), en el C-terminal un dominio de reconocimiento de ubiquitina llamado UBA (*Ub-associated*) el cual es capaz de unirse a regiones mono o poliubiquitinadas y en N-terminal un dominio PB1 de oligomerización. El mejor ejemplo de estas proteínas lo constituye p62 o secuestrosoma-1 (p62/SQSTM1). Esta proteína es capaz de reconocer proteínas ubiquitinada a través del dominio UBA, ya sean proteínas mal plegadas o agregados proteicos, formando cuerpos de un tamaño variable gracias al dominio de oligomerización, una vez se han formado estos agregados son reconocidos por la LC3-II que se encuentra en la cara interna del autofagosoma siendo reclutados en su interior (Johansen and Lamark 2011). De igual forma también pueden ser reconocidos orgánulos disfuncionales como por ejemplo mitocondrias despolarizadas, proceso en el cual intervienen proteínas de la familia sólo-BH3 como BNIP3 y BNIP3L (Johansen and Lamark 2011).

### 2.1.4.2.-Autofagia y muerte celular

El término “muerte celular autofágica” fue definido en base a hechos morfológicos, específicamente a la vacuolización masiva observada por acumulación de autofagosoma que acompaña en algunos casos la muerte celular (Galluzzi et al. 2007). Aunque originalmente esta expresión no tenía ninguna consideración funcional, posteriormente ha sido usada para referirse a una muerte celular que es acompañada por un aumento del flujo autofágico y por tanto a la autofagia que es capaz de provocar daño celular (Kroemer and Levine 2008). Esto se aplica al menos en dos situaciones diferentes: primero a la autofagia que se ha visto media la muerte celular *in vivo* durante el desarrollo de *D. melanogaster* (Berry and Baehrecke 2007; Denton et al. 2009). Segundo, a la autofagia que parece ser la responsable de la muerte en algunas células tumorales, especialmente en ausencia de algún modulador apoptótico importante como Bax, Bak o caspasas, en respuesta a algunos agentes quimioterapéuticos *in vitro* (Fazi et al. 2008; Grandeur et al. 2009; Laane et al. 2009).

No obstante, en la mayoría de los casos conocidos, la autofagia constituye un mecanismo citoprotector que es activado en respuesta a diversos tipos de estrés y su inhibición acelera, mas que prevenir, la muerte celular (Galluzzi et al. 2011). La autofagia probablemente

evolució como un mecanismo celular para sobrevivir a la escasez de nutrientes en el medio extracelular y mantener la síntesis de macromoleculas y la producción de ATP. Esta ocurre a un nivel basal bajo en todas las células y tiene función homeostática en el recambio citoplasmático de proteínas y de orgánulos celulares dañados y/o potencialmente peligrosos. Sin embargo, la autofagia se induce rápidamente cuando la demanda de energía celular se incrementa y no se puede suplir con el suministro de nutrientes. Además, la autofagia actúa como un proceso de supervivencia en respuesta a las diferentes formas de estrés, incluyendo la ausencia de factores de crecimiento, hipoxia, estrés del retículo endoplasmático (ER), infecciones microbianas y enfermedades caracterizadas por la acumulación de agregados proteicos (Boya et al. 2005).

El papel citoprotector de la autofagia puede prevenir la apoptosis y la necrosis. Sin embargo, este proceso celular podría ser también un mecanismo de muerte celular. La activación de la autofagia más allá de cierto umbral puede promover la muerte celular directa, y provocar el colapso de las funciones celulares dando como resultado la atrofia celular (muerte celular tipo II). Por otra parte, la autofagia puede conducir a la ejecución de programas de muerte celular, apoptosis (tipo I) o necrosis (tipo III), presumiblemente a través de reguladores comunes tales como las proteínas de la familia Bcl-2.

La muerte celular por autofagia se ha descrito en *Drosophila*, *Dictyostelium* y *C. elegans*. La inducción directa de la autofagia por la sobreexpresión de ATG1 en *Drosophila*, demuestra que la autofagia es suficiente para inducir la muerte celular (Scott et al. 2007). Existen pocas evidencias inequívocas de la muerte por autofagia en mamíferos *in vivo*, no así en cultivos celulares *in vitro*. No obstante, estudios recientes también han descrito la muerte celular por autofagia en mamíferos en determinadas enfermedades y en líneas celulares tratadas con agentes quimioterapéuticos. En muchos de estos casos, aspectos morfológicos de autofagia y muerte celular apoptótica o autofagia y muerte celular necrótica han sido observados concomitantemente en la misma célula (Eisenberg-Lerner et al. 2009).

Además la interrelación entre la autofagia y la muerte celular apoptótica o necrótica es compleja y no completamente entendida. Estos procesos son regulados por factores comunes y comparten componentes comunes y la actividad de uno puede regular la actividad del otro, por lo que es importante determinar si la célula está muriendo con autofagia o a través de la autofagia.

Se han identificado múltiples niveles de interconexión entre la autofagia y la apoptosis. Éstos pueden dividirse en tres categorías (Eisenberg-Lerner et al. 2009):

Cooperativo, tanto la autofagia como la apoptosis pueden ser ejecutadas en paralelo para contribuir a la muerte celular o la autofagia puede inducir la apoptosis (Figura 2.16a).

Según este modelo de interrelación, si uno de los programas es bloqueado, el otro es capaz de ejecutar la muerte celular eficientemente por lo que un programa sirve de resguardo para el otro. Estos pueden ocurrir simultáneamente e incluso cooperativamente aunque uno

puede predominar y por tanto ocultar las evidencias del otro o alternativamente el segundo puede ser sólo activado si falla el primero, lo que implica que el primero tiene medios para bloquear al segundo. El objetivo de ambos programas es el mismo, eliminar a la célula. La acción cooperativa y/o la retroalimentación negativa implican que existe una coordinación entre estas dos vías de señalización. Esta puede ocurrir a nivel de la activación o durante la ejecución, de forma que exista una maquinaria molecular que sirva de sensor de la eficiencia con que uno de ellos ocurre permitiéndole a la segunda vía de señalización intervenir si es necesario. El caso más descrito en la bibliografía es en el que la apoptosis inhibe o retrasa la autofagia por la que ésta sólo se hace evidente cuando la apoptosis es inhibida (Yang et al. 2006; Gozuacik et al. 2008; Yokoyama et al. 2008).

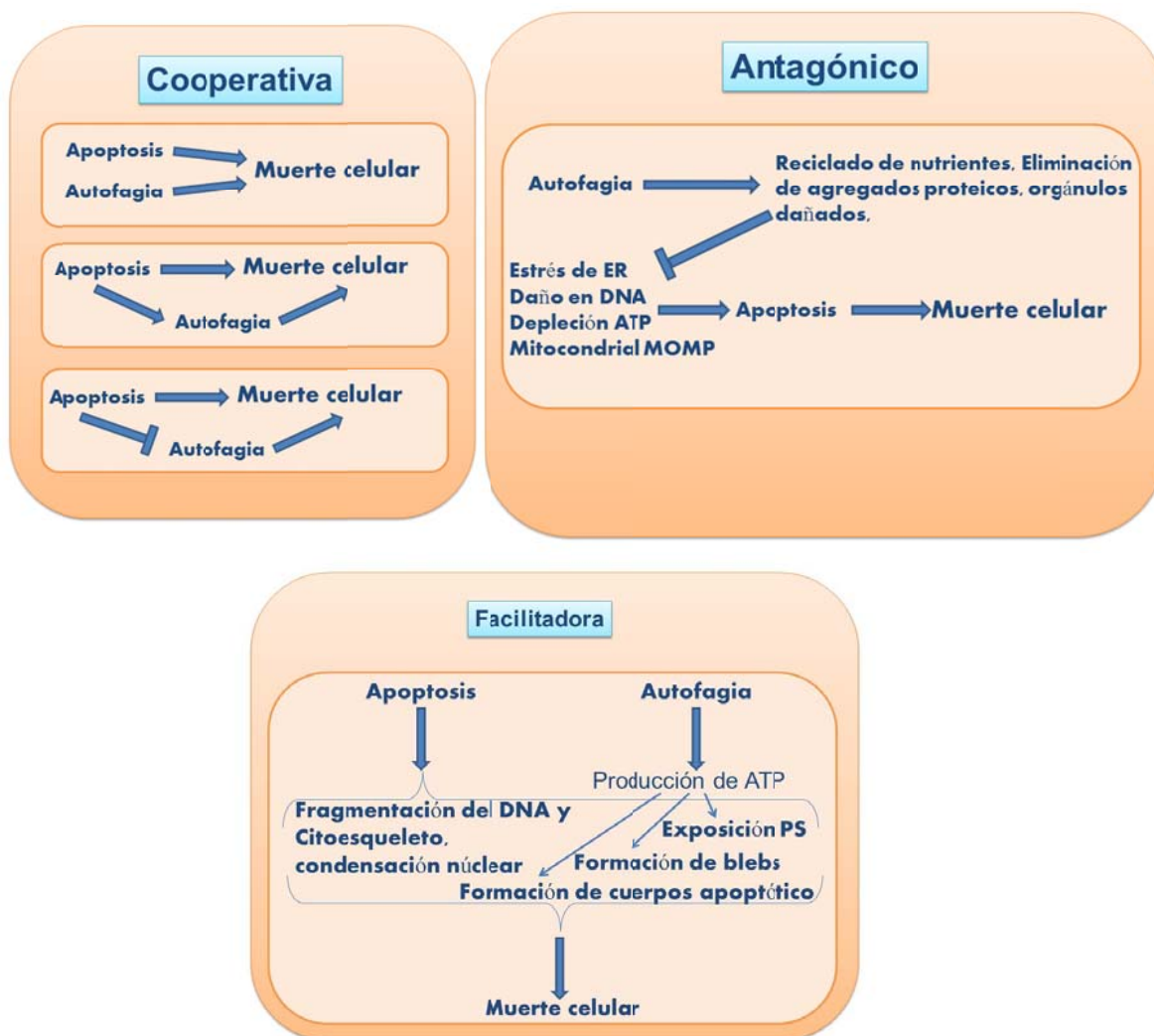
Antagónico, la autofagia no es parte del mecanismo de muerte celular, en esta situación la célula está muriendo con autofagia (Figura 2.16b). En respuesta a muchos eventos la célula dispara la autofagia para contrarrestar o retrasar la muerte celular en un intento final de sobrevivir y como adaptación al estrés. La autofagia actúa bloqueando la muerte celular y promoviendo la supervivencia.

En este caso, la apoptosis y la autofagia son procesos distintos con objetivos dispares. La autofagia no conduce a la muerte celular, sino que actúa para atenuar la apoptosis mediante la creación de un ambiente celular en el que se favorece la supervivencia. Por ejemplo, en diversas situaciones de estrés del ER se ha demostrado que la autofagia puede mantener la función ER a través de la degradación de agregados proteicos y de proteínas mal plegadas, lo que limita así la respuesta al estrés del ER y posterior apoptosis (Ding et al. 2007). También se ha visto inducción de la autofagia en respuesta a la anoikis (Fung et al. 2008) así como durante la radioterapia o quimioterapia. La mitofagia directa puede limitar la apoptosis mediante la prevención de MOMP y la posterior liberación de moléculas proapoptóticas tales como el citocromo c y Smac/Diablo (Kim et al. 2007a). Así, la célula utiliza la autofagia para promover la supervivencia en múltiples circunstancias. La supresión de la autofagia puede por tanto promover la apoptosis de células en circunstancias como la respuesta al daño al DNA, estrés del ER, escasez de nutrientes y vías de señalización de factores de crecimiento.

Facilitadora, la autofagia es parte del programa de apoptosis, y actúa tanto como ejecutora de la apoptosis como durante las etapas finales de la apoptosis para colaborar en la eliminación de los cuerpos apoptóticos (Figura 2.16c).

Esta tercera hipótesis intenta explicar los altos niveles de autofagia detectados en algunas células que mueren y constituiría un mecanismo de limpieza de las células comprometidas a morir por apoptosis o necrosis. Según el mecanismo canónico, la mayor parte de las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis, siendo los lisosomas de los fagocitos responsables de la degradación final de los cuerpos apoptóticos. Sin embargo, en algunas formas de muerte celular programada, sobre todo durante el desarrollo embrionario (por ejemplo embriogénesis, metamorfosis de los insectos), la disponibilidad de células fagocíticas puede ser insuficiente para la eliminación de las células muertas. En tal caso, las células

podrían activar la autofagia para auto-degradarse a través de sus propios lisosomas. Por otro lado, la autofagia puede asistir a la apoptosis, sin que conduzca a la muerte en sí misma, por lo que no interfiere con la ejecución de la apoptosis. Por ejemplo, la autofagia sería la responsable del mantenimiento de los niveles celulares de ATP, que permite la exposición de fosfatidilserina, un proceso dependiente de ATP. *In vivo*, la exposición de fosfatidilserina proporciona la señal de “cómeme” a los fagocitos vecinos y por lo tanto media la eliminación de cuerpos apoptóticos. En ausencia de autofagia, o una fuente externa de ATP, los cadáveres de las células apoptóticas embrionarias persisten, lo que indica que la autofagia es requerida para esta etapa. De igual forma la formación de los *blebs apoptóticos* requiere ATP, que es proporcionada por la autofagia (Qu et al. 2007).

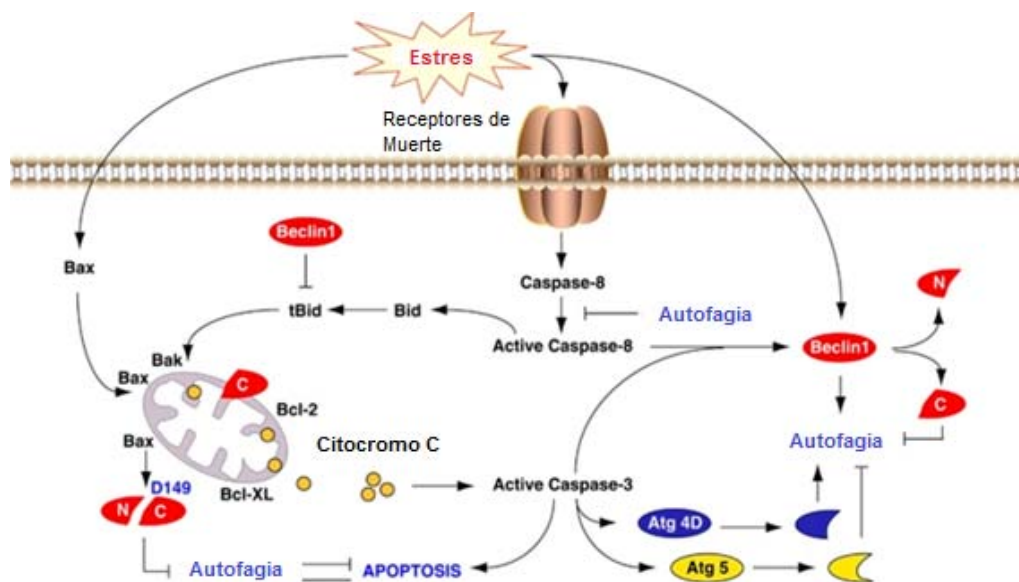


**Figura 2.16.**-Posibles interacciones entre la apoptosis y la autofagia cuando se induce muerte celular. A) interacción cooperativa, los dos procesos cooperan para inducir la muerte de la célula y en caso que una sea bloqueado el otro es suficiente para producir la muerte de la célula B) Interacción antagónica, en este caso la autofagia representa un intento de la célula de adaptarse a las condiciones que inducen muerte celular. C) Facilitadora, en este caso la autofagia contribuye a la completa ejecución de la apoptosis. Modificado de (Eisenberg-Lerner et al. 2009).

En la primera y tercera categorías por tanto, la autofagia participa en la muerte. La regulación coordinada de estos efectos opuestos de la autofagia se basa en una compleja red

de transducción de señales, la mayoría de las cuales también participan en vías de señalización no autofágicas. Por lo tanto, la autofagia ocupa una posición crucial en el metabolismo de la célula, y su modulación representa una estrategia terapéutica alternativa en escenarios patológicos como el cáncer.

La interrelación a nivel molecular entre la apoptosis y la autofagia es evidente por los numerosos genes que son compartidos por ambas vías de señalización (Figura 2.17). Evidencias recientes sugieren que BCL-2/BCL-XL inhiben la autofagia a través de la interacción directa con la proteína beclina-1 a través de su dominio BH3. La beclina-1 es liberada tanto por desplazamiento por otras proteínas BH3 como con BNIP3 o por fosforilación, tanto de la beclina-1 como de BCL-2/BCL-XL (Levine et al. 2008; Wei et al. 2008; Zalckvar et al. 2009). Esta interacción funciona para mantener la autofagia en niveles que son compatibles con la supervivencia celular más que con la muerte celular. En contraste, la sobreexpresión de BCL-2/BCL-XL potencia la muerte dependiente de autofagia en MEF tratados con estímulos proapoptóticos. Además, la proteína ATG5, que tiene un papel esencial en la autofagia, puede ser cortada proteolíticamente tanto por la calpaina como por caspasas, formando un fragmento N-terminal que se trasloca a la mitocondria e interactúa con BCL-XL y promueve la liberación del citocromo c (Yousefi et al. 2006). Además, se ha descrito que la autofagia puede eliminar selectivamente la caspasa 8 inhibiendo de esta forma la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (Hou et al. 2010), mientras que tanto la caspasa 8 como la caspasa 3 podrían cortar a la beclina 1 con lo cual se inhibe la autofagia y además se genera un fragmento C-terminal que se trasloca a la mitocondria contribuyendo a la activación de Bax y Bak (Djavaheri-Mergny et al. 2010). Sin embargo, el corte de Atg4D, una de las 4 ATG4 descritas en mamíferos, por la caspasa 3 genera un fragmento capaz de activar la autofagia (Betin and Lane 2009).



**Figura 2.17.**-Ejemplo de la interrelación entre la autofagia y la apoptosis. En esta interviene múltiples proteínas que participan en la regulación de los dos procesos simultáneamente. Modificado de (Kang et al. 2011).



La interrelación de la autofagia no es sólo con la apoptosis, ya que se han visto diferentes interconexiones también con la necrosis. Por ejemplo, la inhibición de la autofagia en células deficientes en apoptosis retrasó la muerte celular por necrosis, en cambio en células capaces de ejecutar la apoptosis las hizo más sensible a la inducción de muerte por estrés del retículo (Ullman et al. 2008). Diferentes estudios revelan que la autofagia es inducida por estímulos que también inducen necrosis. La activación RIP en células tratadas con inhibidores de caspasas causa una excesiva formación de autofagosomas (Zhang et al. 2011b). Y la disminución de la autofagia por silenciamiento de ATG5, ATG7 y ATG8 interfiere con la muerte neuronal inducida por diferentes agentes (Chu et al. 2007). Mientras que la estimulación de la autofagia induce muerte neuronal por necrosis. La autofagia tiene un efecto sinérgico con la vía proteolítica lisosomal para facilitar la muerte por necrosis. De igual forma se ha observado que la autofagia selectiva de la enzima catalasa, una proteína que se encuentra en el citosol y que tiene un papel clave en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno, causa un incremento dramático de las ROS, peroxidación lipídica y pérdida de la integridad de la membrana plasmática, contribuyendo de esta forma a la necrosis (Yu et al. 2006b; Scarlatti et al. 2009).

## **2.2.-MIELOMA MÚLTIPLE HUMANO**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia que afecta a un clon de las células B plasmáticas que se expanden e infiltran la médula ósea y conduce a citopenias, reabsorción ósea y producción, en la mayoría de los casos, de una inmunoglobulina monoclonal característica. El MM cursa de forma heterogénea por lo cual algunos pacientes mueren en algunas semanas tras su diagnóstico, mientras que otros, sobreviven durante más de 10 años (Fonseca et al. 2009).

El mieloma es una enfermedad maligna que se manifiesta clínicamente con pancitopenia, hiperproteinemia, hipercalcemia, disfunción renal, lesiones en la médula ósea, anemia, inmunodeficiencia o disfunción neurológica. El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, después del linfoma no Hodgkin. Constituye, aproximadamente, el 10% de todas las neoplasias hematológicas, y el 1% de todos los cánceres y causa el 2% de las muertes por cáncer. En Europa tiene una incidencia de 4,5-6,0/100000/año con una edad media de diagnóstico entre 63 y 70 años y una mortalidad de 4,1/100000/año (Harousseau and Dreyling 2010; Rajkumar 2011).

Aun no se conoce con precisión la etiología del mieloma múltiple. Algunos factores de riesgo podrían ser: la estimulación inmune crónica, desórdenes autoinmunes, exposición a radiaciones ionizante, exposición a pesticidas o herbicidas o exposición a dioxinas (Schwartz 1997).

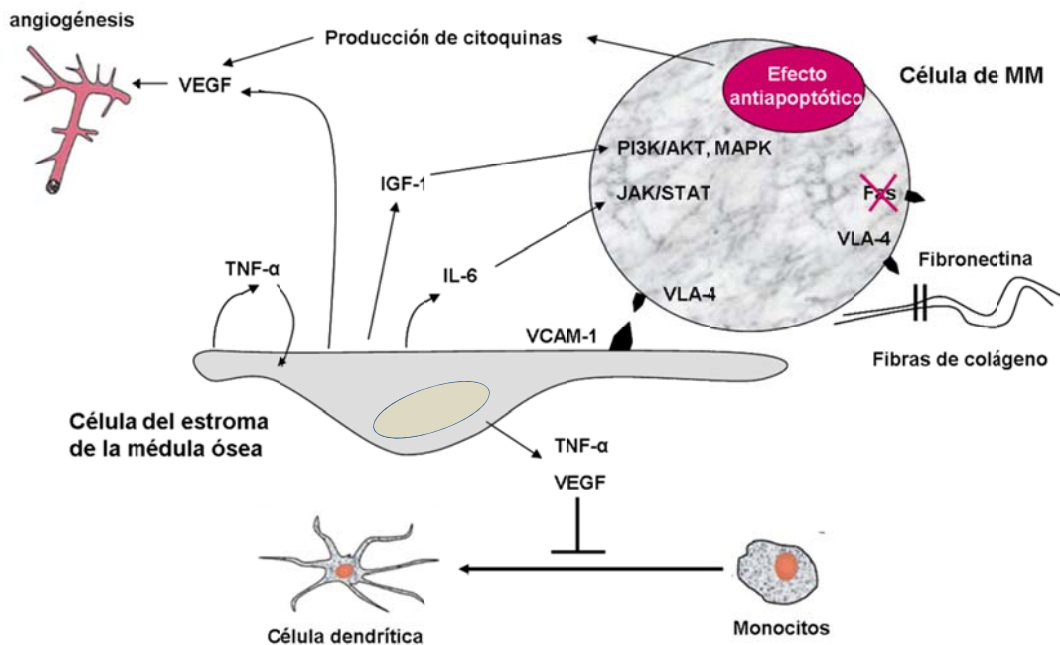
Es un tumor de bajo índice de proliferación, aunque ésta aumenta cuando el tumor sale de la médula ósea, lo que ocurre en las últimas etapas de la enfermedad. Actualmente es incurable, aunque en los últimos años ha aumentado el tiempo medio de supervivencia,

pasando de 3 a 7 años.

El mieloma se caracteriza porque células plasmáticas diferenciadas, con alteraciones génicas y generalmente derivadas de un sólo clon inicial, se acumulan en diferentes puntos de la médula ósea. Estas células se denominan mielomatosas. La característica típica de la célula mielomatosa es la producción y secreción de una proteína monoclonal a la sangre denominada proteína M. Se trata de un componente o fragmento Fab de una inmunoglobulina con una secuencia peptídica y estructura proteica anormal. Las células de mieloma múltiple, son dependientes del microambiente de la médula ósea para sobrevivir, crecer y diferenciarse, procesos que son mediados principalmente por la IL-6. Las interacciones entre las células de MM y la médula ósea son responsables de muchos de los efectos clínicos del tumor, como osteolisis, anemia o inmunodeficiencia (Bommert et al. 2006; Mitsiades et al. 2007).

### 2.2.1.- Microambiente de las células de mieloma

Las células de mieloma múltiple establecen en un gran número de interacciones en la medula ósea (figura 2.18). En este microambiente las células interactúan con las proteínas de la matriz extracelular y las células del estroma de la médula ósea, lo cual induce proliferación, resistencia a la apoptosis y migración de las células de MM. Además, éstas interacciones son cruciales en la resistencia a drogas, lo que se conoce como “resistencia a fármacos mediada por adhesión celular” (Bommert et al. 2006)(Figura 2.18).



**Figura 2.18.**-Complejidad de las interacciones entre las células de MM, células del estroma de la médula ósea (BM, bone marrow) y células de la matriz extracelular. Tomado de (Balsas 2011).

Las células de mieloma múltiple interactúan con la fibronectina, una proteína de adhesión de la matriz extracelular, a través de sus receptores heterodiméricos  $\alpha_4\beta_1$  (VL-4),  $\alpha_5\beta_1$  (VL-5) y  $\alpha_4\beta_7$ , que forman parte de la familia de las integrinas (Clark and Brugge 1995). Aunque

la expresión de los dos últimos es variable en las células B tumorales, VLA-4 está sobreexpresada en las células de mieloma (Jensen et al. 1993). La unión de las células de MM a fibronectina a través de esta integrina inhibe la apoptosis mediada por Fas (Anwar et al. 1993).

Las células de MM pueden interactuar con las células del estroma mediante la unión de VLA-4 a la molécula de adhesión celular VCAM-1, lo que, además de inhibir la apoptosis (Wang et al. 1998), produce la secreción de diversas citoquinas. La más importante es la interleuquina 6 (IL-6), que es esencial para la supervivencia y el crecimiento de las células de mieloma, que poseen receptores específicos para esta citoquina (Bataille and Housseau 1997). La IL-6 es secretado tanto por las células de mieloma como por las células del estroma de la médula ósea. IL-6 aumenta la proliferación celular al actuar sobre las vías de señalización JAK/STAT, Ras/MAPK (Sengupta et al. 1998) y PI3K/AKT (Hideshima et al. 2001), todas ellas implicadas en supervivencia celular. Además, induce la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) e inhibe la diferenciación de monocitos a células dendríticas, inhibiendo la respuesta inmunitaria anti-mieloma.

Otra de las citoquinas implicada es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El cual es secretado por las células del estroma de la médula ósea y promueve la angiogénesis y la producción de IL-6 (Podar et al. 2001). La unión de VEGF a las células de MM desencadena además varias vías de señalización fundamentales para la patogenicidad del MM: (1) la vía PI3K/PKC $\alpha$ , que promueve la migración (Hoshino et al. 2012), (2) la vía MEK/ERK, que media la proliferación celular y (3) el aumento de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y survivina. La expresión de este factor de crecimiento dificulta, además, la función presentadora de antígeno de las células dendríticas (Gabrilovich et al. 1996).

Además, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) promueve la interacción entre las células de MM y las células del estroma de la médula ósea, mientras que el factor de crecimiento semejante a la insulina de tipo 1 (IGF-1) es secretado por las células del estroma y activa las vías de señalización PI3K/AKT y Ras/MAPK, ambas implicadas en supervivencia y proliferación.

## **2.2.2.-Características celulares**

### *2.2.2.1.-Cariotipo*

Las células de MM tienen un cariotipo complejo, con similitudes con otros tipos de cánceres, como tumores epiteliales o leucemia crónica. En aproximadamente 50% de los casos de MM se producen translocaciones primarias: errores en los procesos de modificación específicos del DNA de células B lo que producen yuxtaposición de una o más regiones reguladoras de la transcripción de oncogenes e inmunoglobulinas, produciendo simultáneamente la desregulaciones de varios oncogenes. Además, es frecuente que se produzcan translocaciones secundarias, que no implican procesos específicos de las células B,

que contribuyen a la progresión del tumor.

Los datos de la literatura sugieren que los cambios cromosómicos específicos tienen valor pronóstico en los pacientes de MM, por lo que el análisis citogenético es la principal herramienta para establecer un pronóstico y debe ser realizado tanto por el análisis convencional del cariotipo como por FISH. En un estudio llevado a cabo por Trcic, et al, encontraron cambios cromosómicos clonales en el 56% de los casos. En el 50% de los casos se encontraron cariotipos hiperdiploides, hipodiploide en el 33% de los casos y pseudodiploide en el 17% de los casos. Las anormalidades numéricas más comunes fueron la ganancia de los cromosomas enteros 15, 11, 3 y 6. También se observó de forma frecuente la pérdida de cromosomas enteros, como los cromosomas X, 13, 14 y 8. El 71% de los casos mostró reagrupamiento estructural: del(1p), dup(1q), del(5q), del(13q), del(17p) y t(11;14) (q13;q32). La delección -13/13q se encontró en el 42% de los casos, mientras que pérdida completa del cromosoma 13 se observó en el 67% de los casos (Trcic et al. 2010).

Las anormalidades más relevantes son la delección de 13q observada por el análisis del cariotipo y la traslocaciones t(4;14), t(14;6) y la delección 17p observadas por la técnica FISH, las cuales son asociadas con mal pronóstico (Harousseau and Dreyling 2010).

### *2.2.2.2.- Alteraciones genéticas*

El aumento de las alteraciones cromosómicas con la progresión de la enfermedad parece indicar que el paso de la gammapatía de significado incierto (MGUS) a mieloma múltiple y a leucemia de células plasmáticas requiere de mutaciones adicionales que faciliten la proliferación y la supervivencia fuera del microambiente de la médula ósea. Para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas es imprescindible el estudio de estas mutaciones y de las vías de señalización alteradas. Algunas de estas mutaciones son:

- **Mutaciones en Ras**

Esta familia de proteína comprende principalmente tres proteínas: K-Ras, N-Ras y H-Ras. Estas son proteínas G pequeñas asociadas a membrana que se unen a nucleótidos de guanina (GTP y GDP) y poseen actividad GTPasas. Cuando la proteína Ras está unida a GDP permanece inactiva, activándose al unirse a GTP. Estas proteínas permiten la transducción de señales de múltiples procesos biológicos estimulados por receptores con actividad tirosín-quinasa que se activan por la unión de factores de crecimiento o citoquinas como IL-6.

Se han descrito mutaciones en estas proteínas, sobre todo en N-Ras, en un 39% de pacientes de nuevo diagnóstico, y en un 70% de los pacientes con leucemia de células plasmáticas (Paquette et al. 1990; Portier et al. 1992; Corradini et al. 1993). Según un modelo propuesto, en estados tempranos de la enfermedad Ras está continuamente activado por la continua secreción de IL-6 en la médula ósea. A medida que progresa la enfermedad, las mutaciones en N-Ras o K-Ras permiten la independencia de IL-6 que necesitan las células para salir de la médula ósea (Hallek et al. 1998). Esto justificaría el hecho de que las

mutaciones de Ras se encuentran entre el 30 y el 50% de los pacientes de mieloma múltiple, pero es un hallazgo raro en pacientes de MGUS, lo que sugiere que es un evento secundario que causa la transición de MGUS a mieloma múltiple (Bommert et al. 2006)

- **Sobreexpresión de Bcl-2**

La translocación cromosómica t(15:17) que conduce a la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 es muy poco frecuente en el MM, comparada con la existente en otros tipos de tumores, como el linfoma folicular, donde el 80% de los pacientes la presentan (Hermine et al. 1996). Sin embargo, en muchos casos de MM se ha detectado sobreexpresión de Bcl-2 (Pettersson et al. 1992), lo que conduce a una inhibición de la apoptosis y a un aumento de la resistencia a fármacos.

- **Proteína del retinoblastoma (Rb)**

Esta proteína nuclear es un supresor de tumores implicado en crecimiento y proliferación que es regulado por fosforilación. Rb no fosforilada se une a E2F, lo que evita la entrada en la fase G1 del ciclo celular. La fosforilación por la cdk4/cdk6 la inactiva, permitiendo el inicio del ciclo celular. Se han observado mutaciones de la proteína del retinoblastoma en más del 70% de los pacientes de MM (Corradini et al. 1994; Dao et al. 1994), así como una expresión constitutivamente elevada de Rb fosforilada (inactiva) en muchas células plasmáticas tumorales (Urashima et al. 1996; Zukerberg et al. 1996).

- **Gen de resistencia múltiple a drogas (MDR)**

Codifica para una glicoproteína de 170 kDa perteneciente a la familia de transportadores ABC, responsable de la resistencia de células tumorales a una gran cantidad de fármacos anti-neoplásicos. Se ha detectado sobreexpresión de esta proteína en muchos pacientes de MM, así como una correlación con la resistencia a fármacos como doxorubicina o vincristina (Dalton et al. 1989; Epstein et al. 1989).

### *2.2.2.3.- Antígenos de superficie*

Las células plasmáticas tumorales expresan una serie de antígenos en su membrana que son fundamentales para las interacciones con las células del microambiente de la médula ósea. Durante el proceso de diferenciación a células tumorales, las células plasmáticas pierden algunos antígenos y ganan otros.

Así, respecto a las células plasmáticas normales, las células tumorales ganan la expresión de CD138 y CD56 (Harada et al. 1993), aunque se ha observado pérdida de CD56 asociada con un mal pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, las células de mieloma múltiple pierden la expresión de CD19 y expresan menor proporción de CD38 que las células normales. Otros antígenos característicos de las células tumorales son CD10, CD34, CD24 ó CD28 (Pilarski and Jensen 1992; Takishita et al. 1994). La expresión de CD45, un marcador característico de linfocitos, es muy heterogénea ya que aunque la mayoría de las células tumorales lo pierden, hay un porcentaje de pacientes que presentan este marcador en sus

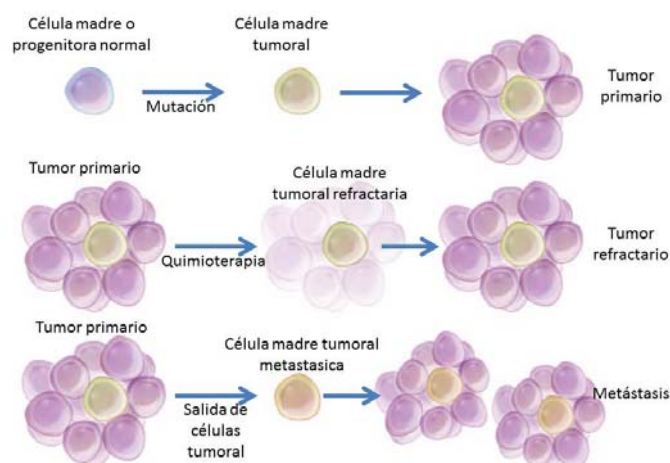
células (Raja et al. ; Pellat-Deceunynck and Bataille 2004). Su presencia se ha asociado en varios estudios con mal pronóstico para la enfermedad (Moreau et al. 2004; Kumar et al. 2005).

La característica más importante de las células plasmáticas tumorales es su gran heterogeneidad. Esto se pone de manifiesto en la variabilidad en cuanto a la expresión de antígenos de superficie, lo que supone una gran dificultad a la hora de caracterizarlas. Esta caracterización inmunofenotípica es, sin embargo, fundamental para el diagnóstico de los pacientes de MM y para profundizar en el estudio de la patogeneicidad de las células plasmáticas tumorales.

### **2.2.3.-Células madre y cáncer**

Las células madre han sido objeto de extensas investigaciones. Estas son esenciales en el desarrollo de organismos complejos y en las últimas décadas se ha demostrado que su existencia no está sólo restringida al desarrollo embrionario ya que se han identificado y aislado células madre de tejidos, llamadas células madre adultas. Estas residen en todos los tejidos y contribuyen a su homeostasia y reparación. La población de células que derivan de las células madre están organizadas jerárquicamente, encontrándose las células madre en la punta de la pirámide del desarrollo. Las células madres tienen tres propiedades distintivas que las hace únicas: la autorenovación, en la cual, en la división celular, una o ambas células hijas mantienen las mismas propiedades biológicas que la célula progenitora, la capacidad de desarrollarse hacia múltiples líneas y un elevado potencial proliferativo (Morrison and Kimble 2006).

No obstante, también se ha postulado que las células madre pueden ser críticas para el desarrollo de tumores. Y las similitudes observadas entre los mecanismos de autorenovación de las células madre y las células cancerígenas han conducido al concepto de células madre tumorales (CSCs: **cancer stem cells**). Diversos hallazgos sostienen la teoría de que las células tumorales con propiedades de células madre son esenciales para el desarrollo y perpetuación de varios tipos de cáncere humano como leucemias, cáncer de mama, de próstata, ovario y glioma cerebral (Figura 2.19) (Al-Hajj et al. 2003; Singh et al. 2003; Bapat et al. 2005; Collins et al. 2005). Por ello la erradicación de estas células podría ser determinante para alcanzar una remisión estable y duradera e incluso la cura de la enfermedad.



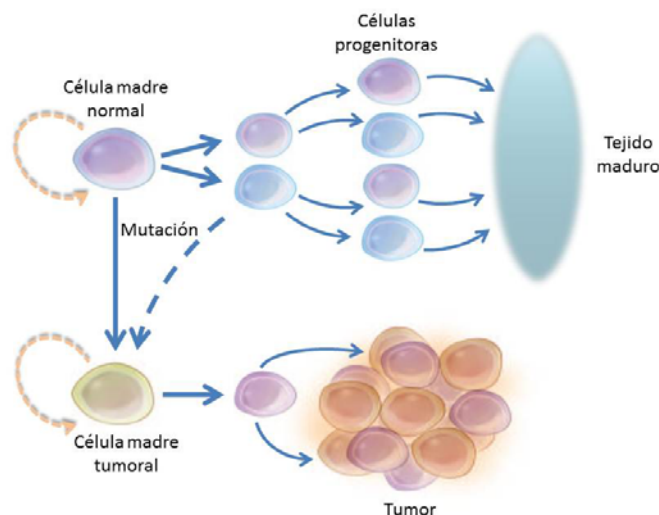
**Figura 2.19.**-Esquema de los posibles escenarios de actuación de las células madre tumorales. En los tumores las células madre tumorales pueden desempeñar tres papeles, primero dar origen al tumor, segundo, tras la quimioterapia, permitir la reaparición del tumor y tercero, dar origen a metástasis. (Modificado de (Jordan et al. 2006)

### 2.2.3.1-Células madres tumorales (CSCs)

Las CSCs pueden ser definidas como un pequeño subgrupo de células tumorales que poseen la exclusiva habilidad de autorenovarse y reproducir todos los linajes celulares de células que forman el tumor (Ribatti 2012).

Poblaciones de células relativamente escasas y biológicamente distintas a las del resto del tumor, con capacidad de regeneración de este se han detectado en cánceres hematopoyéticos, cerebrales, de próstata, ovario y de mama. Estas células tienen la capacidad de auto renovación, potencial para diferenciarse en cualquiera de las células de toda la población tumoral y la capacidad de proliferación y expansión de la población de células malignas. Las propiedades de estas células recuerdan las tres características que definen las células madres normales, por lo que, a las células tumorales con estas propiedades se les ha dado el nombre de "células madres tumorales"(Al-Hajj et al. 2003; Singh et al. 2003; Bapat et al. 2005; Collins et al. 2005; Dick 2005).

Existe controversia sobre el origen de estas células madres tumorales. Algunos autores plantean que las CSCs pueden originarse por mutaciones en células tumorales. Sin embargo, varias evidencias apuntan a que también pueden originarse por mutaciones en células progenitoras. Tales células progenitoras pueden tener una capacidad replicativa sustancial, pero generalmente no tienen la capacidad de auto renovación de las células madre. Para que las células progenitoras se conviertan en células madre deben adquirir alguna mutación que provoque que las células vuelvan a adquirir la capacidad de auto renovación (figura 2.20). No obstante estas hipótesis, podrían existir múltiples vías y procesos que pudieran dar origen a las células madre tumorales (Jordan et al. 2006; Subramaniam et al. 2010).



**Figura 2.20.**-Esquema del posible origen de las células madre tumorales. Los tejidos surgen de las células madre que crecen y se diferencian para dar origen a las células progenitoras y a poblaciones de células maduras. Mientras que las células madre tumorales surgen de mutaciones en las células madres normales o en las células progenitoras. Modificado de (Jordan et al. 2006)

Aunque el concepto de células madre tumorales puede variar en diferentes contextos y las características específicas de las células tumorales pueden ser preservadas en mayor o menor medida en las células madres tumorales, la cuestión clave es que un subgrupo pequeño de células en el tumor. Son esenciales para el mantenimiento de la población de células malignas. Por ejemplo, un pequeño subgrupo de células madres tumorales puede ser la fuente de todas las células malignas en el tumor primario, pueden constituir un pequeño reservorio de células resistentes a las drogas y por tanto ser las responsables de las recaídas después de la quimioterapia, o pueden dar lugar a metástasis en lugares distantes.

Se han llevado a cabo diferentes aproximaciones experimentales para identificar a las CSCs. La metodología más usada ha sido la identificación de antígenos de superficie expresados por las células tumorales, siendo los marcadores candidatos aquellos característicos de las células madres y progenitoras normales dentro del tejido de origen. Por ejemplo, CD34 en leucemia mieloide, CD133 en tumores cerebrales, o los marcadores asociados a mal pronóstico, como CD44, en tumores sólidos (Tabla 2.2). Adicionalmente, también se han empleado estudios de citometría de flujo indicativos de resistencia a fármacos, como el ensayo con la sonda de Aldefluor, que mide la actividad aldehído deshidrogenasa, una enzima usada por las células para la eliminación de tóxicos, o la detección de poblaciones celulares con una capacidad incrementada para la expulsión de tóxicos de su interior, llamada “*side population*” (SP) (Golebiewska et al. 2011). El ensayo de SP se beneficia del espectro de emisión diferencial en dos canales de fluorescencia tras exponer las células a la sonda Hoechst 33342 unida al DNA y fue inicialmente desarrollado para identificar células madres hematopoyéticas (Hadrnaghy et al. 2006). Todas estas técnicas han sido empleadas para identificar y purificar presuntas CSCs. No obstante, la característica primordial que deben cumplir las células para identificarlas como CSCs es la de tener una mayor capacidad clonogénica y de reproducir la



enfermedad al ser injertadas en ratones inmunocomprometidos, generalmente NOD/SCID (Matsui et al. 2012).

Tipo de cáncer	Marcadores usados para identificar y/o purificar CSC
Tumores cerebrales, incluidos glioblastoma y meduloblastoma	CD133 <sup>+</sup>
Carcinoma de colon	CD133 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> /Lin <sup>-</sup> /ESA <sup>+</sup>
Carcinoma mamario	CD24 <sup>-Low</sup> /CD44 <sup>+</sup>
Cáncer de pulmón	CD133 <sup>+</sup>
Carcinoma pancreático	CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup> /ESA <sup>+</sup> , CD133 <sup>+</sup>
Cáncer hepatocelular	CD133 <sup>+</sup>
Carcinoma de ovario	SP
Carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza	CD44 <sup>+</sup>
Carcinoma de próstata	CD44 <sup>+</sup> /α2β1 <sup>high</sup> /CD133 <sup>+</sup>
Cánceres hematológicos	CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup>

**Tabla 2.2.**-Marcadores usados para identificar presuntas células madres tumorales en diferentes tipos de neoplasias. (Modificado de (Jones and Armstrong 2008))

### 2.2.3.2-Células madres tumorales en mieloma múltiple humano (MM-CSCs)

A pesar de la introducción de nuevas terapias, el mieloma múltiple humano continúa siendo una enfermedad incurable. La introducción de terapias con altas dosis y de nuevos fármacos como el bortezomib, la talidomida y la lenalidomida han mejorado la respuesta de los pacientes a la terapia y aumentado su supervivencia. No obstante, la mayoría de los pacientes tienen recaídas y continúa siendo una enfermedad incurable.

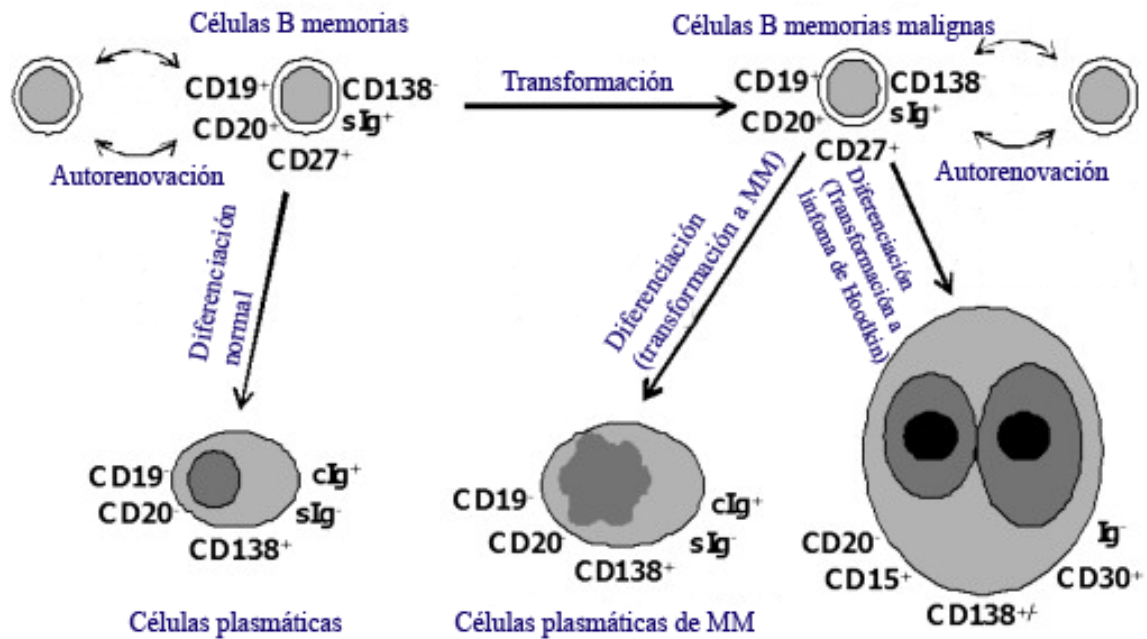
Todo esto se atribuye a las células madres tumorales, las cuales sería las responsables de la iniciación del tumor, así como de su recaída e incluso de las metástasis. Sin embargo, estas células no han sido fehacientemente caracterizadas y en la bibliografía existen datos contradictorios.

Diferentes estudios han examinado las CSCs de mieloma múltiple dentro del contexto de la diferenciación de las células plasmáticas normales. De forma esquemática y simplificada en el desarrollo de las células B normales, las células B naïve que poseen el reordenamiento génico, tras ponerse en contacto con el antígeno que reconocen, sufren la hipermutación somática en el centro germinal para producir un único idiotipo de anticuerpo y mejorar la especificidad de unión al antígeno. Estas células dan lugar a células post-centro germinal que mantienen la inmunidad humoral por largo período de tiempo y a células plasmáticas secretoras de anticuerpos tras la exposición al antígeno. Al examinar la secuencia génica de la inmunoglobulina de células plasmáticas de mieloma se encuentra que estas han sufrido la hipermutación somática y esta se mantiene constante durante todo el curso de la enfermedad, demostrando un origen clonal de las células de mieloma múltiple. Ésto sugiere que esta enfermedad surge en células post germinales, en las células B de memoria o en las células plasmáticas (Jones and Armstrong 2008; Matsui et al. 2012).

Diversos estudios con muestras de pacientes, han detectado células B en la médula ósea o en la sangre que presentan el mismo reordenamiento de los genes de la inmunoglobulina que las células plasmáticas de mieloma múltiple (Billadeau et al. 1993; Bakkus et al. 1994; Bergsagel et al. 1995; Rasmussen et al. 2000b). El significado clínico de estas células B clonotípicas no está claro, pero estudios funcionales han demostrado que son tumorigénicas y pueden dar origen a células plasmáticas mielomatosas tanto en ensayos clonogénicos *in vitro* como en ensayos *in vivo* en ratones NOD/SCID (Pilarski et al. 2000; Pilarski et al. 2002; Matsui et al. 2008). De igual forma, también han demostrado que estas células B clonotípicas son relativamente resistentes, en comparación con las células plasmáticas, a diferentes quimioterapias usadas en la práctica clínica, tanto a los agentes tradicionales como a los nuevos fármacos como bortezomib o lenalidomida tanto *in vitro* como *in vivo* (Rasmussen et al. 2000a; Matsui et al. 2008).

En 1994, Pilarski, L. M. et al, proponen que las células B malignas circulantes en sangre que expresan la glicoproteína-P 170 (P-gp), un transportador ABC de fármacos, podrían constituir las células madres tumorales en el caso de mieloma múltiples, ya que las células B expresan esta proteína durante su desarrollo y al diferenciarse al estado final de células plasmáticas lo pierden. Por lo que, las células B mielomatosas periféricas que expresan P-gp al ser más resistentes a los fármacos serían las responsables de las recaídas (Pilarski and Belch 1994).

Por otro lado, Matsui, W. et al, plantean que las células con mayor capacidad clonogénica son aquellas que no expresan CD138 y si CD20, por lo que la capacidad clonogénica se ve significativamente reducida al pre incubar estas células con rituximab, un anticuerpo humanizado contra CD20 (Matsui et al. 2004). Y aunque, en otros estudios se ha demostrado que las células de sangre periférica de los pacientes de mieloma, presentan al menos dos poblaciones de células B CD20+ y CD19+, así como células plasmáticas CD138+ y CD20+, esta terapia no es efectiva en la práctica clínica (Pilarski et al. 2008). Una hipótesis similar es defendida por Jones y Armstrong quienes plantean que las células madres de mieloma podrían tener el mismo fenotipo que las células B memoria, es decir CD19+, CD20<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> y CD138<sup>-</sup> (Figura 2.21). Al diferenciarse a células plasmáticas de mieloma ganarían CD138 y perderían el resto de marcadores mencionados anteriormente (Jones and Armstrong 2008).



**Figura 2.21.**-Las células B memoria como posibles células madre tumorales del mieloma múltiple. Según esta hipótesis, las células madre tumorales de MM podrían tener el mismo fenotipo que las células B memoria, es decir  $CD19^+$ ,  $CD20^+$ ,  $CD27^+$  y  $CD138^-$ . Modificado de (Jones and Armstrong 2008).

Otro estudio realizado en un modelo de cultivo tridimensional que reconstruía las interacciones heterotípicas de la médula ósea y en el cual se cultivaron muestras de aspirado de médula ósea y de sangre periférica de pacientes diagnosticados de mieloma múltiple, se demostró que las presuntas células madre de mieloma múltiple serían aquellas células quiescentes, resistentes a fármacos,  $CD20^+$  con capacidad de autorenovación para originar células B de mieloma múltiple  $CD20^+$  y células plasmáticas mielomatosas  $CD138^+$  y que residirían en el endostio, un nicho conocido de células progenitoras normales (Kirshner et al. 2008).

Sin embargo, Paino, et al, rebaten la hipótesis de que las CSC de mieloma múltiple sean las células  $CD20^+$ , ya que en un estudio publicado en el año 2012 demuestran que la presencia de células  $CD20^+$  en las líneas de mieloma múltiple era indetectable excepto en la línea RPMI 8226 en la que se encontró un 0.3% de células  $CD20^+$ , las cuales además expresaban marcadores de células plasmáticas como  $CD38$  y  $CD138$  y eran  $CD19$  y  $CD27$  negativas. Además estas células tampoco expresaban otros marcadores de células madres como el observado con el ensayo de Aldefluor. En el mismo trabajo se indica que tras eliminar del cultivo las células  $CD20^+$ , las células restantes tienen la misma capacidad para inducir plasmacitomas que los cultivos controles. Por ello concluyen que este no es un marcador adecuado para CSC de mieloma múltiple (Paino et al. 2012).

Además de los estudios basados en la detección de antígenos de superficie, también se han realizado ensayos de citometría de flujo funcional para identificar células de mieloma clonogénicas. La expresión de la aldehído deshidrogenasa (ADH) es característica de las células madre normales en gran variedad de tejidos adultos y podría identificar las CSCs tanto

en tumores sólidos como hematológicos (Brennan and Matsui 2009). Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que las presuntas MM-CSCs expresan niveles relativamente altos de aldehído deshidrogenasa (Matsui et al. 2008). Por otro lado, el ensayo de *side population* ha sido usado para identificar MM-CSCs y se ha observado que células tumorales clonogénicas expresan el fenotipo de SP. Posteriores análisis de las células de MM-SP también han mostrado un incremento en la expresión de transportadores de fármacos unidos a la membrana (ABCG2 y MDR/Pgp) sugiriendo una resistencia relativa a la quimioterapia (Goodell et al. 1996; Rasmussen et al. 2000a; Matsui et al. 2008; Jakubikova et al. 2011).

Diversos estudios examinan la naturaleza de las células B de muestras de MM y han demostrado que estas células carecen de la expresión del antígeno de superficie CD138 característico tanto de las células plasmáticas normales como de mieloma (Goodell et al. 1996; Rasmussen et al. 2000a; Matsui et al. 2004; Matsui et al. 2008; Jakubikova et al. 2011). Por otro lado, estudios que examinan las células de la SP de MM han demostrado que estas células son tanto CD138 positivas como negativas (Matsui et al. 2008; Jakubikova et al. 2011). Además, existen estudios que demuestran que las células CD138 positivas son capaces de implantarse adecuadamente, producir proteína M e incluso metastatizar cuando se implantan dentro de un fragmento de hueso fetal humano o de conejo en ratones inmunodeficientes (SCID-Hu) (Yaccoby et al. 1998; Yata and Yaccoby 2004).

A pesar de estos hallazgos, la existencia y fenotipo preciso de las MM-CSCs continúa sin ser aclarado. Estas diferencias observadas por diferentes grupos, pueden ser atribuidas a la variación entre los diseños experimentales usados para analizar la capacidad clonogénica de las células, especialmente por el uso de distintos modelos murinos *in vivo*, así como por la inherente variabilidad entre los pacientes cuando se realizan estudios en muestras de pacientes.

También es importante considerar los datos recientes en los que se muestran como antígenos de superficies, convencionalmente asociados como marcadores de células madres en la población de células tumorales, pueden realmente exhibir una plasticidad significativa. Es decir, existen evidencias crecientes que sostienen la interconversión bidireccional entre las células normales y las células madres, tanto en una población de células normales o malignas (Chaffer et al. 2011; Gupta et al. 2011; He et al. 2011; Jakubikova et al. 2011). Estos resultados proporcionan otra explicación a algunas variaciones observadas entre diferentes grupos al estudiar las características fenotípicas de las CSCs (Matsui et al. 2012)

### **2.2.4.-Farmacoterapia del mieloma múltiple humano**

Por muchos años el melfalan y la prednisona han representado el estándar en la terapia del mieloma múltiple, con el trasplante de células madres reservado a un reducido grupo de pacientes. El tratamiento de la enfermedad a evolucionado rápidamente en las últimas décadas con el desarrollo e utilización de los nuevos fármacos talidomida, lenalidomida y bortezomib (Laubach et al. 2010).

En la actualidad existen varios tratamientos alternativos para el MM. Se usan unos u otros en función del estadio del tumor en el momento del diagnóstico, además de otros factores, como la edad, indicadores de pronóstico y patologías concomitantes. Para definir el estadio de la enfermedad se pueden usar los criterios de Durie–Salmon (Durie and Salmon 1975), el sistema internacional (Hari et al. 2009) o el de la “Clínica Mayo” (Kumar et al. 2009). Este último clasifica los pacientes de nuevo diagnóstico en pacientes con riesgo estándar, intermedio y alto (Tabla 2.3) (Rajkumar 2011).

<b>Riesgo estratificado del Mieloma Múltiple</b>
<b>Riesgo estándar</b>
Hiperdiploidía
t (11;14)
t (6;14)
<b>Riesgo intermedio</b>
t (4;14)
Del13 o hipodiploidía
<b>Riesgo alto</b>
17p delección
t (14;16)
t (14;20)
Perfil de expresión génica de alto riesgo

**Tabla 2.3.**-Riesgo estratificado en mieloma múltiple según Kumar S.K. et al, (Kumar et al. 2009).

Los tratamientos utilizados actualmente son: la quimioterapia y/o el autotransplante de células madres (ASCT, *Autologous Stem Cell Transplantation*). Los esquemas terapéuticos pueden variar según los protocolos establecidos por cada comité, pero según la “Clínica Mayo” la terapia adaptada al riesgo sería (Figura 2.22):

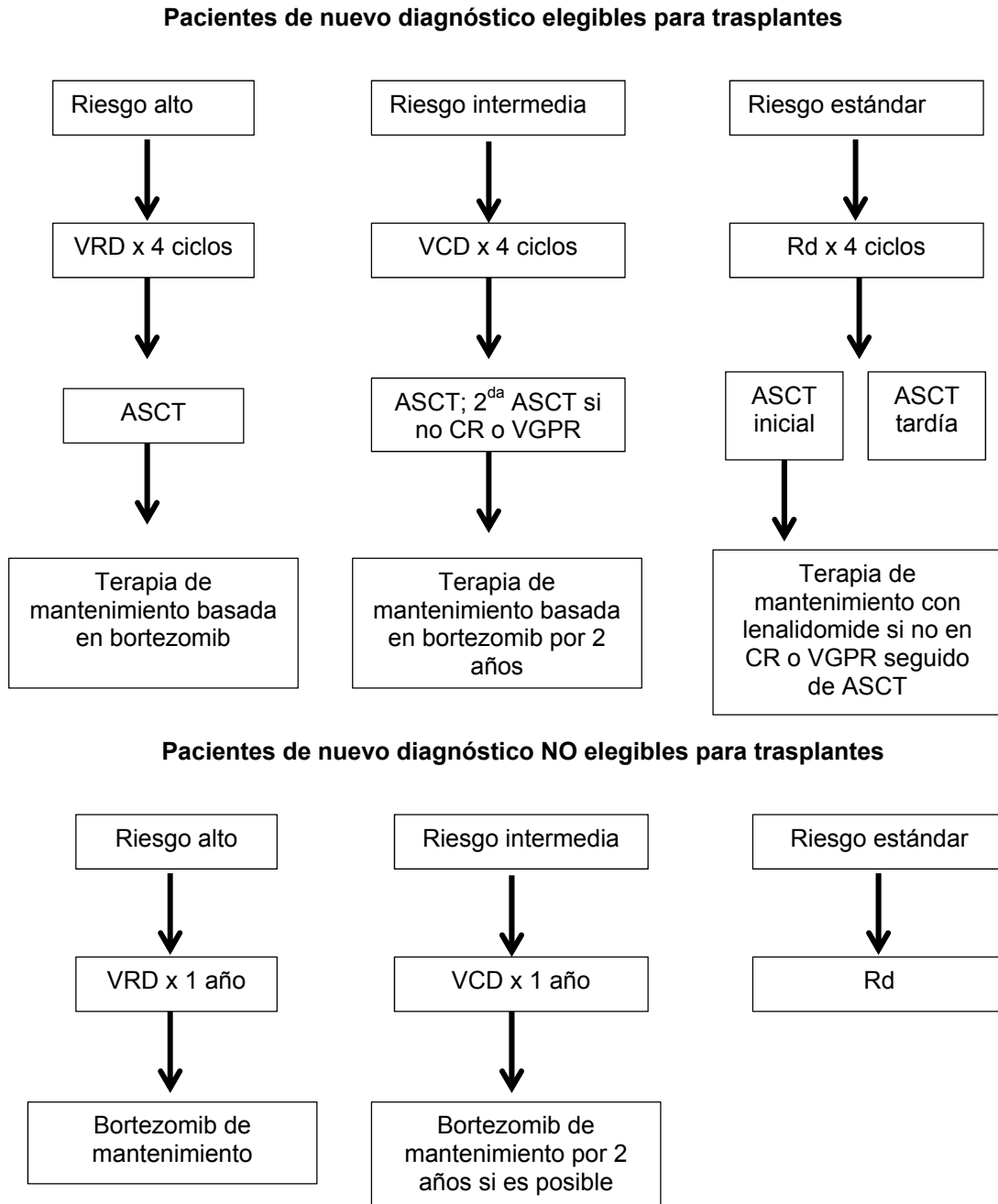
**Pacientes con riesgo estándar:** son tratados con agentes no alquilantes como lenalidomida (Revlimid) más dosis bajas de dexametasona (Rd, Revlimid + bajas de dexametasona) seguido por (ASCT). Una estrategia alternativa es continuar la terapia inicial después de coleccionar las células madre para el trasplante, y recibir el ASCT en la primera recaída.

**Pacientes con riesgo intermedio y alto:** son tratados con un esquema terapéutico basado en bortezomib seguido por ASCT y luego terapia de mantenimiento con un esquema que contenga bortezomib.

Los pacientes no elegibles para ASCT son tratados con Rd si son de riesgo estándar o con un régimen que contenga bortezomib si son de riesgo intermedio o alto. Para reducir la toxicidad cuando se usa el bortezomib es preferible usar una dosis subcutánea semanal, de manera similar, es preferida una dosis baja de dexametasona, 40 mg una vez a la semana a no ser que se necesite un rápido control de la enfermedad. No obstante el melfalan, que ha sido usado durante décadas, aun se sigue usando en pacientes no candidatos a ASCT combinado con dexametasona y lenalidomida o bortezomib, estas combinaciones han mostrado mejores resultados aunque más reacciones adversas en varios ensayos clínicos que la combinación de

merfalan y dexametasona(Kumar et al. 2009) (Kumar 2009).

Los pacientes con recaídas pueden ser tratados con combinación de dos o tres fármacos. Los pacientes con recaídas más agresivas pueden requerir terapia con combinación de múltiples agentes. Los nuevos agentes más prometedores en desarrollo son pomalidomida and carfilizomib (Rajkumar 2011).



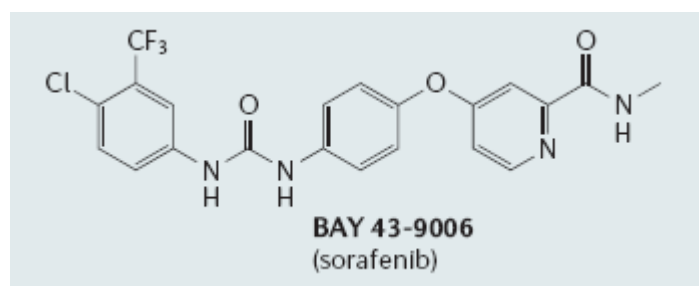
**Figura 2.22.**-Esquema de la terapéutica de los pacientes de nuevo diagnóstico. A) Elegibles para trasplante. B) No elegible para trasplante. ASCT: trasplante autólogo de células madre, CR: respuesta completa, VGPR: respuesta parcial muy buena, VRD: bortezomib + lenalidomide + dexametasona, VCD; Bortezomib + ciclofosfamida + dexametasona, Rd: lenalidomida + dosis bajas de dexametasona. Modificado de (Rajkumar 2011).

## 2.2.5.-Sorafenib

El Sorafenib es un fármaco aprobado por la FDA en 2005 para el tratamiento del carcinoma renal. El fármaco fue inicialmente desarrollado por Bayer como un inhibidor de la quinasa Raf y por tanto de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK. El Sorafenib presenta una  $IC_{50}$  de 6 nM para Raf-1 (Tabla 2.4). Químicamente es una bisarilurea con un anillo de piridina en un extremo y un anillo fenil-trifluorometil en el extremo opuesto (Figura 2.23) (Wilhelm et al. 2006)

Quinasas	Valor de la $IC_{50}$ en ensayos <i>in vitro</i> (nM)
Raf-1	6
B-raf	25
b-rafV600E	38
VEGFR1	26
VEGFR2	90
FLT3	33
P38	38
C-Kit	68
FGFR1	580
MER1, ERK1, PKA, PKB	Más de 10 000

**Tabla 2.4.**-Valor de la  $IC_{50}$  obtenidos en ensayos *in vitro* para diferentes quinasas

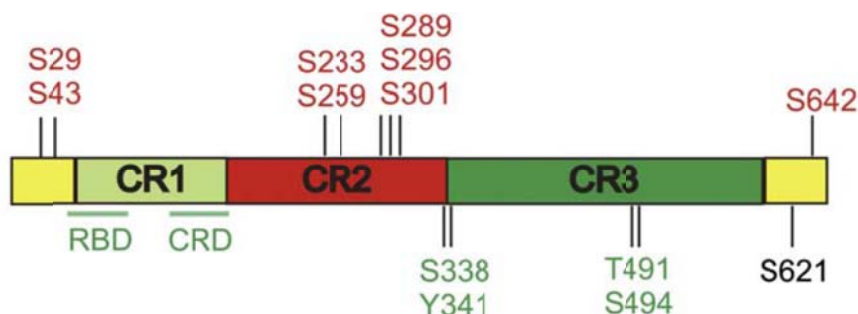


**Figura 2.23.**-Sorafenib. Fármaco desarrollado por Bayer y aprobado en 2005 para el tratamiento del carcinoma renal. Modificado de (Wilhelm et al. 2006)

### 2.2.5.1.-Las proteínas Raf

La familia de las proteínas Raf (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*) en mamíferos comprende tres isoformas: A, B y C-Raf, esta última llamada también Raf-1 o c-Raf-1, y difieren en su patrón de expresión, regulación y función. Son proteínas efectoras de la ruta activada por los receptores con actividad tirosín-quinasa, son activadas por unión a Ras y poseen actividad serín/treonín quinasa y actúan activador apical de la cascada de señalización de las MAPquinasas (Raf→MEK→ERK). La mayoría de las investigaciones iniciales se centraron en la isoforma C-Raf, siendo la primera isoforma en ser identificada. Las proteínas Raf están conservadas estructuralmente desde los animales inferiores hasta los mamíferos al igual que ocurre con el módulo de señalización Ras-Raf-MEK-ERK (Leicht et al. 2007).

Raf es activada por Ras en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento. Raf fosforila a su vez a MEK la cual posteriormente fosforila a ERK en T e Y activandola. ERK tiene sustratos con una variada localización celular, como membrana, citosol o núcleo generando una diversidad de respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación y supervivencia (Baccarini 2005).



**Figura 2.24.**-Esquema de la proteína Raf-1 con sus dominios conservados y los sitios de fosforilación. Los sitios de fosforilación en verde son activadores mientras que los que se encuentran en rojo son inhibidores.

Las tres isoformas de Raf comparten una estructura común formada por tres dominios conservados (CR) (figura 2.24) la región 1 o CR1 contiene dos subdominios, uno de unión a Ras (RBD) y uno rico en cisteína (CRD) involucrados en la liberación de la autoinhibición, la región 2 o CR2 es rica en residuos de serina, los cuales por fosforilación participan en la regulación negativa de la actividad quinasa y la región 3 o CR3 presenta el dominio quinasa y es rica en residuos de serina y treonina, que al ser fosforilados estimulan la actividad quinasa (Baccarini 2005; Leicht et al. 2007).

Además el extremo carboxiterminal contiene un residuo de serina fosforilado constitutivamente (S621 en Raf-1), el cual media la unión de Raf a la proteína 14-3-3 y que es necesario para la activación de Raf. La fosforilación de serinas en la mitad aminoterminal de Raf-1 media la represión de la actividad quinasa. De hecho, esta región contiene 7 de los 8 sitios de fosforilación responsables de la represión de la actividad quinasa de Raf-1. Algunas de éstas fosforilaciones son realizadas por la PKA (S43, S233 y S259) o la PKB/Akt (S259) creando sitios adicionales de unión para la proteína 14-3-3. ERK también es capaz de fosforilar a Raf-1 (S29, S43, S289, S296, S301 y S624) sugiriendo la posibilidad de una regulación por retroalimentación negativa (Baccarini 2005).

La regulación de Raf-1 es realizada en parte por el dominio N-terminal de la propia proteína, el cual se une al dominio catalítico suprimiendo la actividad de la enzima. Ésta autoinhibición intramolecular está favorecida por la proteína 14-3-3, ya que en estado quiescente la fosforilación de los residuos de serina 259 y 621 de Raf-1 crean sitios de unión para la proteína 14-3-3, la cual estabiliza la conformación inactiva. Luego de la estimulación a los receptores tirosín-quinasa, la señal de activación se transmite vía los adaptadores Grb-2 y SOS hasta Ras, que une GTP y se activa. La unión de Ras-GTP a Raf-1 desplaza a la proteína



14-3-3 en su unión con Raf-1 y fuerza a la vez un cambio conformacional que libera la autoinhibición. Sin embargo, la interacción de Ras-GTP y Raf-1 es insuficiente para lograr la activación de Raf-1 y se requieren subsecuentes fosforilaciones y desfosforilaciones para activar de forma estable a Raf-1 sin requerir la continúa asociación con Ras-GTP. Entre estas modificaciones está la realizada por la fosfatasa PP2A, la cual desfosforila el residuo de serina 259, diana de unión de la proteína inhibitoria 14-3-3, y entre las fosforilaciones que son llevadas a cabo destacan las de la serina 338 y la tirosina 341 o las de serina 494 y la treonina 491 (Dhillon et al. 2002).

Finalmente, por retroalimentación negativa, la activación es finalizada por la fosforilación en los sitios inhibitorios por ERK y/o PKB. El restablecimiento de la forma inicial de Raf se produce por la acción conjunta de una prolil isomerasa (Pin1) que convierte los residuos de pSer y pThr de la forma *cis* a la *trans*, que es la única reconocida y desfosforilada por la fosfatasa PP2A. Por último la serina 259 es fosforilada nuevamente permitiendo la unión de dímero 14-3-3.

En contraste con este complejo mecanismo de regulación, B-Raf se activa de un modo mucho más directo, requiriendo sólo la unión de Ras y la fosforilación del segmento de activación para romper las interacciones intramoleculares responsables de la autoinhibición, siendo B-Raf la principal isoforma kinasa de MAPKKK mientras que Raf-1 y A-Raf son formas divergentes de B-Raf para realizar otras funciones, aunque mutantes de B-Raf incapaces de fosforilar a MEK directamente pueden activar la cascada MEK/ERK a través de la heterodimerización con Raf-1 y su consecuente activación (Baccarini 2005).

Raf tiene un papel clave en la oncogénesis de muchos cánceres humanos, ya que el 30% de los cánceres presentan mutaciones en Ras, el activador directo de Raf. B-Raf se encuentra mutado en el 7% de todos los cánceres humanos, aunque la incidencia cambia mucho dependiendo del tipo de cáncer. Por ejemplo, mutaciones de B-Raf han sido detectadas en el 70% de los melanomas, 30% de cáncer de tiroides, 15% de cáncer de colon y en menor frecuencia en otros tipos de cáncer, siendo en el 90% de las mutaciones la sustitución de una valina por el ácido glutámico en el aminoácido 600, referida como (V600E), lo cual es el resultado del cambio de una timidina por una adenosina en el nucleótido 1,799. Esto resulta en una activación constitutiva del dominio quinasa. Además, en algunos cánceres humanos se han detectado mutaciones en receptores tirosín quinasa, así como aumento de la actividad de la cascada de señalización Ras/Raf/MEK/ERK sin haber encontrado ninguna mutación. Por lo anteriormente expuesto existen muchas investigaciones en curso que buscan drogas que puedan inhibir esta vía de señalización (Leicht et al. 2007; McCubrey et al. 2007).

### ***2.2.5.2.-Mecanismo de acción del sorafenib***

La molécula del sorafenib interacciona con Raf-1, B-Raf y b-Raf V600E a través del dominio quinasa, de tal forma que el anillo piridilo del extremo ocupa el bolsillo de unión de la adenina del ATP en el dominio quinasa y el resto de la molécula establece diferentes

interacciones de tal forma que se logra estabilizar la proteína en su conformación inactiva (Wan et al. 2004).

El sorafenib ha mostrado ser un potente inhibidor tanto de la forma normal de B-Raf, como de la forma mutada con una  $IC_{50}$  de 25nM para B-Raf y de 38nM para b-Raf V600E. Aunque el sorafenib se diseñó originalmente para inhibir las isoformas de Raf, también resultó ser un potente inhibidor de la autofosforilación de algunos receptores tirosín-quinasa como VEGFR 1/2/3, PDGFR- $\beta$ , FGFR-1 y otros receptores tirosín-quinasa involucrados en la tumorigénesis como c-Kit, FLT-3 y RET (Tabla 2.4). Todas estas moléculas están implicadas en la etiología de muchas formas de cáncer humano. Sin embargo, el sorafenib no ha mostrado en ensayos bioquímicos tener efectos significativos sobre MEK1, ERK1, proteína quinasa B, proteína quinasa A, proteína quinasa C $\alpha$ , proteína quinasa-C $\gamma$ , EGFR, HER2/neu o IGFR-1 (Wilhelm et al. 2006).

Debido a estos efectos, el Sorafenib inhibe la transducción de señales a través de la vía de señalización de las MAPK en un amplio rango de líneas celulares tumorales que poseen mutaciones en el oncogen K-Ras y/o B-Raf, o que muestran la activación constitutiva por autofosforilación de varios receptores tirosin quinasa (Wilhelm et al. 2004). Se ha demostrado también que el Sorafenib inhibe el crecimiento de tumores humanos implantados en ratones atómicos, como por ejemplo cáncer de colon, mama y pulmón (Liu et al. 2006; Dal Lago et al. 2008). Muchos de estos efectos son debido, además de la inhibición de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, a la inhibición de la angiogénesis como se demuestra por la reducción significativa del área y densidad de la microvasculatura (Adnane et al. 2006). Además, también se ha encontrado que el Sorafenib induce apoptosis en muchas líneas adherente de cáncer humano, como carcinoma renal, de colon, de mama, así como en líneas celulares de leucemias mieloides y linfoides (Adnane et al. 2006; Chang et al. 2007).

En las líneas celulares de melanoma humano A375, A2058, y SKMEL5 se ha descrito que el sorafenib induce exposición de fosfatidilserina así como caída del potencial mitocondrial, signos característicos de la apoptosis celular. A nivel molecular el sorafenib provoca desfosforilación de MEK y ERK además de activación de BAK y BAX, desfosforilación de Bad y disminución de los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. El sorafenib también provoca la liberación mitocondrial del citocromo c, SMAC/DIABLO y AIF así como la consiguiente traslocación nuclear de este último, todo lo cual desencadena la activación de las caspasas, demostrado por la detección de la fracción de 89kDa de la proteína PARP. Sin embargo, la activación de las caspasas no es esencial en la muerte inducida por sorafenib, por lo que este fármaco puede inducir apoptosis en las células de melanoma humano por una vía independiente de caspasas (Panka et al. 2006). Por otro lado, muchos de estos efectos del sorafenib, como la disminución de Bcl-2 y Bcl-xL y la traslocación nuclear de AIF, no son mediados por la inhibición de MEK ya que no se reproducen al utilizar moléculas inhibitoras de esta quinasa (Panka et al. 2006). Muchos de estos efectos como la exposición de fosfatidilserina, el daño mitocondrial, la liberación de citocromo c y AIF de la mitocondria al

citosol, así como la activación de las caspasas 7, 8, 9 y 3 y la proteólisis de PARP también son descritos por otros autores en otras líneas celulares como en las de leucemias humanas (U937, Jurkat, y K562) y en células de leucemia aisladas de pacientes (Rahmani et al. 2005). En estas células el sorafenib induce una rápida desfosforilación de ERK detectable a la hora y media de tratamiento con una dosis de 5  $\mu$ M siendo aún más pronunciada la desfosforilación a dosis mayores como las de 7,5 y 10  $\mu$ M (Lasithiotakis et al. 2008).

El sorafenib también induce una rápida disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 de una forma dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento de las células y a través de un mecanismo independiente de la inhibición de la vía de señalización Raf/MEK/ERK1/2. Rahmani y sus colaboradores (Rahmani et al. 2005) describen que este efecto podría deberse a la inhibición de la traducción del mRNA de Mcl-1. El sorafenib también demostró provocar una rápida desfosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF4E, hecho que podría estar relacionado con la inhibición de la traducción de Mcl-1 (Rahmani et al. 2005).

La disminución de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 también se ha atribuido a un aumento de la degradación mediada por el proteosoma en otras líneas celulares como en carcinoma renal, cáncer de pulmón, de colon y de mama (Yu et al. 2005).

El sorafenib, además de la inducción de la apoptosis e inhibición de la angiogénesis, también es capaz de provocar parada del ciclo celular y acumulación de las células en G0/G1 con la simultánea disminución de las fases S y G2/M debido a la inhibición de la señalización a través de los receptores tirosín-quinasa y Raf. Este efecto ha sido descrito en líneas celulares de leucemia y gliomas, y se asoció a las disminución de los niveles de varias proteínas claves en la regulación del ciclo celular como ciclina-D1, ciclina-D3, CDK4, y CDK6 (Jane et al. 2006; Auclair et al. 2007).

### **2.2.6.-Inhibidores de mTORC**

El proceso de transducción requiere enormes suministros celulares. Debido a ello, la célula ha desarrollado una compleja maquinaria de regulación para controlar la síntesis proteica así como la transducción de mRNAs específicos que son cruciales para el crecimiento y la proliferación celular. Un miembro importante de esta compleja maquinaria de regulación lo constituye la vía de señalización del complejo mTOR (*Mammalian target of rapamycin*). Éste detecta y responde a la disponibilidad de nutrientes, energía, hormonas y mitógenos para modular la síntesis de proteína (Ma and Blenis 2009).

Existen evidencia crecientes de que la desregulación en la síntesis proteica puede conducir a la tumorigénesis. Por lo que la inhibición de la transducción a través de la inhibición de la vía de señalización de mTOR se ha convertido en una prometedora opción terapéutica. Los primeros inhibidores de este complejo, rapamicina y sus derivados, mostraron propiedades antitumorales como inhibición de la proliferación y la supervivencia así como efectos antiangiogénicos. Sin embargo, existe evidencia que demuestran que dichas propiedades

muestran una gran variabilidad. Esta variabilidad ha sido atribuida a un bucle de retroalimentación negativa en el cual cuando mTORC1 es activado se inhibe AKT, por lo que al inhibir mTORC1 se suprime este bucle de retroalimentación negativa lo que conduce a la activación de AKT y señales intracelulares de supervivencia (Carracedo et al. 2008a; Tamburini et al. 2008).

La vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR esta frecuentemente activada en cánceres humanos por lo que mTOR se ha validado como diana terapéutica. mTORC forma dos complejos multiproteicas, mTORC1 y mTORC2, los cuales regulan el crecimiento celular, metabolismo, proliferación y supervivencia (Ma and Blenis 2009). La rapamicina y sus análogos inhiben parcialmente mTORC a través de unión alostérica a mTORC1 pero no a mTORC2. OSI-027 y PP242 son inhibidores selectivos y potentes de mTORC1 y mTORC2. Muestran una mayor selectividad hacia mTORC que hacia PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$ , y DNA-PK e inhiben la fosforilación de sustratos de mTORC1 como 4E-BP1 y S6K1, así como sustratos de mTORC2 como AKT en diversos modelos de tumores humanos tanto *in vitro* como *in vivo* (Gupta et al. ; Zeng et al. 2012). Estos fármacos son capaces de inhibir la proliferación de varias líneas sensibles y resistentes a la rapamicina, así como inducir muerte celular en líneas tumorales que muestran activa la vía de señalización PI3K–AKT. Estos fármacos logran evitar la activación de AKT como respuesta a la inhibición de mTORC1 lo que explica en parte su mayor efectividad comparados con la rapamicina (Bhagwat et al. 2011; Hoang et al. 2012).

### **2.2.7.-Inhibidor de Jak**

La IL-6 y las vías de señalización activadas por ella tienen un papel clave en la patofisiología de esta enfermedad. La vía de señalización dependiente de JAK tras la activación por la IL-6 tiene un importante función proliferativa, de supervivencia y de resistencia a diferentes fármacos. La línea de mieloma múltiple U266 muestra resistencia a un gran número de fármacos. Datos recientes indican que la activación constitutiva de la vía de señalización de STAT3 conduce a resistencia a la apoptosis en esta línea (Catlett-Falcone et al. 1999b).

La familia de las proteínas STAT son factores de transcripción citoplasmáticos que se unen a secuencias específicas reguladoras de la transcripción en los promotores de los genes dianas (10-12). Estas son reguladas por fosforilación de tirosinas que conduce a homo y/o heterodimerización con otras proteínas STAT y traslocación al núcleo. La familia de las tirosina quinasas Janus (JAK), que incluyen a JAK1, JAK2, JAK3, y TYK2 median la fosforilación en tirosina de las proteínas STAT (Bommert et al. 2006). La activación de las STAT es también inducida por diversas oncoproteínas incluidas *v-src*, *v-abl*, *v-fps*, *v-fes*, and *v-eyk*. Ha sido demostrado que muchos tipos de tumores humanos expresan constitutivamente las proteínas STAT3, STAT5 o STAT1 activada. STAT3 regula positivamente la transcripción de la proteína antiapoptóticas Bcl-X<sub>L</sub> y controla la supervivencia dependiente de IL-6 de la línea U266 (Catlett-Falcone et al. 1999b; Chim et al. 2004).

En respuesta a estimulación con citoquinas Jaks activa a STAT3 a través de la fosforilación en las Tirosina-705. Adicionalmente la fosforilación en la serina-727 parece ser la responsable de un incremento en la actividad transcripcional. La inhibición de la expresión de STAT3 induce apoptosis en células cancerígenas de próstata, linfocitos y astrocitos. La activación de STAT3 resulta en la sobreexpresión de varios genes involucrados en la proliferación y supervivencia celular, tales como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, ciclin-D<sub>1</sub> and c-Myc (25-27.)

Ruxolitinib es un potente y selectivo inhibidor competitivo con el ATP de las quinasas JAK1 y JAK2. Tiene una IC<sub>50</sub> de 3.3nM y 2.8nM respectivamente y no inhibe significativamente otras quinasas intracelulares a concentraciones 100 veces superiores a la de inhibición de las quinasas JAK1/2 (Eghtedar et al. 2012). Este fármaco inhibe la señalización de JAK inducida por citoquinas en células transformadas e Inhibe la señalización de factores de crecimientos por inhibición de la fosforilación de STAT al ser capaz de inhibir JAK1/2 en su foma natural como mutada. Este fármaco ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento la mielofibrosis donde induce una rápida y sostenible reducción de la esplenomegalia así copmo de otros síntomas (Deisseroth et al. 2012). En estos pacientes se ha observado una incidencia de un 50% de la mutación de *JAK2* V617F lo que induce una activación constitutiva de esta enzima (Barosi et al. 2007).



## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- Cultivos celulares

#### 3.1.1.- Materiales y medios de cultivo celulares

Durante esta tesis se emplearon diferentes medios de cultivos según los requerimientos de las líneas empleadas. Para las células en suspensión se empleó RPMI 1640, de Gibco™, Invitrogen (Barcelona, España). Para obtener el medio completo se suplementó con 5-15% de suero fetal bovino (SFB) de Gibco. Para las células adherentes se empleó DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. También se adicionó L-glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml de Sigma, Madrid, España.

Los frascos de cultivo empleados, así como el resto del material plástico estéril (placas de 6, 12, 24 ó 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, etc.) procedieron de TPP, Suiza. Los tubos criogénicos utilizados fueron de Nunc, Dinamarca. Los filtros de 0.22 µm de tamaño de poro (Acrodisc) utilizados para la esterilización de soluciones fueron de Pall Corporation, USA. El dimetilsulfóxido (DMSO) procedió de Sigma. Las soluciones Ficoll-Paque™ Plus y Percoll se obtuvieron de GE Healthcare (Barcelona). Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical, Telstar, España, y para esterilizar el material se utilizó la autoclave de Autester, Mod 4376, Selecta, España. Las células fueron cultivadas en un incubador de CO<sub>2</sub> termostatzado de Heraeus Cell, Alemania.

#### 3.1.2.- Líneas celulares utilizadas

Se emplearon las líneas establecidas de mieloma múltiple humano RPMI 8226, U266 (clon B1), NCI-H929, MM.1S, OPM-2 y las sublíneas derivadas MM.1S/Bcl-xL, RPMI/vector, RPMI/Mcl-1, RPMI/Bcl-xL, RPMIshNoxaF8, MM.1S/Mcl-1, MM.1S/Bcl-xL, todas obtenidas en nuestro laboratorio. También se empleó la línea establecida IM-9 de leucemia tipo B y las líneas de leucemia linfoblástica aguda humana Jurkat, y las sublíneas derivadas de esta: Jurkat/Bcl-xL, Jurkat/Bcl-2, Jurkat/Neo, Jurkat/pLTHV, Jurkat/shBak, Jurkat/shBeclina-1, Jurkat/shBim y Jurkat/CrmA. Todas estas líneas crecieron en suspensión.

Además se emplearon las líneas de fibroblastos embrionarios de ratón MEF 3T9, MEF/LC3-GFP, MEF/shBak-shBax, MEF/shATG5, la línea de fibroblastos embrionarios de riñón humano 293T y la líneas de células estromales HS-5. Estas células crecen de forma adherente.

- La línea RPMI 8226 fue amablemente proporcionada por la Dra. Martine Amiot, INSERM U463, Nantes, Francia.
- Las líneas MM.1S y 293T, por el Dr. Atanasio Pandiella, Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España.
- Las líneas U266, IM-9 y NCI-H929, por el Dr. Antonio Campos Caro, Hospital

Puerta del Mar, Cádiz, España.

- La línea OPM-2 fueron obtenidas de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Alemania.
- La línea Jurkat, clon E6-1 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC), USA.
- Las sublíneas RPMI/vector, RPMI/Mcl-1, RPMI/Bcl-xL, RPMIshNoxaF8, MM.1S/Bcl-xL, MM.1S/Mcl-1, Jurkat/pLTHV, Jurkat/shBak, Jurkat/shBeclina-1, Jurkat/shBim, fueron generadas en nuestro laboratorio mediante infección lentiviral o retroviral (Galan-Malo 2010).
- Las sublíneas Jurkat Neo, Jurkat Bcl-2 y Jurkat/CrmA fueron amablemente cedidas por el Dr. Daniel Jonhson, University of Pittsburgh, USA.
- La sublínea Jurkat BclXL fue amablemente cedida por el Dr. Santos A. Susin, INSERM, Paris.
- La línea HS-5 fue amablemente cedida por el Dr Reinhard Wallich, Instituto de Inmunología, Universidad de Heidelberg, Alemania.
- Las líneas MEF 3T9, MEF/LC3-GFP, MEF/shBak-shBax, MEF/shATG5 fueron amablemente cedidas por la Dr. Cristina Muñoz-Pinedo de IDIBELL, Barcelona.

### **3.1.3.- Mantenimiento de cultivos celulares**

Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (volumen máximo de células en suspensión, 20 ml) ó 75 cm<sup>2</sup> (volumen máximo de células en suspensión, 40 ml).

Todas las células se sembraron a una densidad de 15 x 10<sup>4</sup> cel/ml, excepto las de mieloma que se sembraron a una densidad mínima de 30 x 10<sup>4</sup> cel/ml. Todas las líneas de mieloma y las HS-5 se cultivaron en medio completo con 10% SFB. Mientras que las líneas de leucemia linfoblástica aguda humana y sus sublíneas se cultivaron en medio completo con 5% SFB. Las células adherentes de MEF y sus sublíneas así como las 293T se cultivaron con DMEM 10% SFB.

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado, a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% CO<sub>2</sub>. A los 3 ó 4 días de cultivo, alcanzada una densidad menor de 1 x 10<sup>6</sup> cel/ml, se realizó el pase de los cultivos. Todas las manipulaciones con células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles. El material de vidrio usado en la manipulación de las células se esterilizó previamente en una autoclave durante 20-30 minutos a 1,2 atm de presión y las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron usando filtros de 0.22 µm.

### **3.1.4.- Congelación y descongelación de líneas celulares**

Aproximadamente 6x10<sup>6</sup> células se centrifugaron a 1200 r.p.m durante 5 minutos, se



eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de medio completo conteniendo un 7,5% de DMSO y se trasvasó el contenido a un criotubo de congelación estéril. Los viales fueron introducidos rápidamente en un congelador a -80°C. Pasadas al menos 24 horas, los viales se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido (-196°C) hasta su utilización.

Para descongelar las células, se añadió lentamente a los criotubos un pequeño volumen de medio completo, hasta la descongelación de las células. En este momento, la suspensión se añadió a aproximadamente 10 ml de medio completo, y rápidamente se centrifugó a 1200 r.p.m durante 5 minutos. Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, se resuspendió el pellet de las células en 5-10 ml de medio completo, según la cantidad de células congeladas. Una vez las células se recuperaron de la descongelación, se sembraron a la densidad normal.

### **3.1.5.- Co-cultivo de células estromales con células de mieloma múltiple**

Las células MM.1S fueron co-cultivadas con la línea de células estromales humanas HS-5. Las células estromales HS-5 fueron sembradas aproximadamente al 50% de confluencia e incubadas durante la noche a 37°C en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células MM.1S fueron adicionadas a la capa de células estromales ya formadas a razón de 30 000 células por pocillo aproximadamente, permitiendo que se adhirieran durante 24h en medio RPMI 1640 completo. Las células no adheridas se eliminaron mediante un lavado suave y posteriormente se adicionaron 200 µL de medio completo con diferentes concentraciones de sorafenib.

Tras 24 horas de exposición al sorafenib, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS e incubadas durante 15 minutos con un anticuerpo anti-CD38 que marca específicamente las células de mieloma múltiple y se analizaron las células por citometría de flujo. De esta forma se diferenciaron las células HS-5 de las MM.1S para posteriores análisis de muerte celular (apartado 3.2.5).

## **3.2.- Estudio de proliferación, citotoxicidad, apoptosis y necrosis celular**

### **3.2.1- Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad**

El azul Trypan procedió de Sigma al igual que el bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT) que se utilizó como una solución estéril de 5 mg/ml preparada en suero fisiológico (PBS: NaCl 0.15 M, fosfato potásico 0.01 M, pH 7.4). Los péptidos inhibidores de proteasas benciloxycarbonil-Leu-Glu-His-Asp-fluorometilcetona (Z-LEHD-fmk), benciloxycarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona (Z-DVED-fmk), benciloxycarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-fluorometilcetona (Z-IETD-fmk) procedieron de BD Biosciences, Madrid, España, mientras el benciloxycarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk) fue de Bachem, Bubendorf, Suiza.

La poli-L-lisina fue proporcionada por Sigma y el colorante Hoechst 33342 por Molecular Probes, Leyden, Holanda.

La Anexina V marcada con fluoresceína (Anexina-FITC), con ficoeritrina (Anexina-PE) o con DY634 (Anexina-DY634) y el kit basado en la tinción con yoduro de propidio (PI) para analizar la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular fue de Immunostep, Salamanca. La Anexina V marcada con APC (Anexina-APC) procedió de BD Biosciences, Madrid, España. Las sondas fluorescentes yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3)), el tetrametilrodamina metil éster (TMRE) procedió de Molecular Probes/Invitrogen.

### 3.2.2.- Fármacos citotóxicos y citostáticos

El sorafenib fue proporcionado amablemente por Bayer, Alemania. Apo2L/TRAIL.0 (TRAIL.0), una versión recombinante de Apo2L/TRAIL que carece de la región transmembranal y de las colas endógenas (residuos 114-281) fue amablemente proporcionado por Genentech, California, USA. El inhibidor del proteasoma bortezomib (Velcade®, PS-341) fue amablemente proporcionado por Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, Massachussets.

### 3.2.3.- Contaje y determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular se realizó de forma rutinaria por contaje con azul Trypan, un colorante capaz de penetrar en las células muertas por tener la membrana plasmática desestructurada, tiñendo de esta forma las células de color azul. Las células vivas y las apoptóticas (que no sufren desestructuración de la membrana plasmática) no se tiñen. Para el contaje se mezclaron 50 µl de la suspensión celular y 50 µl de la solución de azul Trypan (azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15 M), se depositó la mezcla en una cámara Neubauer y se realizó el contaje en un microscopio óptico.

Cálculos para determinar la densidad celular:

$$Densidad_{celular} = \frac{(N^{\circ} \text{ células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4)}{N^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo 10<sup>4</sup> el factor de corrección por el volumen de la cámara.

Determinación de la viabilidad celular:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{N^{\circ} \text{ células viables}}{N^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

Siendo las células totales las células vivas + células apoptóticas + células muertas.

Todos los experimentos con las células se realizaron partiendo de una viabilidad celular de al menos un 90%.

### 3.2.4.- Determinación de la proliferación celular

Para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con drogas citotóxicas se utilizó

una modificación del método de Mossman (Alley et al. 1988) Este método relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul formazán insolubles en medio acuoso que se produce por oxidación del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT). La cantidad de cristales formados es proporcional a la proliferación celular, lo que incluye tanto inhibición del crecimiento como muerte celular. Para poder distinguir entre ambos efectos se realizó, simultáneamente al MTT, un conteo con azul Trypan.

Las células se cultivaron a una densidad de  $3 \times 10^5$  cél/ml en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 100  $\mu$ l/pocillo y al menos 4 pocillos por punto experimental, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de droga citotóxica. El cultivo se incubó en la estufa durante 24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo se añadió a cada pocillo 10  $\mu$ l de una disolución de MTT (5 mg/ml) con una pipeta de repetición. Las placas se incubaron 2-3 horas a 37°C y se centrifugaron 30 minutos, a 3500 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida y enérgica de la placa sobre papel de filtro. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100  $\mu$ l de DMSO y agitando en una placa vibradora, (Bioblock, Francia). Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas, MR5000, Dynatech, U.S.A., frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentaron como porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de la droga citotóxica frente al control, constituido por los cultivos sin droga.

### **3.2.5.- Determinación simultánea del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la translocación de fosfatidilserina**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es generado por el gradiente de protones ( $H^+$ ) entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). El potencial mitocondrial de las células en condiciones normales es alto y constante ( $\sim 130$  mV), pero disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias. Para la medida de este potencial se utilizó la sonda fluorescente verde lipofílica DiOC<sub>6</sub>(3) ( $\lambda_{abs}=485$  nm,  $\lambda_{em}=505$ nm) que está cargada positivamente, por lo que se acumula en la matriz mitocondrial de las células viables. Cuando desciende el valor del potencial, es decir, en las primeras etapas de la apoptosis, desciende la cantidad de sonda retenida en la matriz, disminuyendo la fluorescencia. Dado que las sublíneas RPMI/vector, RPMI/Mcl-1, RPMIshNoxaF8 y MM.1S/Mcl-1 expresan también la proteína GFP introducidas en el vector de infección lentiviral como control de estas. En estas células hemos utilizado como sonda alternativa al DiOC<sub>6</sub>(3) el TMRE, una sonda con la misma función pero que emite fluorescencia roja ( $\lambda_{abs}=549$  nm,  $\lambda_{em}=574$  nm).

Cuando la célula ya está en un proceso de apoptosis mas avanzada, se produce la exposición de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa, lo que conduce, en condiciones fisiológicas, a la fagocitosis de la célula apoptótica por los macrófagos. La exposición de fosfatidilserina es, pues, un evento indicador de apoptosis.

Para medir la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, se utilizó Anexina V, una proteína que une específicamente este fosfolípido. Hemos utilizado Anexina V unida tanto a la molécula fluorescente roja PE (ficoeritrina) ( $\lambda_{\text{abs}}=480-565$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=578$  nm), como a la molécula fluorescente verde FITC (isocianato de fluoresceína) ( $\lambda_{\text{abs}}=490$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=514$  nm). El tener dos sondas que emiten a longitudes de onda diferentes, tanto para analizar el potencial de membrana mitocondrial como la exposición de fosfatidilserina, nos permite medir los dos parámetros simultáneamente en una misma célula, combinando estas sondas de forma que no interfieran entre ellas.

Las células ( $3 \times 10^5$ ), control y tratadas, se recogieron en tubos eppendorff y se incubaron en 200  $\mu$ l de una dilución 2 nM de la sonda DiOC<sub>6</sub>(3) en un tampón óptimo para el funcionamiento de la anexina V (Hepes/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) y que llamaremos ABB (Annexin Binding Buffer). Conjuntamente, se añadieron 0.5  $\mu$ l de Anexina V-PE (0.1  $\mu$ g/ml) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y en oscuridad para permitir la entrada de la sonda DiOC<sub>6</sub>(3) a las mitocondrias y la unión de la anexina a la fosfatidilserina en la membrana. Finalmente, las muestras se diluyeron con un volumen variable del tampón ABB (dependiendo del número de células que se tuvieran) y se analizaron en un citómetro de flujo. Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando los programas informáticos Cell Quest y Weasel.

En el caso de las sublíneas modificadas, el protocolo fue exactamente el mismo, pero utilizando TMRE para medir el potencial mitocondrial (25 nM en ABB) y Anexina-V APC o DY634 (1  $\mu$ l) para determinar la exposición de fosfatidilserina. Este mismo protocolo se utilizó para las líneas celulares RPMI ya que estas células unen inespecíficamente la ficoeritrina (PE).

### **3.2.6.- Citometro de flujo**

Durante esta tesis se usaron dos citometros de flujos analizadores. El FACScan BD y el FACSCalibur. Abos citometros cuentan con el laser de 488 nm pero el FACSCalibur cuenta además con el laser de 633 nm, por lo que éste último tiene cuatro canales de detección mientras que FACScan BD solo tres, además del FSC y SSC.

#### **Excitación con el laser de 488 nm.**

FSC Forward Scatter = tamaño celular

SSC Side Scatter = Granulocidad

FL1 Verde (530  $\pm$  15 nm)

DiOC<sub>6</sub>(3), FITC, Alexa488, GFP, YFP, CFSE, Fluo-4.

FL2 Naranja (585  $\pm$  21 nm)

TMRE, R-PE (PE), Cy3, Alexa555, PI.

FL3 Rojo (670 nm)

7AAD, PerCP, PerCP-Cy5.5, RFP

### **Excitación con el laser de 633 nm.**

FL4 Rojo (661 ± 8 nm)

APC, Alexa633, Alexa647, DY634

### **3.2.7.- Análisis del ciclo celular**

Se analizó el efecto del sorafenib en la distribución del ciclo celular, ya que muchas drogas citotóxicas producen parada en el ciclo celular, bien en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, bien en la fase G<sub>2</sub>/M, lo que explica el efecto inhibitor del crecimiento de la mayoría de ellas. Se recogieron 1x10<sup>6</sup> células y se lavaron en 500 µl de PBS. Tras el lavado, las células se fijaron con 1 ml de etanol al 70% preenfriado en hielo. El etanol se añadió gota a gota sobre las células, mezclándolas suavemente con un vórtex para resuspender las células y evitar la formación de agregados. Una vez fijadas, las células se pueden guardar a -20°C hasta su análisis, y de hecho, es aconsejable mantenerlas a esta temperatura al menos 24 horas antes de seguir con el protocolo. Si no se guardaron, se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con 500 µl de PBS, se centrifugaron 10 minutos a 3000 r.p.m. a 4°C y se resuspendieron en 100 µl de la solución de PI/RNasa. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo y los datos se procesaron con el software Modfit.

### **3.3.- Análisis de la expresión de proteínas**

#### **3.3.1.- Materiales y reactivos para análisis de la expresión de proteínas**

##### *3.3.1.1.- Reactivos para la extracción e inmunoprecipitación de proteínas*

Para la obtención de proteínas de extractos celulares totales se utilizaron los siguientes productos: Tritón X-100, Tris/HCl, sacarosa, EDTA, ortovanadato sódico (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), pirofosfato sódico (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), fluoruro de sodio (NaF), leupeptina, β-mercaptoetanol, digitonina, DTT, azul de bromofenol y solución de lisis RIPA, todos ellos proporcionados por Sigma, Madrid, España. El cloruro de sodio (NaCl) y el dodecilsulfato de sodio (SDS) fueron de Merck, y el glicerol, de Scharlau. El cóctel de inhibidores de proteasas procedió de Roche.

##### *3.3.1.2.- Materiales y reactivos para electroforesis de proteínas y transferencia a membranas*

Para la electroforesis de proteínas se emplearon los siguientes productos: 30%

acrilamida/bisacrilamida proporcionada por BioRad, persulfato amónico procedente de Serva (Heilderberg, Alemania). N,N,N,N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) y rojo Ponceau procedentes de Sigma y marcadores de pesos moleculares coloreados Novex® Sharp Pre-stained Standars suministrados por Invitrogen.

En la transferencia de proteínas a membranas se utilizaron: membranas de nitrocelulosa (Hybond C-extra) proporcionadas por GE Healthcare, metanol (grado HPLC) procedente de Panreac y glicina y Tween 20 obtenidos de Sigma.

Para el lavado de las membranas se utilizó NaCl, procedente de Merck y Tris, Tween 20 y timerosal, todos ellos de Sigma.

### 3.3.1.3.- Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos

#### Anticuerpos primarios utilizados en *Western Blot*

Anticuerpo	Tipo, Especie, origen	Dilución	Proveedor
$\alpha$ -tubulina	Mc, ratón, clon B51-2	1/10000	Sigma
$\beta$ -actina	Mc, ratón, clon AG15	1/10000	Sigma
Bcl-xL/S	Pc, conejo, sc-1041	1/500	Santa Cruz
Bcl-xL	Pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Bcl-2	Pc, conejo, sc-783	1/500	Santa Cruz
Beclina 1	Mc, ratón, clon 20/beclin	1/1000	BD Biosciences
Bid	Pc, cabra, AF860	1/250	R&D Systems
Bik	Pc, cabra, sc-1710	1/1000	Santa Cruz
Bim	Pc, conejo, N°Cat.202000	1/1000	Calbiochem
Caspasa 3	Pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Caspasa 3 activa	Pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Caspasa 8	Mc, ratón, clon 5F7	1/500	MBL
Citocromo c	Mc, ratón	1/1000	BD Biosciences
Erk 2	Pc, conejo	1/10000	Santa Cruz
FLIPL/S	Mc, ratón, NF6	1/500	Alexis
FADD	Pc, cabra	1/500	Santa Cruz
LC3-B	Pc, conejo	1/1000	Sigma
Mcl-1	Pc, conejo, sc-819	1/1000	Santa Cruz
Noxa	Mc, ratón, clon 114C307.1	1/250	Abcam
pAkt (s473)	Conejo	1/5000	C.I.C. Salamanca
p4E BP	Conejo	1/2000	Cell Signaling
pErk 1/2	Ratón	1/5000	Santa Cruz
pGsk 3	Conejo	1/2000	Santa Cruz
pMek 1/2	Conejo	1/5000	Santa Cruz
pS6	Conejo	1/20000	Santa Cruz
pStat 3	Mc, Ratón, clon 4/P-STAT3	1/1000	BD Biosciences
pStat 5	Mc, Ratón, clon 47	1/1000	BD Biosciences
Puma	Pc, conejo, N° Cat.4976	1/500	Cell Signaling
Survivina	Pc, conejo, NB500-201	1/2000	Novus
XIAP	Mc, ratón, clon 28	1/250	BD Biosciences

Los anticuerpos secundarios dirigidos contra las IgGs de conejo, ratón o cabra, marcados con fosfatasa alcalina o con peroxidasa, procedieron de Sigma, Madrid, España. Los reactivos utilizados para el revelado por quimioluminiscencia (ECL) fueron Immobilon Western Chemiluminescent HRP/PA Substrate, de Millipore y el film usado para dicho revelado fue Hyperfilm ECL, de GE Healthcare. Los líquidos de revelado y fijado fueron de AGFA.

Relación de los anticuerpos primarios utilizados en **citometría de flujo**.

Anticuerpo	Especie, origen	Concentración ( $\mu\text{l}/10^6$ cél)	Proveedor
Bak	Mc, ratón, clon TC100	3	Calbiochem
Bax	Mc, ratón, clon 6A7	1	BD Biosciences
Citocromo c	Mc, ratón, clon 6H2B4	0.5	BD Biosciences
IgG <sub>2a</sub>	Mc, ratón, N° Cat. MG2a00	3	Invitrogen
IgG <sub>1</sub>	Mc, ratón, N° Cat. MG100	1	Invitrogen
Caspasa 3 activa (FITC)	Pc, conejo	20	BD Biosciences
CD19-PE	Mc, ratón clon H1B19	20	BD Pharmingen
CD38-FITC	Mc, ratón clon HI72	20	BD Pharmingen
CD38-PE Cy5	Mc, ratón, clon HIT2	20	BD Pharmingen
CD38-Tricolor	Mc, ratón, clon HIT2	20	Caltag
CD38-APC	Mc, ratón, clon HIT2	20	Invitrogen
CD45-PE	Mc, ratón clon HI30	20	Caltag
CD45-PECy5	Mc, ratón clon HI30	20	BD Pharmingen
CD45-APC	Mc, ratón clon HI30	20	BD Pharmingen
CD56-FITC	Mc, ratón clon BI59	20	Caltag
CD56-PE	Mc, ratón clon BI59	20	BD Pharmingen
CD56-APC	Mc, ratón clon BI59	20	BD Pharmingen
CD138-FITC	Mc, ratón, clon MI15	20	BD Pharmingen

Los anticuerpos secundarios contra las IgGs de ratón, marcados con Alexa 488, se obtuvieron de Invitrogen.

### 3.3.2.- Métodos para el análisis de proteínas por western blot

#### 3.3.2.1.- Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes

Tras someter a las células a diversos tratamientos, se tomaron  $5 \times 10^6$  células en tubos de fondo cónico y se centrifugaron 5 minutos a 1200 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante, se lavaron con 1 ml de PBS y se transfirieron a tubos eppendorff. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de lisis y se incubaron 30 minutos a 4 °C en baño de hielo. Se utilizaron dos tipos de tampones de lisis:

**Solución de lisis 1x:** Se utilizó para la extracción de proteínas citoplasmáticas. Está compuesto de: Tritón X-100 al 1% (v/v), Tris/HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, ortovanadato

sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM, leupeptina 10 µg/ml, cloruro de sodio 150 mM y glicerol 10 % (v/v).

**Solución de lisis RIPA:** Se utilizó para extraer mejor todas las proteínas de la célula, incluidas las mitocondriales y las nucleares. Está compuesto de: Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Igepal CA-630 (NP-40) 1%, deoxicolato de sodio 0.5% y SDS 0.1%.

Se utilizó una solución u otra dependiendo de la localización celular de la o las proteínas a detectar.

Los tubos se centrifugaron 5 min a 12000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorff, donde se añadieron además 50 µl de un tampón de carga concentrado 3x, con la siguiente composición: Tris/HCl 150 mM pH 7.4, SDS 3%, molibdato de sodio 0.3 mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30 mM, glicerol 30 % (v/v), β-mercaptoetanol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0.06% (p/v).

Finalmente los lisados celulares se calentaron a 100 °C en un baño seco (Selecta) durante 5 min y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

### 3.3.2.2.- *Inmunoprecipitación de proteínas*

Esta técnica se utilizó para detectar proteínas que se encontraban a concentraciones muy bajas y específicamente para Erk5 y pAkt. Se partió de  $8 \times 10^6$  células, las cuales fueron lavadas con PBS y lisadas con tampón de lisis frío (140 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.0, 10 mM EDTA, 10% glicerol; 1% Tritón X-100, 10 µM pepstatina, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 1mM PMSF, 25 mM β-glicerofosfato, 10 mM fluoruro de sodio y 1 mM ortovanadato de sodio). Las células lisadas fueron centrifugadas (10,000 x g, 10 minutos) y Erk5 y fosfo-Akt fueron inmunoprecipitados del sobrenadante (1 mg de proteínas determinada por el ensayo de Bradford) mediante anticuerpos contra estas proteínas los cuales se incubaron a 4°C overnight. Posteriormente se adicione proteína A-Sepharose. Los inmunocomplejos fueron recuperados por centrifugación y lavados 3 veces con 1 mL del tampón de lisis frío. Finalmente fueron analizados por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y *western blotting*.

### 3.3.2.3.- *Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS*

La separación de proteínas celulares en función de su peso molecular se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS al 0.1%. El porcentaje de poliacrilamida varió entre el 10 y el 15%, dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar. Las electroforesis se realizaron en cubetas de electroforesis de BioRad o Hoefer miniVE, GE Healthcare. Las muestras de lisados se calentaron a 100°C durante 5 minutos, se centrifugaron (30 segundos, 10000 r.p.m) y se cargaron en los pocillos del gel (10 µl / pocillo). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 150 V durante ~ 2 horas.



### 3.3.2.4.- *Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF*

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF según un método previamente descrito (Talanian et al. 1997), utilizando un tampón de transferencia compuesto de: Tris/HCl 48 mM pH 8.3, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20 % (v/v), de calidad HPLC. La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca de BIO-RAD a 20 V y 400 mA durante 55 minutos. La eficacia de la transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo Ponceau.

### 3.3.2.5.- *Análisis de proteínas por inmunotransferencia y detección de los inmunocomplejos*

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de nitrocelulosa se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos, y los pesos moleculares relativos de las proteínas detectadas, se calcularon en relación a los marcadores de pesos moleculares estándar coloreados Novex® (7µl/pocillo). Tras la tinción con rojo Ponceau, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Una vez bloqueada, se lavó 3 veces durante 5 min con una solución de lavado que contenía: NaCl 0.12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8.0, Tween 20 0.1 % (p/v) y timerosal (0.1 g/L) en PBS pH 7.4 (denominada tampón B). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario específico (diluido en tampón B, con un 2% de leche desnatada en polvo) para detectar la proteína deseada. Las diluciones y el tiempo de incubación se determinaron en cada caso dependiendo del anticuerpo utilizado. Finalizada la incubación, la membrana se lavó abundantemente (3 veces durante 5 min mediante agitación moderada en tampón B) y se incubó esta vez con un anticuerpo secundario (diluido en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. La concentración utilizada del segundo anticuerpo (marcado con fosfatasa alcalina o con peroxidasa) fue de 0.2 µg/ml en todos los casos. Finalizada la incubación, se retiró la solución de anticuerpo y se lavó la membrana 3 veces durante 5 min agitando moderadamente con tampón B.

Quimioluminiscencia (ECL): está basada en la detección de luz emitida tras la oxidación de un sustrato quimioluminiscente. El anticuerpo secundario puede estar marcado con HRP (peroxidasa de rábano) o con PA (fosfatasa alcalina). La membrana se incubó durante un tiempo determinado con el sustrato para la HRP (en este caso el sustrato fue luminol), bien para la PA (el sustrato fue el dioxetano modificado CPS-Star). Dichas enzimas catalizaron la reacción de oxidación del sustrato, que emite luz al volver a su estado original. Esta luz es captada por películas de tipo radiográfico que posteriormente se revelan en un cuarto oscuro.

Después de las incubaciones con los anticuerpos y de haber lavado correctamente para evitar la aparición de fondo oscuro, la membrana se incubó, bien con una solución de luminol Immobilon Western Reagent (Millipore) durante 90 segundos, bien con una solución de sustrato

CPS-Star quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore) durante 5 minutos.

Tras la incubación, la membrana se transfirió a una funda de plástico transparente encajada dentro de un cassette de revelado radiológico y se eliminó por presión el exceso de la mezcla de revelado. En un cuarto oscuro con iluminación para revelado fotográfico, se situó una película radiográfica Hyperfilm ECL sobre la funda que contenía la membrana y se expuso durante un tiempo determinado, que varió dependiendo del anticuerpo utilizado entre 10 segundos y 15 minutos. La película radiográfica se reveló acto seguido mediante inmersión seriada en revelador, agua destilada y fijador. La preparación de estos líquidos se realizó según las instrucciones del fabricante. El tiempo de revelado dependió del anticuerpo usado. Tras el revelado las películas radiográficas se secaron al aire, se digitalizaron y se almacenaron en bolsas de plástico selladas.

### **3.3.3.- Análisis de la expresión de proteínas por citometría**

#### *3.3.3.1.- Cambio conformacional de Bak y Bax*

Para analizar el cambio conformacional de Bax y Bak se tomaron  $2 \times 10^5$  células control y tratadas, se lavaron con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% en PBS y se fijaron 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, las muestras se lavaron en 1 ml de PBS y se resuspendieron en 95  $\mu$ l de saponina al 0.1% en PBS. Se añadieron 5  $\mu$ l de suero de cabra y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo primario adecuado en función de la proteína a analizar: 1  $\mu$ l anti-Bax ó 3  $\mu$ l anti-Bak. Como control se utilizaron los isotipos correspondientes a cada uno de los anticuerpos: 3  $\mu$ l de IgG<sub>2a</sub> (isotipo de Bak) y 1  $\mu$ l de IgG<sub>1</sub> (isotipo de Bax). Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 95  $\mu$ l de saponina 0.1 % en PBS con 5 % de suero de cabra. Se añadieron 0.4  $\mu$ l de anticuerpo Alexa 488 hecho en ratón como anticuerpo secundario y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente las muestras se lavaron con 1 ml de saponina 0.03 % en PBS, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS y se analizaron en el citómetro de flujo.

#### *3.3.3.2.- Determinación de caspasa 3 activa*

Se tomaron  $3 \times 10^5$  células, control y tratadas, se lavaron con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% en PBS y se incubaron 15 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (30 segundos, 10000 r.p.m.), se lavaron con 1 ml de PBS, y se resuspendieron en 95  $\mu$ l de saponina 0.1% a los que se añadieron 5  $\mu$ l de suero de cabra y 6  $\mu$ l de anti-caspasa 3 activa-FITC. La incubación se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras la cual las muestras se centrifugaron, se lavaron con saponina 0.03% y finalmente se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS y se analizaron en el citómetro de flujo.

### 3.3.3.2.- *Determinación de Citocromo c*

Para detectar la salida del citocromo c de la mitocondria se tomaron  $1 \times 10^6$  células las cuales fueron permeabilizadas transitoriamente con digitonina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS con KCl 100 nM durante 5 minutos en hielo. Seguidamente las muestras se diluyeron con 1 mL de PBS frío y se centrifugaron a 5.500 rpm a 4 °C durante 3 minutos. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se incubaron 20 minutos a 4°C tras lo cual se lavaron con PBS, se centrifugaron durante 3 minutos a 5.500 rpm a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de tampón de bloqueo (albumina sérica bovina al 3% y saponina al 0.05% en PBS) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió 0.5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo contra citocromo c y se incubó durante toda la noche a 4 °C con agitación. Al día siguiente, se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de tampón de bloqueo que contenía una dilución 1/1000 de un anticuerpos secundarios contra las IgGs de ratón, marcados con Alexa 488. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se diluyó en PBS y se analizó por citometría de flujo.

### 3.3.4.- **Análisis de la localización de proteínas por microscopía de fluorescencia**

Esta técnica se empleó para determinar la localización de las proteínas tras el tratamiento con fármacos inductores de apoptosis y/o autofagia. En el mismo marcaje se pudo visualizar la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, indicadores de apoptosis, utilizando la sonda Hoechst 33342.

Inicialmente se prepararon cubreobjetos cubiertos de polilisina según el siguiente protocolo: Se cogieron cubreobjetos redondos de  $\Phi 13$  mm, se lavaron en etanol y se dejaron secar al aire. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de una solución 0.1% (p/v) de poli-L-Lys en  $\text{H}_2\text{O}$  sobre una de las caras los cubres y se incubaron 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución con una micropipeta y se lavaron los cubres con agua milli Q. Una vez secos, se esterilizaron por irradiación con luz UV (254 nm) durante 15 minutos.

Se tomaron  $5 \times 10^5$  células, control y tratadas y se centrifugaron 5 minutos a 1200 r.p.m., tras lo cual se lavaron en 1 ml de PBS y se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. En una placa de 24 pocillos se añadieron cubres de poli-L-Lys con la cara tratada hacia arriba y sobre ellos las células fijadas. Las placas se centrifugaron 5 minutos a 1200 r.p.m., para facilitar la adhesión de las células a las cubres. Se eliminó el paraformaldehído de los pocillos por aspiración y se lavaron con 1 ml de PBS por pocillo. Como en todos los casos estudiados la proteína que se analizó estaba fusionada con otra proteína fluorescente, no se necesitó realizar marcaje con anticuerpos

Se preparó una solución de Hoechst 33342 diluido en Mowiol a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Una vez los cubres estuvieron secos, en un portaobjetos se colocaron tantas gotas de la

solución de Mowiol como cubres. Los cubres se montaron, con la cara tratada hacia abajo, sobre la solución de Mowiol. Finalmente, se dejaron secar, y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia (E600/E400, Nikon) provisto de un equipo de fotografía digital (DXM1200F, Nikon) y se analizaron con el programa de fotografía Nikon ACT-1.

### **3.3.5.- Marcaje de antígenos de superficie**

Se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS o ABB, si también se iba a realizar un marcaje con anexina, y 0.2 % de albúmina bovina. Se adicionaron 4  $\mu$ L del anticuerpo contra el antígeno que se deseara detectar. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron y se resuspendieron en 500  $\mu$ L para analizarlas por citometría de flujo. Los anticuerpos usados fueron contra CD138, CD38, CD45, CD56, CD19 o CD20. Se detectaron hasta 4 antígenos de superficie diferente combinándolos de forma que el fluorocromos al que estaban conjugados tuviera un espectro de emisión que permitiera su análisis.

## **3.4.- Transfecciones transitorias**

### **3.4.1.- Materiales y reactivos usados en las transfecciones transitorias**

El electroporador (Nucleofector®) y las cubetas de transfección fueron proporcionados por Lonza (USA). La solución de transfección Myrus® fue de Bionova, España. Los oligos utilizados, todos ellos sintetizados por Dharmacon (Lafayette, USA), fueron los siguientes:

Bim-siRNA: 5'-GACCGAGAAGGUAGACAAUUG-3'

Bcl-x-siRNA: ON-TARGETplus SMARTpool BCL2L1

Beclin-siRNA: ON-TARGETplus SMARTpool BECN1

Puma-siRNA: 5'-GCCTGTAAGATACTGTATA-3'

Lamin A/C-siRNA: 5'-CTGGACTTCCAGAAGAACA-3' (control negativo).

### **3.4.2.- Transfección mediante electroporación con Nucleofector®**

Esta técnica se realizó con un equipo denominado Nucleofector® y se ha empleado para silenciar genes de forma transitoria empleando RNAs de interferencia (small interference RNA o siRNA).

La interferencia por iRNA consiste en el silenciamiento postranscripcional de un gen mediante el empleo de dúplex de RNA de entre 21-23 nucleótidos y extremos 3' protuberantes,

llamados siRNAs, cuya secuencia es homóloga a parte de la secuencia del gen que se quiere silenciar. Estos siRNAs forman complejos con un grupo de proteínas llamadas DICER dando lugar al complejo denominado RISC (complejo RNA multiprotéico inductor del silenciamiento). Este complejo se une al mRNA complementario a la secuencia de los oligonucleótidos sintéticos de RNA y lo destruye ocasionando el silenciamiento de la proteína codificada por dicho mRNA.

Para que la transfección sea óptima, las células deben estar en la fase exponencial de crecimiento. Por ello, las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  cél/ml el día anterior a la transfección. Se tomaron  $2 \times 10^6$  células por punto experimental, se centrifugaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la solución de transfección Myrus®. Se añadió el siRNA a una concentración final de 20 nM y la mezcla se depositó en el interior de una cubeta de transfección.

Para cada tipo celular se utilizó un programa distinto, según las indicaciones del fabricante. Así, para la línea celular MM.1S se utilizó el programa O-23, mientras que para la línea U266, fue el X-005 y para las RPMI 8226 y sus sublíneas se empleó el programa G-16. Se realizó el pulso electromagnético y posteriormente se trasvasaron las células a una placa de 6 pocillos con medio RPMI completo previamente atemperado. Tras 24 horas, parte de las células se destinaron a comprobar, mediante Western Blot, la eficacia del silenciamiento. El resto se incubaron con la droga sobre cuyo efecto nos interesa conocer el papel desempeñado por la proteína que hemos silenciado.

### **3.5.-Análisis de RNA**

#### **3.5.1.- Reactivos utilizados en el análisis de RNA**

##### *3.5.1.1.- Reactivos utilizados en la extracción y cuantificación de RNA total*

Para la obtención de RNA total de las células se utilizaron conjuntamente el kit de extracción RNeasy Mini Kit y las columnas QIAshredder de Qiagen (Izasa, España). Para cuantificar el RNA obtenido se utilizó el espectrofotómetro NanoVue de GE Healthcare.

##### *3.5.1.2.- Reactivos para la retro-transcripción de RNA (RT-PCR)*

Todos los reactivos utilizados, Oligo (dT), DTT, First Strand Buffer (5X), RNase OUT, SuperSCRIPT II, dATP, dGTP, dTTP, dCTP, Buffer 10x,  $MgCl_2$  50 mM y Taq DNA polimerasa fueron de Invitrogen.

##### *3.5.1.3.- Reactivos usados para el análisis de mRNA mediante RT-MLPA*

Los niveles de mRNA de varias proteínas implicadas en la apoptosis se analizaron

simultáneamente mediante la técnica de RT-MLPA (Retro-Transcription Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) utilizando el conjunto de reactivos incluidos en el SALSA MLPA KIT R011, suministrado por MCR-Holland (Ámsterdam, Holanda). La transcriptasa reversa utilizada fue la M-MLV de Promega (Madrid, España). El agua usada durante el proceso fue tratada con Dietilpirocarbamato (DEPC), procedente de Sigma y autoclavada posteriormente para garantizar la inhibición de RNAsas.

### *3.5.1.4.- Reactivos utilizados en el análisis de RNA a tiempo real (Real Time PCR)*

Se utilizaron placas de 96 pocillos "Fast Optical 96-well reaction plate with Bacorde", coberturas adhesivas para cerrar las placas de 96 pocillos, Master Mix y TaqMan® Gene Expression Assay, todos ellos de Applied Biosystem.

La reacción se llevó a cabo en el termociclador StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) amablemente cedido por el Dr. Carlos Martín (Grupo de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza).

### *3.5.1.5.- Productos utilizados para la electroforesis de DNA en gel de agarosa*

El TRIS-borato y el EDTA (tampón TBE) fueron de Sigma, la agarosa, de Scharlau, el tampón de carga 6x procedió de Promega, SYBR® Safe DNA gel stain (10.000x) fue proporcionado por Invitrogen y el marcador de pesos moleculares 100 pbLadder fue de Biotools. La visualización de los geles se llevó a cabo con un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad) y se analizó mediante el programa Bio-Rad Multi-Analyst (PC versión 1.1).

## **3.5.2.-Métodos utilizados en el análisis de RNA**

### *3.5.2.1.- Extracción y cuantificación de RNA total*

Las células ( $5-10 \times 10^6$  células) se trataron con las drogas correspondientes y posteriormente se aisló el RNA con el Kit Rneasy de Quiagen, usando las columnas QIAshredder tras la lisis de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se cuantificó y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior. Como parámetros de la calidad del RNA obtenido se tuvo en cuenta la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ , que indicó contaminación proteica, estando la misma siempre en valores próximos a 2 (debe encontrarse entre 1,9 - 2,1) y la relación entre las absorbancias a 260 y 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ), que indica contaminación por solventes orgánicos, que estuvo siempre en valores superiores a 1,8.

### 3.5.2.2.- *Retrotranscripción del RNA a cDNA (RT)*

Esta técnica se utilizó para obtener cDNA para analizar las variaciones que se producen en el mRNA correspondiente a una proteína determinada tras los diversos tratamientos realizados con los fármacos de estudio. Puesto que la enzima utilizada en las PCR amplifica sólo DNA, una vez se obtuvo el RNA total de las células, hubo que realizar una retrotranscripción (RT) para pasar el mRNA a cDNA.

#### Retrotranscripción (RT)

Los reactivos que se añadieron a cada muestra fueron:

- 1 µl de Oligo (dT)
- 1 µl de dNTP (10mM) (dNTP contiene los nucleótidos ATP, GTP, CTP y TTP en la misma proporción)
- 4 µl First Strand Buffer (5X)
- 2 µl de DTT
- 2 µl RNase OUT
- 1 µl de SuperSCRIPT II RT (SS II).
- 1 µg de RNA

Se completó hasta 20µl con agua libre de RNasa.

La eficiencia de la SS II es tal que todo el mRNA pasó a cDNA. Tras la mezcla de todos los componentes se realizó la RT en el termociclador. El programa fue el siguiente: *25° C durante 10 minutos, 42° C durante 50 minutos y 70° C durante 15 minutos.*

Una vez finalizada la RT, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso. Es conveniente, no obstante, no guardarlo durante largos períodos de tiempo, ya que acaba degradándose.

### 3.5.2.3.- *Análisis de la expresión de RNA por RT-MLPA*

La técnica RT-MLPA consistió en realizar una cuantificación relativa de distintos RNAs mensajeros simultáneamente, utilizando controles internos de referencia y muestras control que, en nuestro caso, fueron las células sin tratar.

Las muestras de RNA obtenidas de las células sometidas a los diversos tratamientos se procesaron según el protocolo de MCR-Holland (Ámsterdam, Holanda) con el kit SALSA MLPA R011, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad mínima de RNA necesaria para este método fue de 20 ng, aunque la mayoría de ensayos se llevaron a cabo con cantidades de entre 50-200 ng.

Existen distintos kits comerciales que contienen diferentes grupos de sondas según el proceso celular a estudiar. En nuestro caso, se detectaron 42 genes relacionados con la apoptosis. El gen de referencia interno fue el mRNA correspondiente a la glucuronidasa (GUS).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador y constó de cuatro etapas, que se desarrollaron siguiendo las instrucciones del fabricante:

a) Retrotranscripción.

1 minuto a 80°C

5 minutos a 45°C

15 minutos a 25°C

15 minutos a 37°C

2 minutos a 98°C

b) Hibridación.

15 minutos a 25°C

1 minuto a 95°C

16 horas a 60°C

c) Ligación.

25 minutos a 54°C

5 minutos a 98°C

4°C

d) Amplificación.

2 minutos a 95°C

30 segundos a 95°C

30 segundos a 60°C

1 minuto a 72°C

20 minutos a 72°C

4°C

Al finalizar la reacción, los tubos se mantuvieron a 4°C hasta que se procesaron con el secuenciador capilar 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Una vez procesadas las muestras, los datos obtenidos se analizaron con el programa PeakScanner, de Applied Biosystems.

### *3.5.2.4.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa*

Se preparó el gel de agarosa al 1% disolviendo la agarosa en 30 ml de TBE 1X mediante hervido. Esta mezcla fue vertida en unos moldes para su gelificación. Previamente a ésta, se añadió SYBR a la agarosa (a una concentración 1/10000) para teñir el DNA y poder



visualizarlo. A la muestra de DNA se le añadió el tampón de carga coloreado para poder conocer en todo momento la posición del frente de la muestra. Para estimar el peso de los fragmentos se utilizaron los marcadores de los pesos moleculares. La elección del marcador se basó en el tamaño del DNA de trabajo y en si se quiso cuantificar la muestra o simplemente analizarla. En nuestro caso, se utilizó el marcador 100 pb DNA Ladder, con el que sólo se pudo realizar un análisis cualitativo.

La electroforesis se realizó a 90V, 400mA durante 30 minutos. Se visualizó en el transiluminador y se analizó el resultado mediante el programa informático Bio-Rad Multi-Analyst (PC versión 1.1).

### 3.5.2.5.- *Análisis de RNA mediante PCR en tiempo real (Real Time PCR)*

La PCR a tiempo real se utiliza para cuantificar el DNA. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de DNA, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una DNA polimerasa termoestable. A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda adecuada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación, de ahí el nombre de PCR a tiempo real.

En la técnica de PCR se pueden utilizar fluoróforos no específicos o sondas moleculares dependientes de la secuencia:

En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de DNA de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente a aquél. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green que, excitado mediante luz azul ( $\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$ ) emite luz verde ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ). Posee la ventaja de requerir sólo un par de cebadores para efectuar la amplificación, lo que abarata su coste; sin embargo, sólo es posible amplificar un producto en cada reacción.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Un tipo de sondas específicas son las sondas TaqMan, que permiten medir la generación de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero, debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. Fluorescencia que es detectada por el

equipo y que está relacionada con la cantidad de amplicón producido.

La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en DNA empleando una curva de calibrado; para este enfoque es vital que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado posean una misma eficiencia de amplificación. En el segundo caso, se expresa el cambio en los niveles de expresión de RNA mensajero (mRNA) interpretado como DNA complementario (cDNA, generado por retrotranscripción del mRNA); esta cuantificación relativa es más fácil de realizar, puesto que no requiere curva de calibrado, y se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar *versus* un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizador o, en inglés, *housekeeping gene*).

### 3.5.2.5.- Desarrollo de la PCR cuantitativa

En nuestro caso, se utilizó, como molde de la reacción, el cDNA obtenido previamente mediante retrotranscripción de mRNA (acápites 3.5.2.2). Para detectar la fluorescencia se utilizaron las sondas específicas TaqMan.

Llevamos a cabo una cuantificación relativa, utilizando  $\beta$ -glucuronidasa como gen interno de referencia. Para poder cuantificar, se emplearon rectas patrón compuestas de las células control, es decir, sin el tratamiento con la droga. Del cDNA se realizaron diluciones seriadas del cDNA usándose las siguientes concentraciones referidas a la cantidad total de cDNA: 500ng, 50ng, 5ng y 0,5 ng para algunos casos. Para otros se partió de 100ng de cDNA realizándose las mismas diluciones.

Para todas las sondas analizadas se realizó una recta patrón para la sonda problema y para la glucuronidasa. De cada muestra se realizaron triplicados para cada punto, tanto para la sonda problema como para el control endógeno. Como control negativo se usó una muestra de agua libre de RNAsas y también se realizaron triplicados. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems), para cada muestra se preparó la siguiente mezcla:

10 $\mu$ l de Master Mix.

1 $\mu$ l de Sonda Taqman.

Se preparó una mezcla común teniendo en cuenta el número de muestras y se dispensó 11  $\mu$ l de mezcla por muestra. Tras esto se añadió en cada pocillo 4  $\mu$ l de muestra y 5  $\mu$ l de agua libre de RNAsas. La relación de sondas empleadas fue la siguiente:

TaqMan® Gene Expression Assay	Secuencia	Referencia
Bim		(Hs00375807_m1)
Puma		(Hs00248075_m1)
Glucuronidasa	TGACTGAACAGTCACCGACGAGAGT	Hs99999908_m1

Como soporte se emplearon las placas de 96 pocillos y se sellaron para la reacción con coberturas adhesivas.

La PCR se llevó a cabo según las condiciones del fabricante:

10 minutos a 95°C

15 segundos a 95°C

1 minuto a 60°C

} 40 ciclos

La reacción se llevó a cabo en el termociclador StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) amablemente cedido por el Dr. Carlos Martín (Grupo de Genética de Micobacterias, Universidad de Zaragoza).

### **3.6- Obtención y análisis de células obtenidas a partir de muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple**

#### **3.6.1.- Obtención de células plasmáticas a partir de aspirados de médula ósea**

Se obtuvieron células plasmáticas mielomatosas (MMs) a partir de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Las muestras fueron proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Zaragoza.

La muestra de partida consistió en 0.5-1 ml de aspirado de médula ósea obtenido por punción en la cresta ilíaca. En gran parte de las muestras existía contaminación con restos de tejido del estroma medular. Por ello, para evitar posibles conglomerados de granulocitos y otras células que impidieran la total extracción de las células mielomatosas, se realizaron dos extracciones con Ficoll-Paque para cada muestra. En cada extracción un volumen concreto de la muestra diluida en medio RPMI completo se añadió sobre el mismo volumen de Ficoll-Paque. La adición se realizó de forma lenta, evitando la mezcla de las dos fases. Se centrifugaron los tubos a 1400 r.p.m. sin freno durante 20 minutos. Los anillos de células mononucleadas (linfocitos T, linfocitos B, monolitos, células plasmáticas normales, células mielomatosas, células del estroma de la médula, etc.) se aspiraron con una pipeta Pasteur y se trasvasaron a un tubo que contenía 10 ml de medio RPMI completo. Se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3-5 ml de medio RPMI completo. Se realizó el conteo de las células y se determinaron la viabilidad y la densidad celular.

Una parte de las células se reservaron para realizar el inmunofenotipo (*ver apartado 3.6.2*) y el resto se sembraron a densidad de  $5 \times 10^6$  cél/ml en medio RPMI completo para evaluar su sensibilidad a diferentes drogas citotóxicas.

Para mejorar la supervivencia *in vitro* de las células mielomatosas, se añadió 1000 U/ml de interleuquina-6 (IL-6), una citoquina muy importante como factor de crecimiento para las

células de MM.

### **3.6.2.- Inmunofenotipado y marcaje de células plasmáticas**

Una característica importante de las células de MM es su heterogeneidad, sobre todo en cuanto a marcadores de membrana. Estos marcadores son muy útiles para distinguir células mielomatosas (MMs) de células plasmáticas normales (PCs) y de linfocitos sanos, presentes en la población heterogénea de células mononucleares de médula ósea obtenida con el método anterior.

Para realizar el inmunofenotipado, se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100  $\mu$ l de ABB con 0.2 % de albúmina bovina y la suspensión se dividió en dos tubos eppendorfs; a uno se le añadió la mezcla de anticuerpos A y al otro, la mezcla B:

MezclaA : 4  $\mu$ l CD-138-FITC/ 4  $\mu$ l CD-56-PE/ 4 $\mu$ l CD 45-PECy5/ 4  $\mu$ l CD38-APC

Mezcla B: 4  $\mu$ l anexina-FITC/ 4  $\mu$ l 7-AAD/ 4  $\mu$ l CD38-APC

Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron con ABB y se diluyeron hasta 1 ml con ABB y se analizaron en el citómetro de flujo usando un protocolo de 4 colores específicamente diseñado para este fin.

Para evaluar la toxicidad de distintas drogas sobre la mezcla de células, se tomaron  $2 \times 10^5$  células por punto, se centrifugaron y se lavaron con ABB. Se resuspendieron en 100  $\mu$ l de ABB + 0.2% albúmina bovina y se añadió la mezcla B; se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La suspensión se centrifugó y se resuspendió en 500  $\mu$ l de ABB y se analizó por citometría de flujo.

### **3.6.3.- Separación de poblaciones celulares mediante MACS (separación celular basada en campos magnéticos)**

En la realización de algunos experimentos se ha partido de muestras de pacientes, de la cual nos interesaba estudiar sólo la población de células mielomatosas CD138<sup>+</sup>. Para hacer esto, se han separado las células de interés mediante anticuerpos anti CD138 unidos a microesferas metálicas y posterior selección positiva en columnas colocadas en el interior de un campo magnético (Miltenyi Biotec, Alemania).

Para ello, se resuspenden las células en PBS suplementado con 0,5% de BSA o SFB y 2 mM de EDTA (tampón MACS) en una proporción de 80  $\mu$ l de tampón MACS por cada  $1 \times 10^6$  células. Posteriormente, se añadió 20  $\mu$ l del anticuerpo conjugado con microesferas metálicas, se incubó 15 minutos a 4°C y se lavó con tampón MACS. A continuación, se procedió a la separación en columnas de tipo LS (Miltenyi), según las instrucciones del fabricante. Existen dos tipos de separaciones, positiva y negativa. En la positiva, se añade directamente el anticuerpo conjugado que reconoce las células que se quieren separar, por lo que obtenemos

las células que nos interesan unidas al anticuerpo. También se puede realizar la separación negativa, que consiste en añadir anticuerpos unidos a las microesferas, que reconocen todas las poblaciones presentes en la mezcla excepto la que se quiere obtener. Salvo que se indique lo contrario, en todos los casos se utilizó la separación positiva.

### **3.7.-Sobreexpresión mediante infecciones retrovirales**

Esta técnica se ha empleado para obtener células que sobreexpresen un gen de forma estable. Consiste en la generación de retrovirus capaces de integrar parte de su genoma en los cromosomas eucariotas. El gen exógeno introducido en el genoma del virus se inserta en el DNA de las células eucariotas y tras un clonaje por dilución límite, se obtienen líneas celulares estables que sobreexpresan el gen de interés. Se emplearon los vectores, pBave-mRFP-LC3 construido en nuestro laboratorio por Marta Pérez y la construcción MMP-1-AU1-BclXL amablemente cedida por el Dr. X. Pimentel-Muñíos (CIC Salamanca).

#### **3.7.1.-Generación de los retrovirus**

Se empleó la línea celular 293T como células empaquetadoras (ver apartado 3.1) y además de los plásmidos que contienen las secuencias para modificar las células se emplearon dos plásmidos más:

-pMDG-VSV: Contiene las secuencias que codifican para las proteínas de envuelta del virus).

-pNVUL-MLV-gag-pol (que contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la cápside vírica y la retrotranscriptasa del virus).

El protocolo seguido (Carvajal-Vergara et al., 2005) consistió en sembrar las células 293T ( $1,8 \times 10^6$ ) en 3 ml de DMEM completo en placas de 60 mm. Tras 24 horas se añadió a cada placa 1  $\mu$ l de cloroquina 25  $\mu$ M y se agitaron las placas suavemente.

Se prepararon las mezclas de transfección (1 ml) con los siguientes componentes:

2.5  $\mu$ g de plásmido con el inserto.

2.5  $\mu$ g de pMDG.2.

5 $\mu$ g de pNVUL-MLV-gag-pol.

61  $\mu$ l de Ca Cl<sub>2</sub> 2M (Merk).

500  $\mu$ l de HBS 2X (NaCl 274 mM, Merck; Hepes 50 mM, Sigma; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, Merck; pH 7).

Hasta 1 ml de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril.

Se mezcló todo mediante burbujeo durante 15 segundos con una pipeta Pasteur provista de filtro. Se dispensó gota a gota cada mezcla sobre su correspondiente placa, se agitaron las placas suavemente y se mantuvieron en cultivo durante al menos 6 horas. Transcurrido este

tiempo se substituyó el medio de transfección por 4 ml de OptiMEM (Gibco™, Invitrogen). Tras 48 horas más en cultivo se recogieron los 4 ml de sobrenadante que contenían los virus y se filtró mediante filtros de 0,22 µm (Pall Corporation, USA) para eliminar los restos celulares de 293T. La eficiencia de la transfección se comprobó mediante análisis por microscopía de fluorescencia de la expresión de RFP o por *Western blot*.

### **3.7.2.-Infección de células eucariotas con retrovirus**

Para cada infección se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células de la línea correspondiente en el sobrenadante lentiviral. Se centrifugaron durante 2 horas a 1500 r.p.m y a 37°C. Se añadió a cada infección una concentración final de 6 µg/ml de polibreno (Sigma) para incrementar la eficiencia de infección de los lentivirus. Tras la centrifugación se resuspendieron las células en medio completo y se incubaron 48 horas. Transcurrido este tiempo se analizó la eficiencia de la infección mediante análisis por microscopía de fluorescencia de la expresión de RFP y se realizó la selección clonal por dilución límite según se indica en el siguiente apartado. Todo el material utilizado hasta aquí se autoclavó para eliminar los posibles restos de virus.

### **3.7.3.-Obtención de líneas estables mediante clonaje por dilución límite**

Para obtener líneas estables homogéneas en su nivel de sobreexpresión se procedió a la selección de clones mediante dilución límite. Previamente se preparó medio acondicionado (medio completo de un cultivo de la misma línea celular tras 24 horas, centrifugado y filtrado) para cada una de las líneas modificadas. En 30 mL de medio acondicionado se resuspendieron y se sembraron 150 células, en placas de 96 pocillos de fondo redondo (100 µl/pocillo). De este modo se logra que en alguno de los pocillos sólo haya sido sembrada una célula, que podrá dividirse gracias a las citoquinas y factores de crecimiento presentes en el medio acondicionado. Se mantuvieron en cultivo las placas durante tres semanas. Posteriormente se seleccionaron los pocillos en los que había células fluorescentes, analizadas en el microscopio óptico de fluorescencia (Nikon, TE300/TE200). A los clones seleccionados se les añadió unos 100 µL de medio completo (10% SFB) y aquellos que proliferaron se sembraron en placas de 24 pocillos con 500-1000 µl de medio completo. Aquellos que continuaron proliferando se sembraron en placas de seis pocillos y posteriormente en frascos de cultivo T25 o T75 (TPP). En el caso de la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub>, el plásmido no tenía incorporado ningún gen de proteína fluorescente, por lo que se analizaron por western blot todos los clones obtenidos.

Una vez que se obtuvo cantidad suficiente de los cultivos se analizó el porcentaje e intensidad de fluorescencia de cada clon por citometría de flujo. Se seleccionaron aquellos clones que presentaban mayor intensidad de fluorescencia y se analizó mediante Western Blot la expresión de la proteína sobreexpresada. Aquellos clones que presentaban mayor nivel de modificación se expandieron y se utilizaron en los experimentos de inducción de apoptosis con drogas antitumorales.

### 3.8.- Desarrollo tumoral en ratones

En ratones machos Nude de 8-9 semanas de edad se inyectaron subcutáneamente  $1 \times 10^6$  células NCI-H929, recogidas en fase exponencial de crecimiento, en 100  $\mu$ l de matrigel de Sigma. Posteriormente se analizó el desarrollo del tumor mediante la medición del tumor diaria con un calibre de precisión. Para calcular el volumen del tumor, se midió el ancho (A), largo (L) y alto (T) del tumor y se aplicó la siguiente fórmula:

$$V = \frac{4}{3} \pi \times \left( \frac{A \times L \times T}{2} \right)$$

Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm<sup>3</sup>, se dividieron aleatoriamente en dos grupos (control y tratados) y diariamente durante los siguientes 15 días se les administro vehículo o sorafenib (80 mg/kg de peso). Los ratones se sacrificaron 15 días posteriores a la finalización del tratamiento o cuando el tumor alcanzó 1 cm<sup>3</sup> de tamaño.

### 3.9.- Análisis de células madres tumorales de mieloma múltiple

Los datos en la bibliografía son, hasta la fecha, contradictorios en cuanto a que fenotipo deben tener las células madre tumorales de mieloma múltiple. Según diferentes trabajos podrían ser las células CD138 negativas o las células aldefluor positivas. Para las células CD138 negativas se siguieron los mismos protocolos ya descritos para el marcaje (acápites 3.3.5) y separación (acápites 3.7) pero, en este último caso, realizando una separación negativa, es decir quedándonos con la población no unida al anticuerpo y por tanto, no retenida en la columna.

#### 3.9.1.- Marcaje con la sonda aldefluor

Para esto se uso el Kit de aldefluor de STEMCELL Technologies Inc. Éste sistema se basa en un método no inmunológico para identificar células madres y progenitoras humanas en base a su actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH). Ya que se ha descrito una mayor expresión de esta enzima en las células madre con respecto a las células normales. Las células que expresan altos niveles de esta enzima pueden ser detectadas y aisladas mediante citometría de flujo. Este método ofrece una alternativa a los métodos tradicionales de identificación de células madre mediante antígenos de superficie.

Este kit consta de un tampón (TA) que es utilizado para la resuspensión de las células durante el marcaje y para los lavados necesarios, un reactivo llamado DEAB, el cual es un inhibidor de la ALDH y la sonda Aldefluor la cual es sustrato de la ALDH generando una sonda fluorescente que es detectada por citometría de flujo.

Se tomaron  $1 \times 10^6$  células, se lavaron y se resuspendieron en 1 mL del tampón proporcionado por el Kit (TA). Simultáneamente se tomó otro tubo al que se le adicionó 5  $\mu$ L del

reactivo DEAB y se rotuló como control. A la suspensión de células se le adicionó 5  $\mu$ L de reactivo aldefluor, se mezcló rápidamente y se transfirió 0,5 mL al tubo control mezclándolo rápidamente. Ambos tubos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Luego se lavó y centrifugó y se resuspendió en 500  $\mu$ L del tampón TA y se analizó por citometría de flujo.

### **3.10.- Análisis informático de datos**

#### **3.10.1.- Estadística**

El análisis estadístico de la significancia fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) o el cálculo de la *t* Student empleando el programa GrandPath Prism 4.0. (GrandPath Software, Inc., San Diego, CA, USA)

#### **3.10.2.- Análisis del efecto de la combinación de drogas**

Se utilizó el programa informático Calcosyn versión 2.0 (BioSoft) para analizar si al combinar diferentes fármacos se observaba un efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre las drogas. Tras introducir los datos correspondientes, el programa informático determinó el efecto de la combinación de distintas drogas mediante los cálculos de relación dosis/efecto (Chou and Talalay 1984). Así, un valor aproximadamente igual a 1 indicó efecto aditivo; superior a 1, efecto antagónico y un valor inferior a 1 indicó efecto sinérgico entre ambas drogas.



## **4.-RESULTADOS**

### **4.1-El sorafenib induce apoptosis en células de mieloma múltiple**

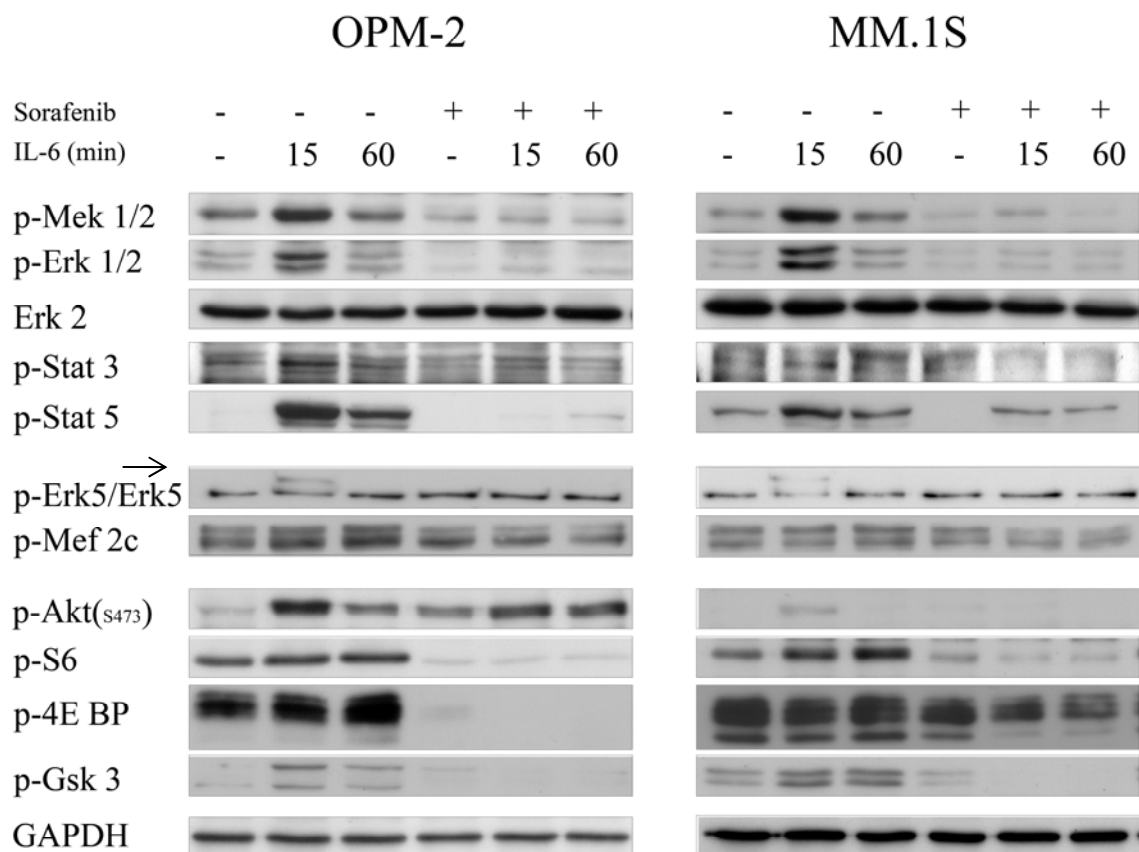
El sorafenib es un fármaco antitumoral aprobado para el tratamiento del carcinoma renal y hepático por la FDA (*Food and Drug Administration*) en el 2005. Sin embargo, debido a su mecanismo de acción, también puede tener efecto antitumoral en mieloma múltiple humano. Por lo que en este primer apartado se caracterizó el efecto de este fármaco en líneas celulares de mieloma múltiple.

#### **4.1.1.-El sorafenib inhibe la traducción de señales en células de mieloma múltiple**

El sorafenib fue diseñado originalmente para inhibir la quinasa Raf, la cual forma parte de una vía de traducción de señales implicada en proliferación celular y en oncogénesis en una gran variedad de tumores. Sin embargo, el sorafenib es capaz de inhibir diferentes quinasas, principalmente algunos receptores tirosín-quinasa implicadas también en proliferación y supervivencia celular. Debido a esto, se diseñó un experimento para determinar si en la células de mieloma, este fármaco, era capaz de inhibir diferentes vías de señalización implicadas en supervivencia y proliferación muy relacionadas con los mecanismos fisiológicos de desarrollo de esta enfermedad, como es el caso de la señalización intracelular provocada por la IL-6, citoquina muy importante en el microambiente de las células de mieloma múltiple en la medula ósea.

En este experimento se incubaron las células en presencia o ausencia de sorafenib 10  $\mu$ M durante 1h y posteriormente se incubaron con IL-6 durante 15 y 60 minutos y se analizó mediante western blot la fosforilación de diferentes proteínas implicadas en la traducción de señales de la IL-6.

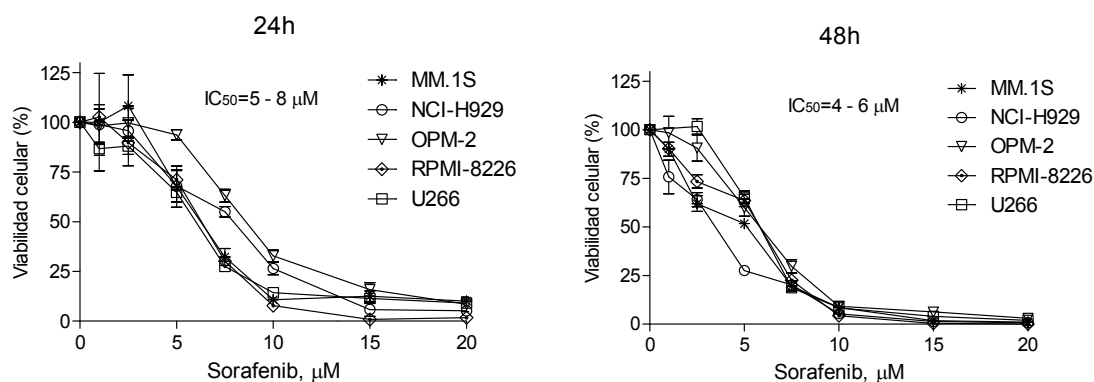
Como se aprecia en la figura 4.1 la IL-6 activa diferentes vías de señalización celular implicadas en proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Incluso en ausencia de IL-6 algunas de estas quinasas se encuentran activas y el sorafenib es capaz de inhibir la activación de estas vías por parte de la IL-6 e incluso inhibir la fosforilación de estas proteínas por debajo del valor basal. Por lo que en estas condiciones el sorafenib es un inhibidor de diferentes vías de señalización relacionadas con Raf y con receptores tirosín-quinasa implicadas en proliferación y supervivencia.



**Figura 4.1.**-Análisis por inmunoblot de la fosforilación de proteínas implicadas en diferentes vías de traducción de señal.

### 4.1.2.-El sorafenib induce muerte en células de mieloma múltiple

Para determinar el efecto del sorafenib en células de mieloma múltiple humano se usaron las líneas de mieloma MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226, U266 y OPM-2. Se realizó un ensayo de dosis respuesta durante 24 y 48h y se determinó la inhibición de la proliferación de estas células mediante el método de Mossman.

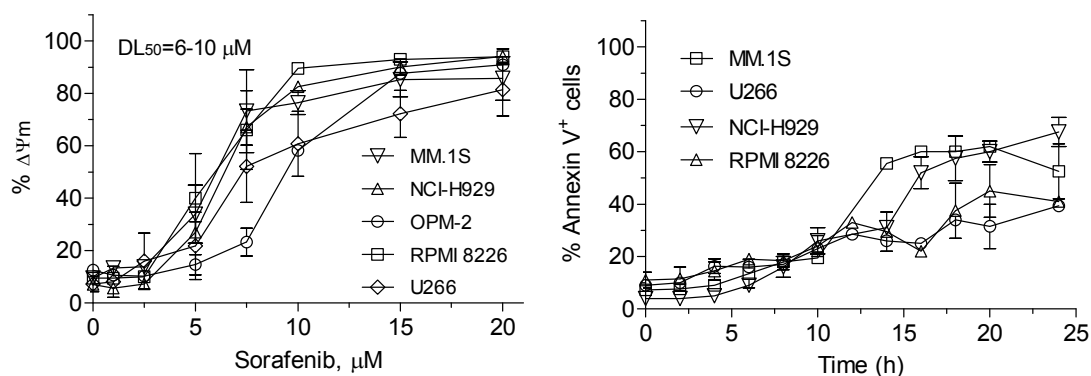


**Figura 4.2.**-Determinación de la viabilidad celular tras la incubación de las células con sorafenib durante 24 y 48h. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de sorafenib durante 24 y 48h. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por triplicados. Los valores de las IC50 fueron calculados mediante el programa informático GraphPad Prism 5.

Como se aprecia en la figura 4.2 todas las líneas celulares fueron sensibles al sorafenib a una concentración inhibitoria del 50% de la proliferación ( $IC_{50}$ ) que se encuentra en el rango de concentraciones plasmáticas alcanzadas con este fármaco en la práctica clínica con las dosis actualmente en uso. El mayor efecto inhibitorio se alcanzó a las 24h de incubación, observándose sólo un ligero incremento adicional a las 48h.

El efecto del sorafenib sobre la inhibición de la proliferación puede deberse tanto a un efecto citostático como a un efecto citotóxico. Por lo que para detectar si el sorafenib induce muerte celular se realizaron curvas dosis-respuestas y tiempo-respuesta, pero esta vez, midiendo inducción de apoptosis. La inducción de la apoptosis se determinó mediante citometría de flujo, determinando el porcentaje de células en las que había exposición de fosfatidil serina y caída de potencial mitocondrial, eventos característicos de las células que están ejecutando la apoptosis.

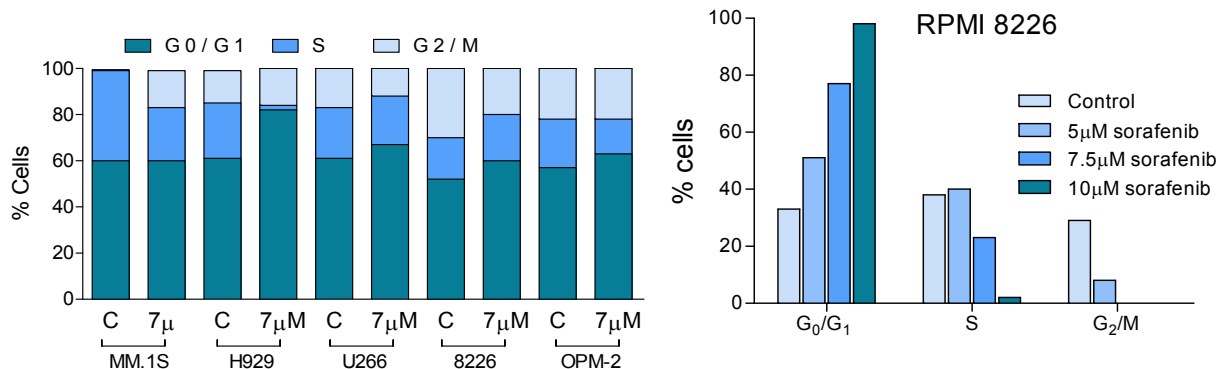
Como se muestra en la figura 4.3, en todas las líneas estudiadas se observó que el sorafenib provoca exposición de fosfatidil serina y caída de potencial mitocondrial de forma dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al fármaco. Según indican estos datos el sorafenib induce apoptosis en las células de mieloma múltiple usadas.



**Figura 4.3.-**Caída del potencial mitocondrial y exposición de fosfatidil serina en células tratadas con sorafenib. A) Caída del potencial mitocondrial al incubar las células durante 24h con diferentes concentraciones de sorafenib. B) Exposición de fosfatidil serina tras incubar las células con 7  $\mu M$  de sorafenib durante un tiempo creciente.

Debido al mecanismo de acción de este fármaco, se realizó un estudio del ciclo celular en células incubadas con sorafenib. Para esto, se incubaron las células de las líneas ya mencionadas con 7.5  $\mu M$  de sorafenib durante 24 h. Posteriormente se tiñeron los núcleos de las células con Ioduro de propidio y se midió por citometría la incorporación de esta sonda por las células (acápite 3.2.6).

Este experimento también se realizó incubando las células con una dosis creciente de sorafenib (2.5; 5; 7.5 y 10  $\mu M$ ) durante 24 h pero en este caso solo en la línea RPMI 8226.

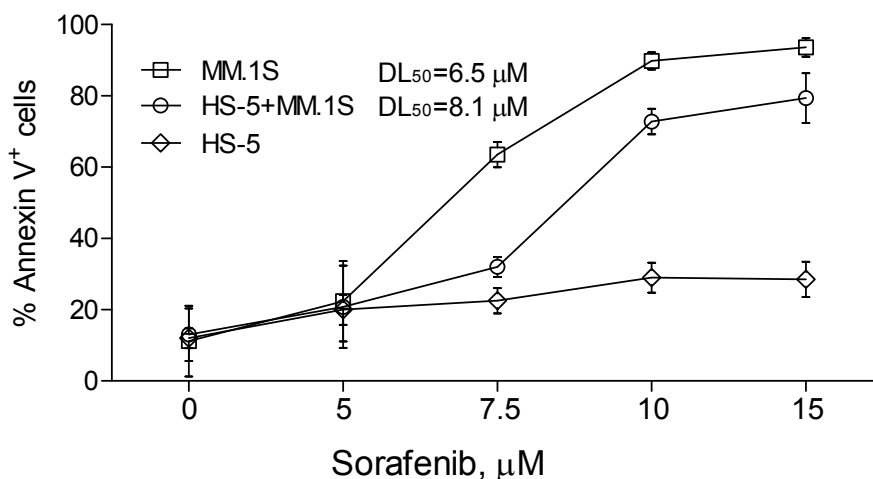


**Figura 4.4.-** Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras exponerlas a sorafenib durante 24 h. A) Diferentes líneas celulares incubadas con 7  $\mu$ M de sorafenib durante 24 h. B) Porcentaje de células RPMI 8226 en cada fase del ciclo celular al incubar las células durante 24 h con diferentes concentraciones de sorafenib.

Como se observa en la figura 4.4 parece que el sorafenib indujo un ligero arresto de la división celular con el consiguiente aumento del porcentaje de células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, sin embargo, es capaz de inducir muerte celular en todas las fases del ciclo aunque probablemente más en aquellas células que están en proceso de división celular y por tanto en fase S y G<sub>2</sub>/M, con lo cual disminuiría el porcentaje de células en las fases S y G<sub>2</sub>/M y aumentaría en las fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Según este razonamiento induciría una mayor muerte en aquellas células que están en G<sub>2</sub>/M que es en la fase que se observa una disminución mayor del porcentaje de células.

Estos ensayos in vitro presentan el inconveniente de que en ellos se pierden las interacciones heterotípicas entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular los cuales pueden inducir un potente efecto protector frente a los fármacos ensayados (Bommert et al. 2006). Debido a esto, se realizó un ensayo en el cual las células de mieloma fueron co-cultivadas con la línea de células estromales HS-5 para simular en alguna medida el estado fisiológica de estas células en el paciente.

Al co-cultivar las células estromales HS-5 con las MM.1S se observa (figura 4.5) un ligero efecto protector sobre la apoptosis inducida por el sorafenib en las células de mieloma. Este efecto es debido a las señales de supervivencias que envían las células estromales a las de mieloma, provocando que la DL<sub>50</sub> aumente de 6.8 a 8.5  $\mu$ M. No obstante estas células continuaron siendo sensibles en estas condiciones, además, las células estromales no parecen ser sensibles al sorafenib.

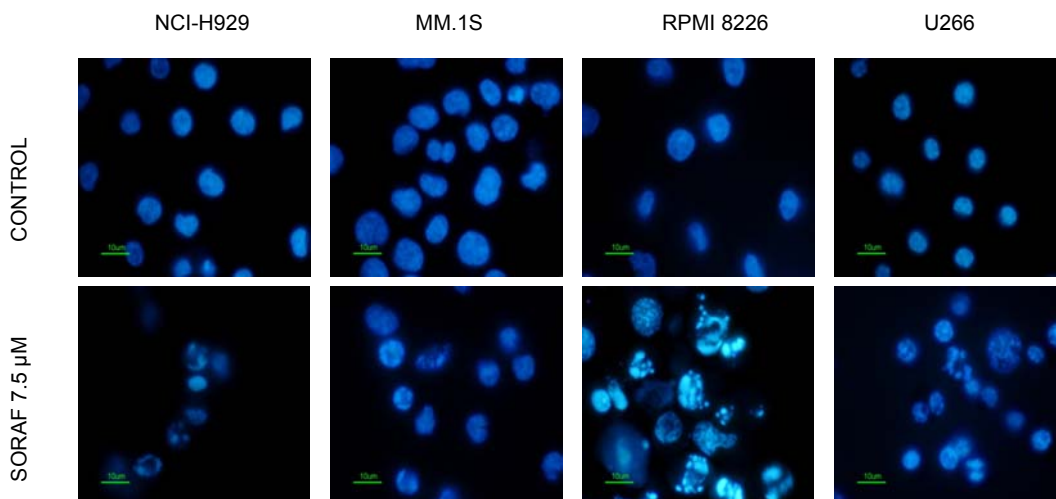


**Figura 4.5.**-Curva dosis respuesta de las células MM.1S en presencia y en ausencia de la línea de células estromales HS-5. Las células fueron incubadas con una dosis creciente de sorafenib durante 24 h.

### 4.1.3.-La muerte celular inducida por el sorafenib es a través de la vía intrínseca de la apoptosis

Para caracterizar el efecto del sorafenib en estas líneas celulares se analizó, además de la caída del potencial mitocondrial y la exposición de fosfatidil serina ya observados, la determinación de otros parámetros moleculares y morfológicos característicos de la apoptosis.

Uno de estos marcadores es la fragmentación nuclear, para esto, se tiñeron los núcleos con Hoechst y se observaron por microscopia de fluorescencia para detectar células que tuvieran condensación nuclear, morfología característica de las células que están sufriendo apoptosis.



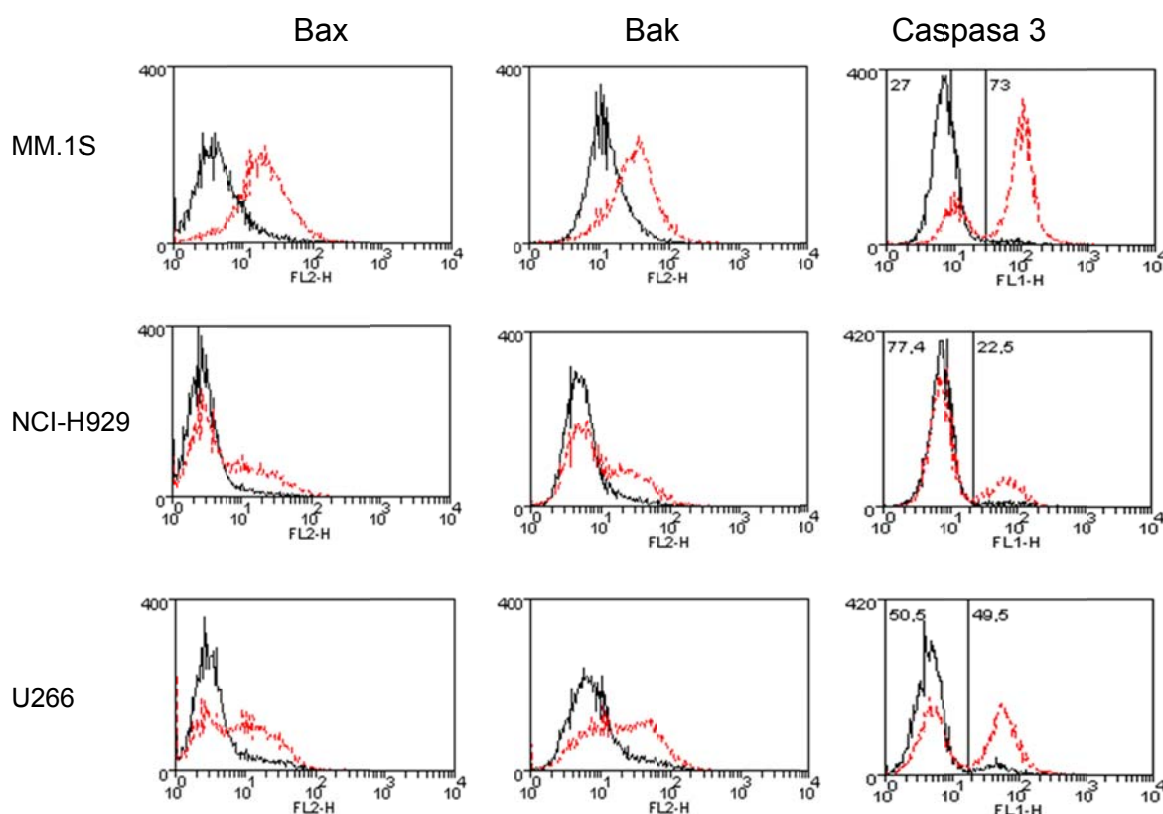
**Figura 4.6.**-Formación de núcleos picnóticos tras incubación de las células con 7.5 µM de sorafenib durante 24 h. Las células se incubaron con sorafenib a la concentración antes mencionada durante 24 h. Transcurrido este tiempo se centrifugaron sobre cubres de poli-L-lisina y se fijaron con paraformaldehído al 1%. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 a 5 µg/ml.

Como se muestra en la figura 4.6, al incubar las células con sorafenib 7.5  $\mu\text{M}$  durante 24 h se indujo la formación de núcleos picnóticos en todas las líneas ensayadas. Lo cual es indicativo de que el sorafenib induce apoptosis en estas células de mieloma múltiple.

Como el sorafenib es capaz de inducir caída del potencial mitocondrial, exposición de fosfatidil serina, condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, se incubaron las células con sorafenib durante 24 h y se midió la activación de caspasa 3 y el cambio conformacional de Bax y Bak por citometría de flujo.

El cambio conformacional de Bax y Bak son eventos necesarios para que se lleve a cabo la apoptosis por la vía intrínseca y se active la caspasa 3, una caspasa ejecutora.

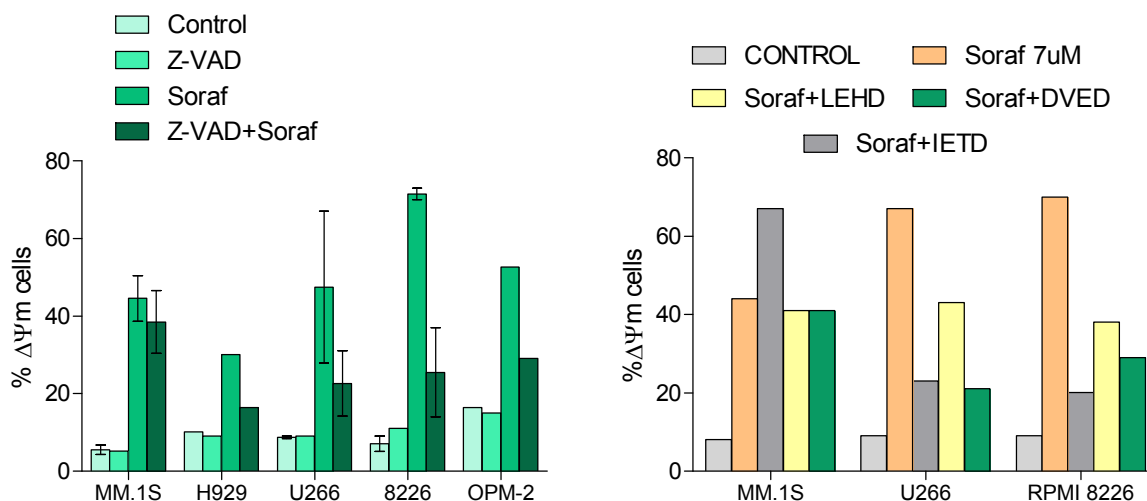
Como se puede observar en la figura 4.7 el sorafenib induce cambio conformacional de Bax y Bak lo que induce la activación de la caspasa 3 y finalmente la apoptosis, por lo que se puede decir que en estas líneas el sorafenib induce apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial, induciendo apertura del canal mitocondrial y que permite la salida del citocromo c la formación del apoptosoma y la consiguiente activación de la caspasa 9.



**Figura 4.7.-**Análisis de la activación de la caspasa 3 y del cambio conformacional de Bax y de Bak por citometría de flujo. Se trataron las células con una 7  $\mu\text{M}$  de sorafenib durante 24 h y posteriormente se fijaron y se incubaron con anticuerpos para cada proteína.

Debido a estos resultados se procedió a incubar las células con diferentes inhibidores de caspasa para determinar la importancia relativa de cada una en la muerte inducida por el

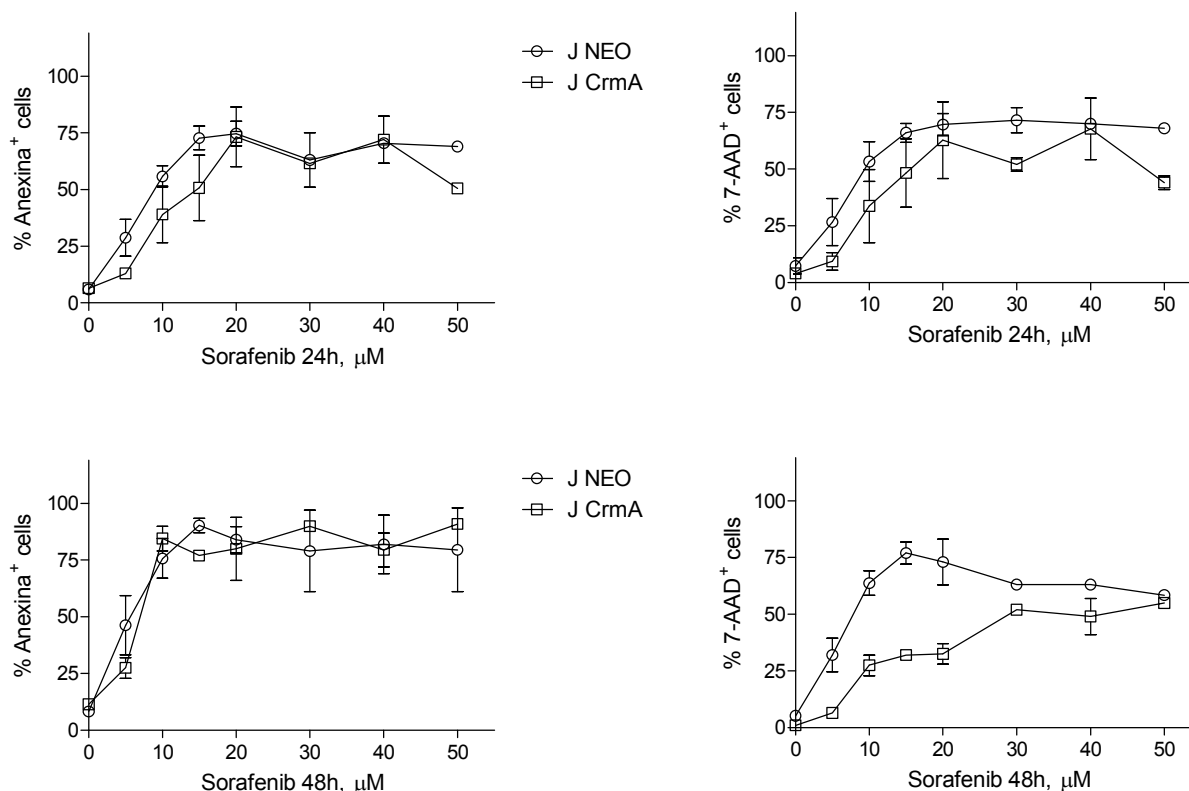
sorafenib. En primer lugar se incubaron con Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (ZVAD), un inhibidor general de caspasas. Las células se incubaron una hora antes de adicionar el sorafenib a una concentración de 100  $\mu$ M.



**Figura 4.8.**-Efectos de inhibidores de caspasas sobre la muerte inducida por el sorafenib. Las células fueron tratadas una hora antes de adicionar el sorafenib con el inhibidor de caspasas. Las células se trataron con una concentración de sorafenib de 7  $\mu$ M durante 24 h. En el caso de las OPM-2 la concentración empleada fue de 10  $\mu$ M. Las U266 tratadas con sorafenib y con otros inhibidores de caspasas como , IETD, LEHD y DEVD inhibidores de las caspasas 8, 9 y 3 respectivamente.

Como se aprecia en la figura 4.8 el ZVAD protegió de la apoptosis y la muerte inducida por el sorafenib en grado variable, mostrando desde una inhibición prácticamente completa como la que se observa en las RPMI 8226 a una ligera inhibición como la observada en las MM.1S, siendo parcial en el resto de las líneas ensayadas. Sin embargo al repetir este experimento pero con otros inhibidores de caspasas como IETD, LEHD y DEVD, inhibidores de las caspasas 8, 9 y 3 respectivamente, los resultados obtenidos fueron ambiguos, aunque llama la atención el resultado observado con el inhibidor de caspasa 8 en la línea MM.1S. donde induce un aumento de la muerte celular, mientras que en las otras induce una protección comparable con el ZVAD y el DEVD.

Debido a esto se realizó una dosis respuesta a 24 y 48 h con la línea Jurkat que expresan una serpina (serina proteasa inhibitora) del virus de la viruela llamada CrmA (Cytokine response modifier A) y que es capaz de inhibir a la caspasa 8.



**Figura 4.9.**-Efectos del inhibidor de caspasa 8 CrmA sobre la muerte inducida por el sorafenib en células Jurkat.

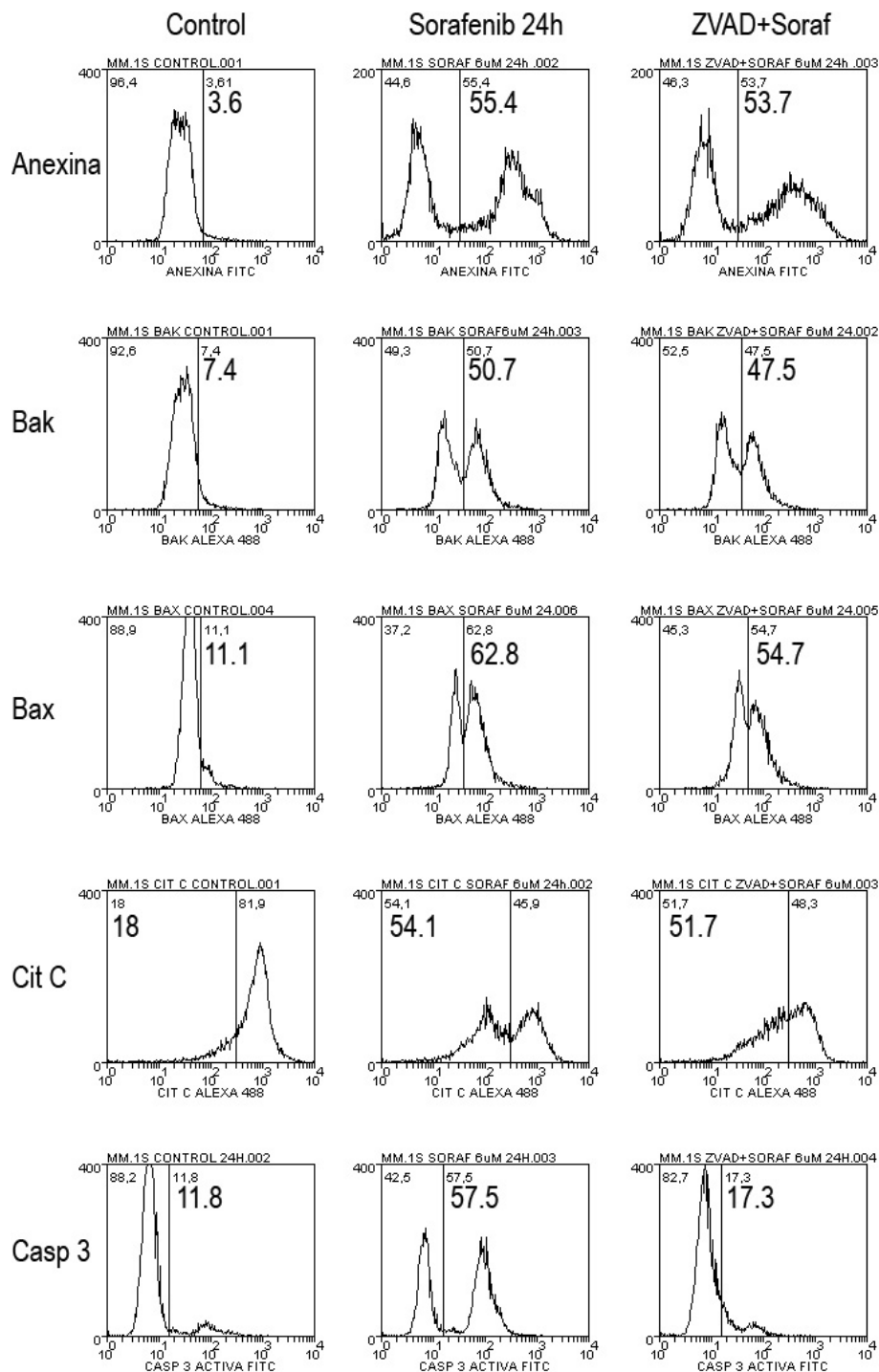
Como se muestra en la figura 4.9, al menos en este modelo no parece que la caspasa 8 tenga una influencia muy marcada en la apoptosis inducida por el sorafenib tanto a 24 como a 48 h. Aunque a 24 h y dosis bajas si se aprecia una pequeña diferencia entre las Jurkat CrmA y las Jurkat controles, diferencia que también se puede apreciar en la necrosis secundaria inducida por sorafenib a 24 h y aún más marcada a 48 h.

No obstante, según los resultados obtenidos con inhibidores de caspasas, el sorafenib puede inducir una muerte celular de formas diferente dependiendo del modelo empleado. Por un lado en las RPMI 8226 induce una muerte dependiente en gran medida de la activación de las caspasas, mientras que en las MM.1S, el sorafenib puede inducir muerte aunque las caspasas estén inhibidas.

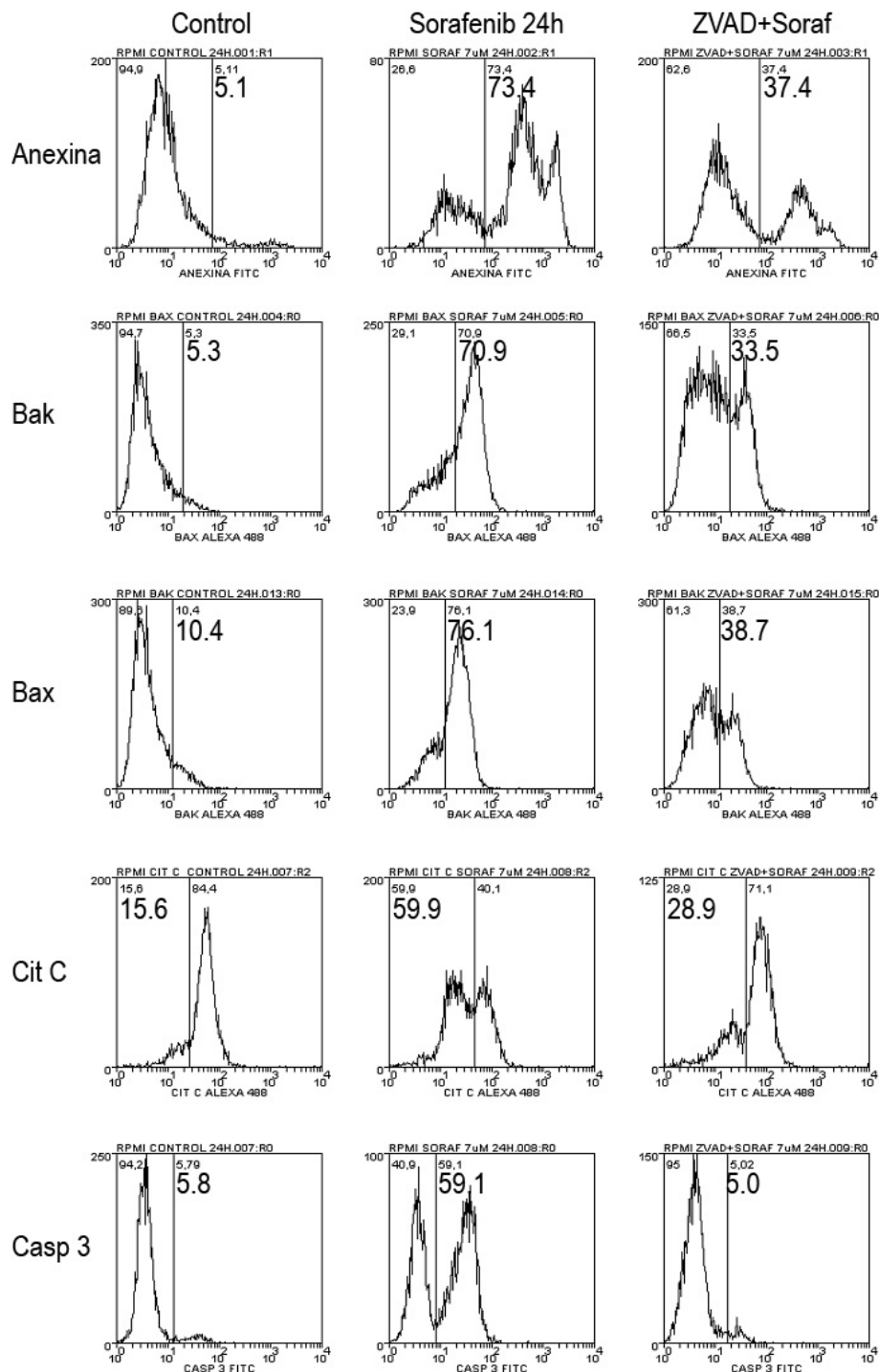
Para analizar este efecto del sorafenib se decidió analizar la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en presencia y ausencia de Z-VAD en las dos líneas que presentan un comportamiento más diferentes.



Para esto se incubaron las células de las líneas MM.1S y RPMI 8226 en presencia y ausencia de Z-VAD durante 24 h, y por citometría de flujo, se analizó la exposición de fosfatidil serina, el cambio conformacional de Bax y Bak, la salida de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 3.



**Figura 4.10.**-Efecto del inhibidor de caspasas Z-VAD sobre la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en las MM.1S. Las células se incubaron con sorafenib en presencia y ausencia de Z-VAD durante 24h y por citometría de flujo se detectó la exposición de fosfatidil serina, el cambio conformacional de Bax y Bak, la salida de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 3.



**Figura 4.11.**-Efecto del inhibidor de caspasa Z-VAD sobre la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en RPMI 8226. Las células se incubaron con sorafenib en presencia y ausencia de Z-VAD durante 24 h y por citometría de flujo se detectó la exposición de fosfatidil serina, el cambio conformacional de Bax y Bak, la salida de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 3.

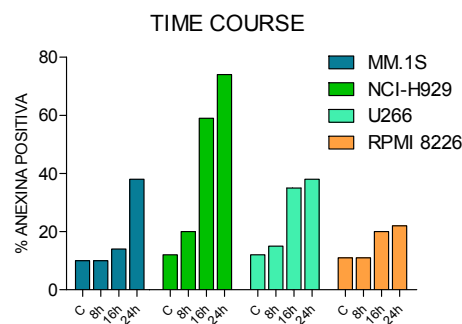
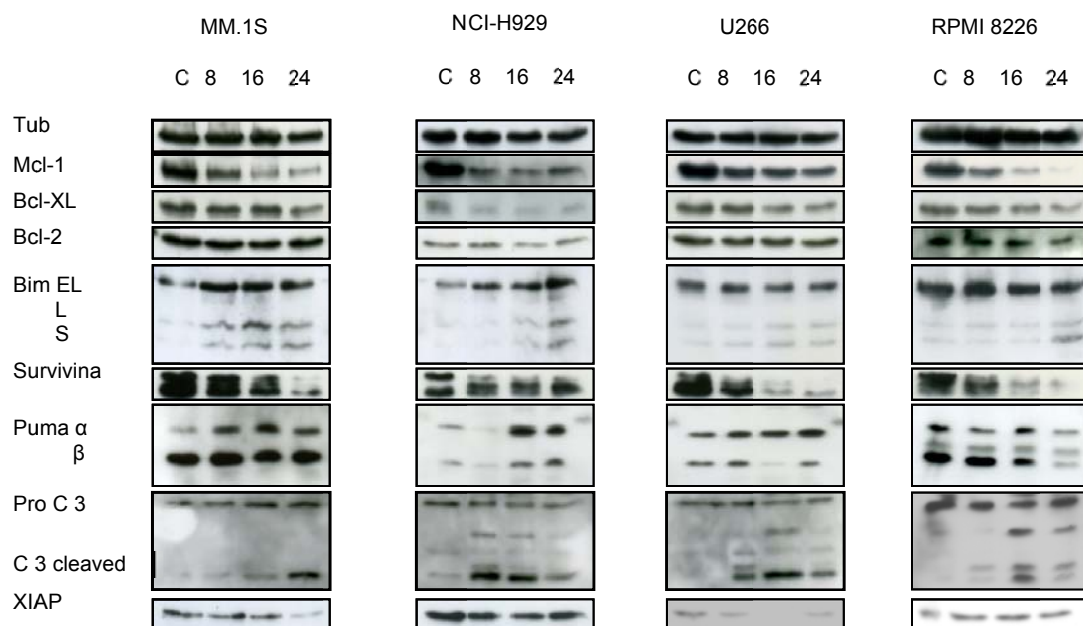
Según los datos obtenidos en este experimento y que se aprecian en las figuras 4.10 y 4.11, en ambas líneas celulares el porcentaje de muerte celular observada determinada por la exposición de la fosfatidil serina, se corresponden a los porcentaje de cambios conformacionales de Bax y Bak, así como al porcentaje de salida de citocromo c de la mitocondria, tanto en

presencia como en ausencia de Z-VAD. En cambio, la activación de caspasa 3 sólo se corresponde con los parámetros anteriores mencionados en ausencia de Z-VAD. Además, en presencia de Z-VAD la exposición de fosfatidil serina, el cambio conformacional de Bax y Bak y la salida de citocromo c se ven significativamente reducida en el caso de la línea RPMI 8226, no así en las MM.1S.

Según los resultados obtenidos parece claro que el sorafenib induce activación de la vía intrínseca de la apoptosis, aunque puede inducir muerte independiente de la activación de las caspasas.

#### 4.1.4.-Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel crucial en la apoptosis inducida por el sorafenib

El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas juega un papel importante en la homeostasis celular, por lo que para que se inicie la apoptosis por la vía intrínseca es necesario un desequilibrio entre estas proteínas a favor de las proteínas proapoptóticas.



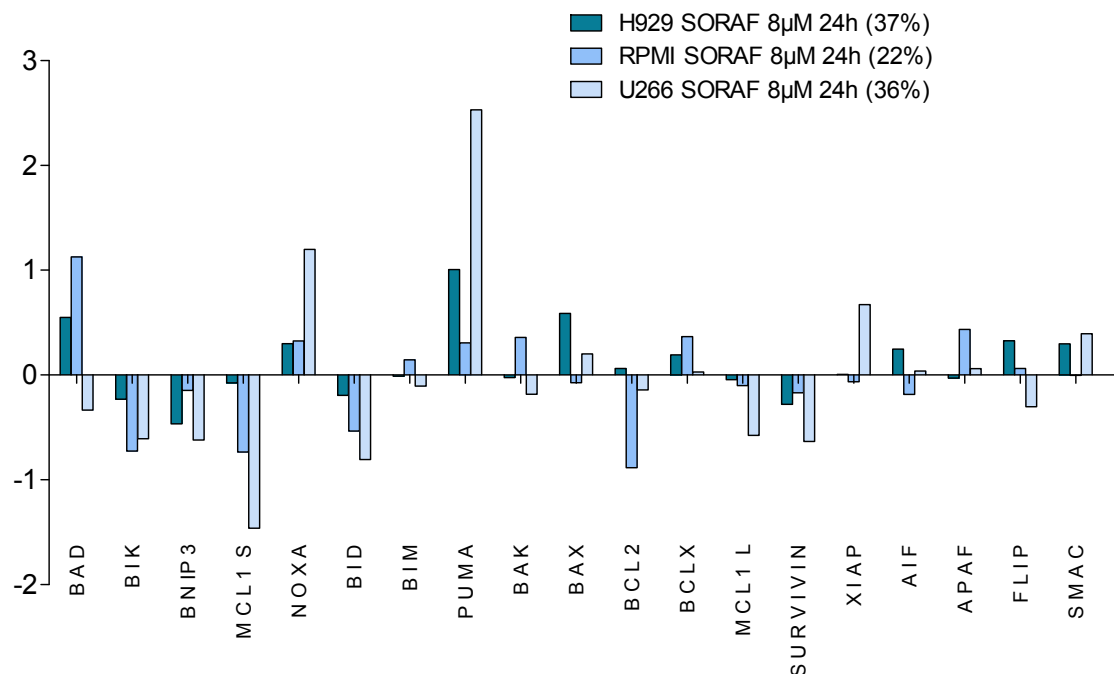
**Figura 4.12.-**Análisis por inmunoblot de los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis.

Debido a esto en este apartado se analizó la importancia de las proteínas proapoptóticas y de las antiapoptóticas en la apoptosis inducida por el sorafenib.

Para analizar el mecanismo por el cual el sorafenib activa esta vía de la apoptosis en las células de mieloma múltiple empleadas, se analizó el efecto de este fármaco sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis. Para esto se trataron las células con una concentración fija de sorafenib a diferentes intervalos de tiempo (0, 8, 16, 24 h), para cada punto se determinó la caída del potencial mitocondrial y se realizaron inmunoblots para analizar los niveles de estas proteínas. Como se aprecia en figura 4.12 el sorafenib induce, de forma dependiente del tiempo, disminución de las proteína antiapoptóticas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y survivina, así como una disminución de algunas proteínas inhibidoras de caspasas como XIAP.

También se observó procesamiento de la caspasa 3 y aumento de los niveles de las proteínas proapoptóticas Bim y Puma  $\alpha$ . Aunque el aumento de la expresión de estas dos proteínas proapoptóticas resulta altamente variable dependiendo de la línea analizada y de los niveles de muertes alcanzados.

Para detectar si la bajada en la expresión de algunas de estas proteínas se debía a una bajada en los niveles de transcripción de sus mRNA se realizó un análisis semicuantitativo de los niveles de varios mRNA a través de la realización de un RT-MLPA



**Figura 4.13.**-Análisis de los niveles de mRNA de proteínas relacionadas con la apoptosis por RT- MLPA.

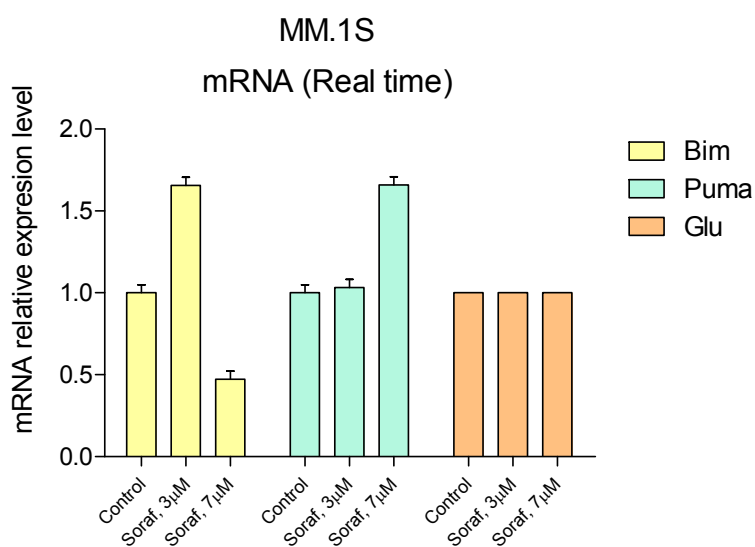
Como se aprecia en la figura 4.13 existen algunas proteínas cuyos mRNA aumentan en las tres líneas ensayadas, como Noxa, Puma y Bcl-X<sub>L</sub>. Mientras otros mRNA bajan en las tres líneas usadas, Bik, Bnip3L Mcl-1, Bid y survivina, en cambio otros tienen un comportamiento diferente

para cada línea. De estas proteínas lo más significativo es el aumento de los niveles del mRNA de Puma una proteína proapoptótica y la disminución de los niveles de Mcl-1 y survivina, dos proteínas antiapoptóticas. Por lo que la disminución de los niveles de las proteínas Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2 parece ser debido exclusivamente a un aumento de su degradación.

También merece la pena destacar que el aumento de los niveles del mRNA de Puma en las RPMI 8226 es moderado y concuerda con la única línea en la que no se aprecia un aumento de los niveles de ésta proteína por blots, si no más bien, una reducción.

Debido a la importancia que pueden tener las proteínas Puma y Bim y el mecanismo de inducción de muerte del sorafenib, se comprobaron los niveles de mRNA obtenidos en la RT-MLPA para estas dos proteínas por otra técnica, en este caso una PCR cuantitativa (*Real Time-PCR*). Las células se incubaron con dos dosis diferentes de sorafenib durante 24 h. Transcurrido este tiempo se extrajo mRNA y posteriormente se realizó una retrotranscripción para obtener cDNA y se realizó la reacción de PCR cuantitativa (ver *Materiales y Métodos*).

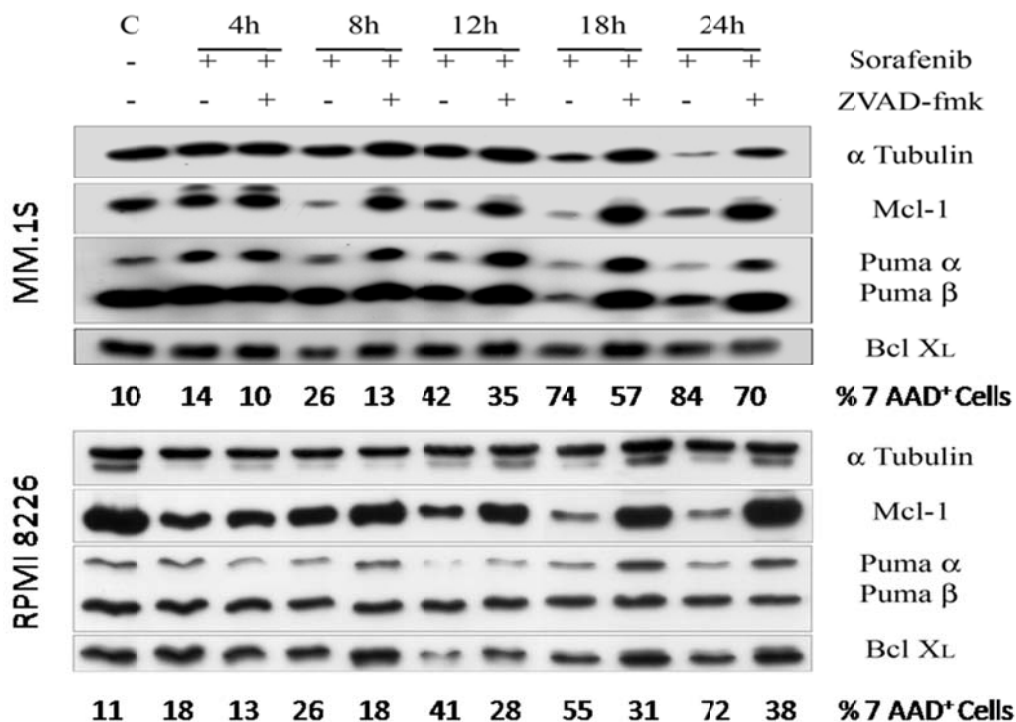
Como se muestra en la figura 4.14, los niveles de mRNA de la proteína Bim oscilan, observándose inicialmente un aumento a dosis bajas de sorafenib y posteriormente una disminución a la dosis mayor de este fármaco, comportamiento diferente al observado en el caso del mRNA de Puma, donde inicialmente no parece ocurrir ningún cambio a la dosis de 3  $\mu$ M pero a la dosis más alta (7  $\mu$ M) aumenta significativamente, corroborando los resultados obtenido en la MLPA.



**Figura 4.14.**-Análisis de los niveles de mRNA de Puma y Bim por Real Time.

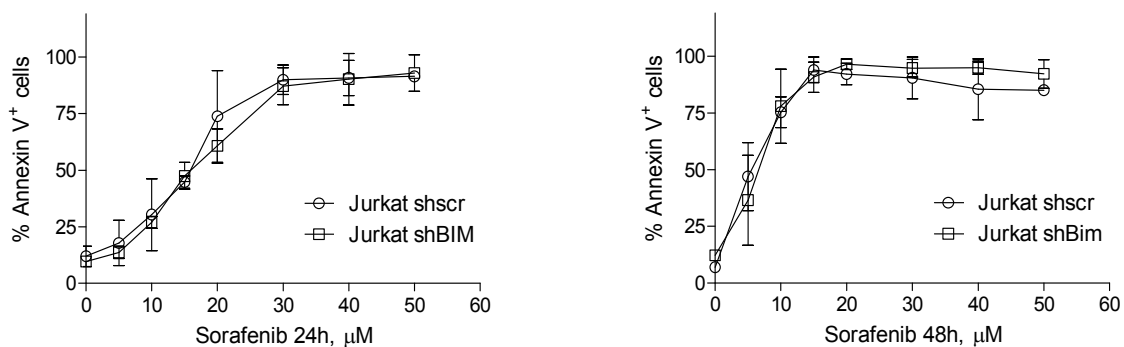
Para analizar el efecto del sorafenib sobre algunas de las proteínas relacionadas con la apoptosis, específicamente Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> y Puma, se realizó un análisis de la expresión de estas proteínas tras incubar las células con sorafenib a diferentes intervalos de tiempo en presencia y ausencia de ZVAD.

En la figura 4.15 se ve como en presencia de ZVAD, aumentan los niveles de Puma  $\alpha$ , tanto en MM.1S como en RPMI 8226. Esto corrobora la importancia de esta proteína en el mecanismo de acción de este fármaco. También se ve como la bajada tanto de Puma, de Mcl-1 como de Bcl-X<sub>L</sub> depende de la activación de las caspasas por lo estas proteínas parecen ser degradadas por las caspasas y de esta forma contribuyen a la amplificación de la apoptosis fundamentalmente por la degradación de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>



**Figura 4.15.**-Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con la activación de la vía intrínseca mitocondrial en células incubadas con sorafenib en presencia y ausencia de Z-VAD.

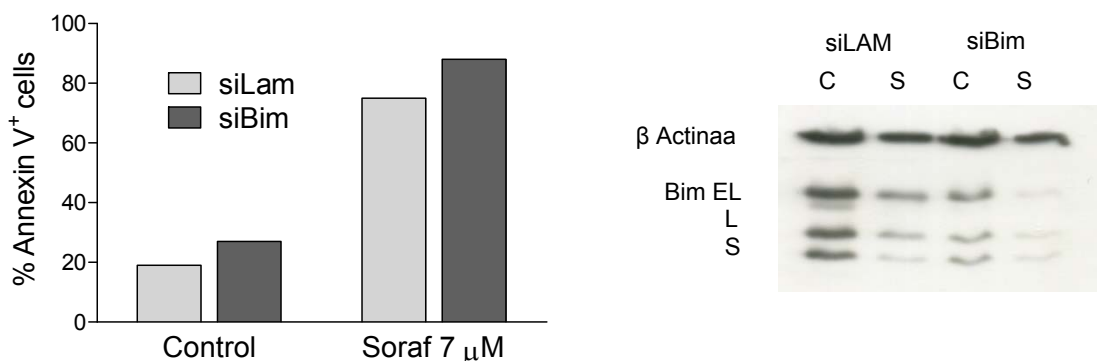
Aunque en el caso del mRNA de Bim no se observó ninguna tendencia en la RT-MLPA, en el análisis por western blot sí parece observarse un aumento de esta proteína, así como en el Real Time a dosis bajas de esta droga. Esto hizo que se cuestionara la implicación de esta proteína en la apoptosis inducida por el sorafenib, por lo que se usaron dos estrategias para el estudio del papel de Bim en la apoptosis inducida por éste fármaco. Por un lado, se usó una línea silenciada de forma estable para esta proteína, sin embargo, debido a que esta línea no es de mieloma múltiple, también se usaron siRNA para silenciar esta proteína de manera transitoria por nucleofección en células de MM.



**Figura 4.16.**-Curva dosis respuesta a 24 y 48 h en células silenciada de Bim de forma estable.

Se usó las células de la línea Jurkat silenciada para esta proteína de forma estable. Con esta se realizó una curva dosis respuesta (% de anexina positiva) a 24 y 48 h comparándola con la línea control.

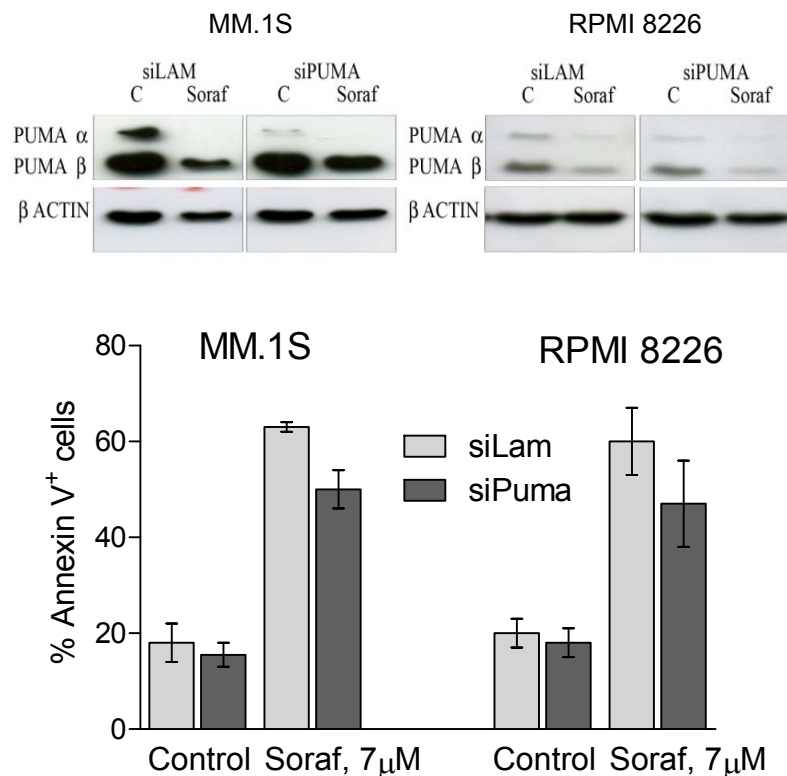
Como se aprecia en la figura 4.16 no existen diferencias entre las células controles y las silenciadas de Bim. Según estos datos esta proteína no tiene ningún efecto en la muerte inducida por sorafenib en células Jurkat. Debido a que no es el mismo modelo se realizó el silenciamiento transitorio usando siRNA.



**Figura 4.17.**-Silenciamiento transitorio de Bim en las células de mieloma de la línea NCI-H929

En la figura 4.17 se muestra un experimento representativo del silenciamiento transitorio en la línea de mieloma NCI-H929 y aunque el silenciamiento fue parcial, no se detectó ningún efecto protector al silenciar Bim, Pese a esto, no podemos descartar que esta proteína pueda tener algún efecto en la apoptosis inducida por el sorafenib, ya que está descrito que al silenciar Bim las células pueden compensar la disminución de esta proteína con el aumento de Puma.

Para determinar el efecto de Puma en la apoptosis inducida por el sorafenib se usó la misma estrategia anterior. Se usaron siRNA de Puma para silenciar esta proteína de forma transitoria.



**Figura 4.18.**-Silenciamiento transitorio de Puma en las células de mieloma de la MM.1S y RPMI 8226

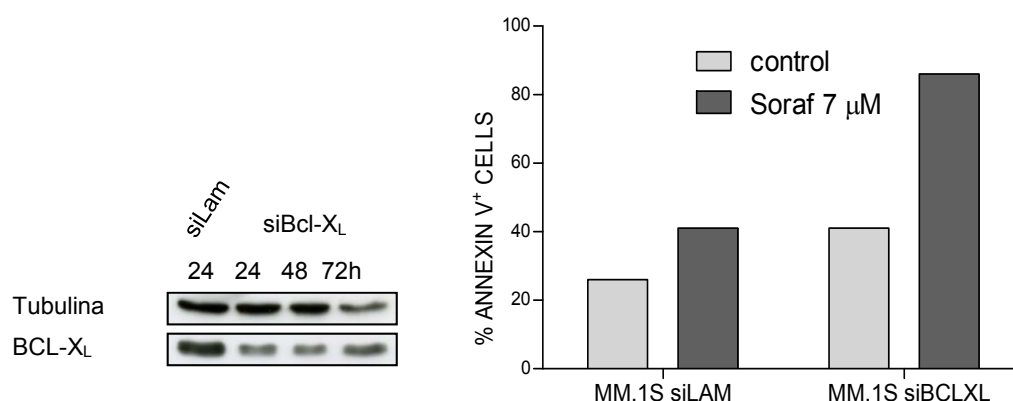
Como se muestra en la figura 4.18 sólo se silenció la isoforma  $\alpha$  aunque de forma parcial, sin embargo en las MM.1S se logró un buen silenciamiento que conllevó a una protección significativa de la muerte inducida por el sorafenib. Según estos datos la proteína proapoptótica Puma parece tener un papel más relevante que Bim en la apoptosis inducida por el sorafenib.

Debido a que tanto Bim como Puma ejercen su efecto interactuando con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1. Como se muestra en la figura 4.7, el sorafenib induce una disminución en los niveles de expresión de estas proteínas y se analizó por técnicas de silenciamiento y sobreexpresión la importancia relativa que tiene cada una de estas proteínas en la apoptosis inducida por el sorafenib.

En el caso de Bcl-X<sub>L</sub> se usó un siRNA para realizar un silenciamiento transitorio por nucleofección en las MM.1S. Luego las células se incubaron con sorafenib durante 24 h. Como se muestra en la figura 4.17 el mayor silenciamiento se consiguió entre las 24 y 48 h posteriores a la introducción del siRNA en las células por nucleofección. Tras silenciar las células se esperó 24 h para incubarlas con sorafenib durante 24h más.



Como se muestra en la figura 4.17 el silenciamiento de esta proteína provocó un aumento de la muerte basal en el experimento lo que muestra la importancia de la proteína en la homeostasis de estas células. De igual forma se observó un marcado incremento en la muerte inducida por el sorafenib, por lo que la disminución de los niveles de esta proteína antiapoptótica observados al tratar estas células con este fármaco pueden jugar un papel importante en la muerte inducida por el sorafenib.

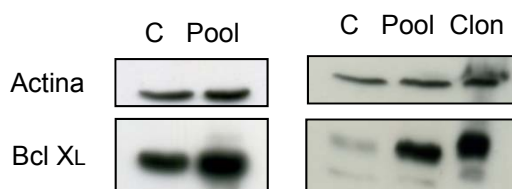


**Figura 4.19**-Silenciamiento transitorio de Bcl-X<sub>L</sub> en las células de mieloma de la MM.1S.

Para confirmar la importancia de la disminución de los niveles de esta proteína en el mecanismo de acción del sorafenib se usaron sublíneas en las cuales se había sobreexpresado Bcl-X<sub>L</sub> de forma estable.

Las sublíneas 8226 Bcl-X<sub>L</sub> fue obtenidas previamente en nuestro laboratorio y la MM.1S Bcl-X<sub>L</sub> se obtuvo durante este trabajo, usando el mismo plásmido con el que se obtuvo la 8226 Bcl-X<sub>L</sub>. Esta se obtuvo mediante una infección retroviral y posteriormente una dilución límite (ver materiales y método acápite 3.7) de donde se obtuvieron varios clones.

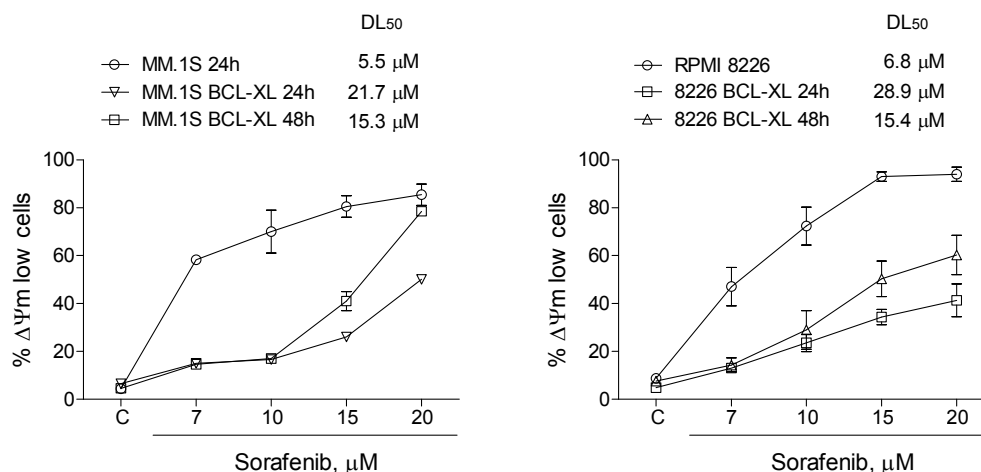
Como se muestra en la figura 4.20 se obtuvo un *pool* de células que sobreexpresaba Bcl-X<sub>L</sub> y de dicho *pool* se obtuvo el clon que posteriormente se usó en este experimento. La sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub> se comprobó por blots. En ambos casos se observó una marcada sobreexpresión de esta proteína.



**Figura 4.20**.-Obtención de la sublínea de MM.1S que sobreexpresa Bcl-X<sub>L</sub>

Como se aprecia en la figura 4.21 se observó que la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub> en estas células provoca una marcada protección en ambas líneas, sobre todo a dosis bajas, tanto a 24 como a 48 h. Sin embargo a dosis alta y tiempos largos como 20 μM y 48 h la protección

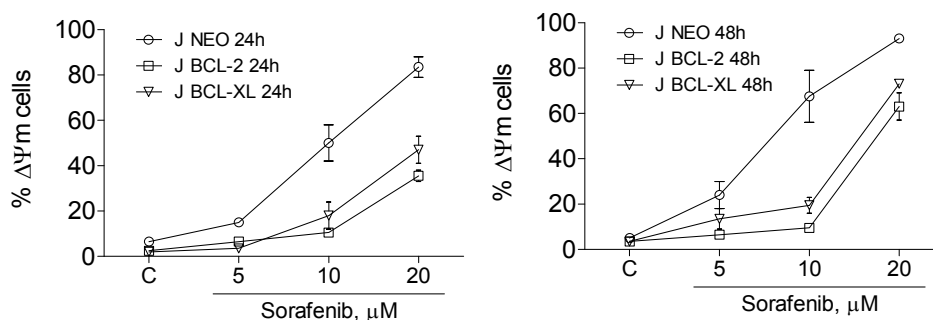
disminuye en las dos líneas. Esta disminución de la protección es mucho más marcada en las MM.1S Bcl-X<sub>L</sub>. Con estos resultados podemos decir que el efecto del sorafenib sobre la bajada de esta proteína puede ser determinante en el mecanismo de acción de este fármaco, al menos a dosis bajas. Aunque a dosis altas y tiempos más largos el sorafenib podría inducir muerte por una vía alternativa fundamentalmente en las MM.1S.



**Figura 4.21.**-Curva dosis respuesta a 24 y 48 h en células MM.1S que sobreexpresan Bcl-X<sub>L</sub> de forma estable.

Para analizar si el mismo efecto observado con la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub> se obtendría con la sobreexpresión de Bcl-2, se usó la línea de células Jurkat de las cuales se tenían sublíneas que sobreexpresaban Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, y se repitió el experimento anterior pero con estas líneas.

Como se aprecia en la figura 4.22, la sobreexpresión de Bcl-2 muestra un efecto similar a la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub>, con solo una ligera mayor protección en las células que sobreexpresan Bcl-2.

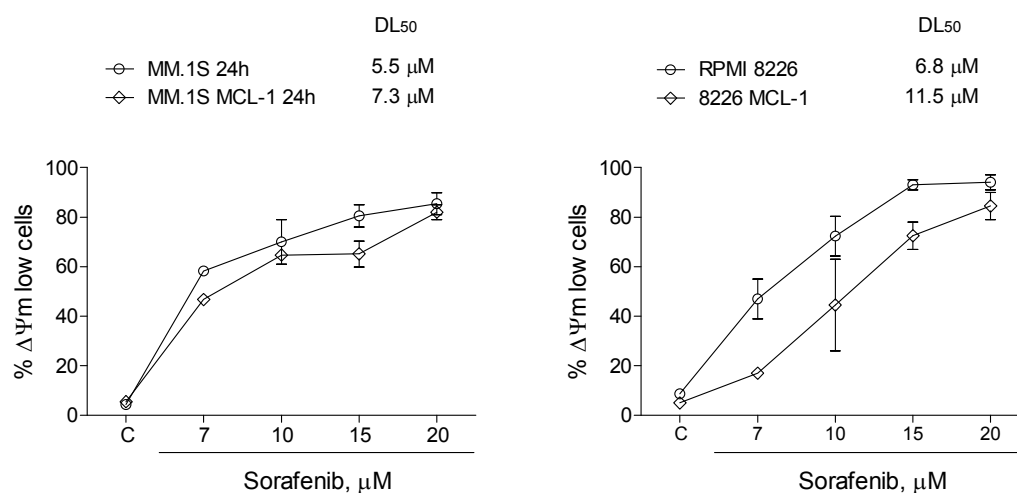


**Figura 4.22.**-Curva dosis respuesta a 24 y 48h en células Jurkat que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> de forma estable.

Mcl-1 es otra proteína antiapoptótica cuyos niveles descienden al tratar las células con sorafenib. Para analizar el efecto de esta proteína en la apoptosis inducida por el sorafenib, se usaron células que sobreexpresan esta proteína de manera estable y se repitieron los

experimentos anteriores.

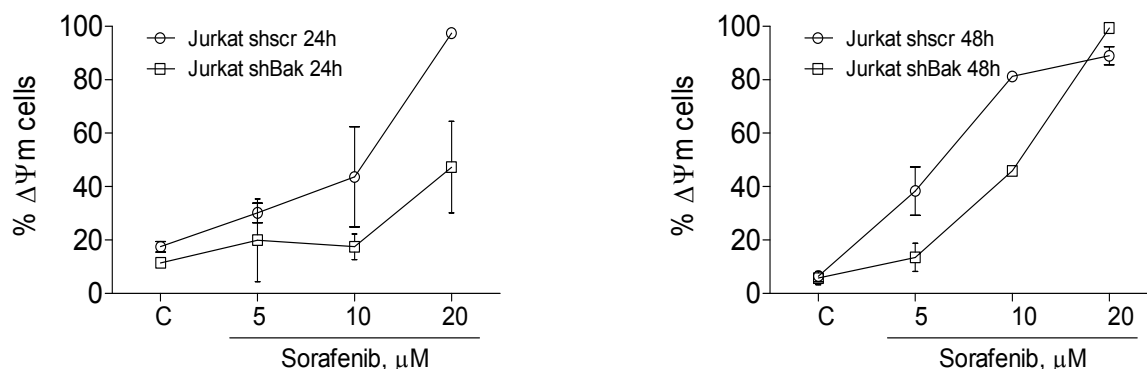
Como se muestra en la figura 4.23 la protección en la células que sobreexpresan Mcl-1 es menor que en las que se sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, incluso la protección es mínima en las MM.1S tanto a dosis bajas como a dosis altas mientras que en las 8226 Mcl-1 la protección es menor pero significativo a dosis bajas no así a dosis altas.



**Figura 4.23.**-Curva dosis respuesta a 24 y 48 h en células MM.1S que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> de forma estable.

Según todos estos datos el sorafenib induce apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial en las células de mieloma múltiple. Una vez que la vía intrínseca es activada y se forman los poros en la membrana interna mitocondrial, salen los factores apoptogénicos produciendo la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9 y posteriormente la 3. Sin embargo, existen vías alternativas descritas que pueden producir apoptosis sin la necesidad de que intervenga la mitocondria. Para determinar el grado de importancia de la mitocondria en la apoptosis inducida por el sorafenib, se usó la sublínea de células Jurkat en la que se ha silenciado la proteína proapoptótica Bak. En estas células, que no presentan la proteína Bax, la activación de la vía mitocondrial esta inhibida. Por lo que constituye un buen modelo para analizar la capacidad del sorafenib de inducir apoptosis por otra vía alternativa.

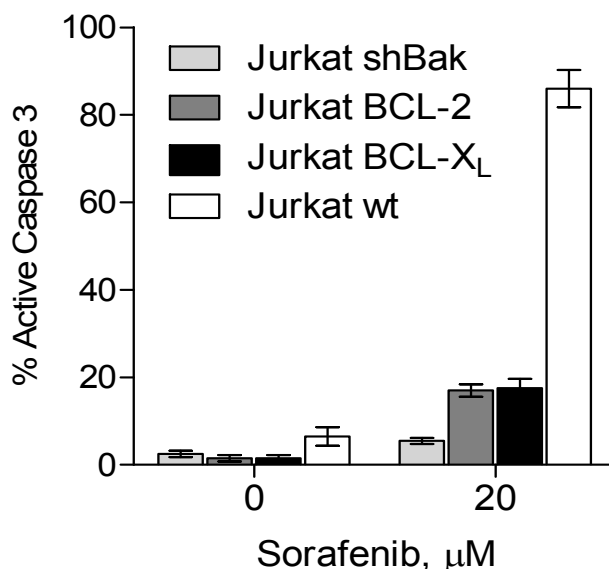
En este experimento se realizó una curva dosis respuesta durante 24 y 48 h y como se muestra en la figura 4.24. Aa 24 h se consigue una inhibición importante de la muerte inducida por el sorafenib, no así a las 48h donde se observa un aumento de la muerte aunque inferior a las células control.



**Figura 4.24.**-Curva dosis respuesta a 24 y 48 h en células Jurkat silenciadas de Bak de forma estable.

El efecto de protección parcial observado tanto por la sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 y el silenciamiento de Bak en células carentes de Bax se puede deber a la activación de la vía extrínseca y de esta forma compensar el bloque de la vía intrínseca. Aunque también están descritas otras vías de muerte celular como la muerte asociada a autofagia o la necroptosis, las cuales, en caso de que la apoptosis pueda realizarse en la células no tendrían especial relevancia a no ser en determinados casos específicos, pero si tienen importancia cuando la apoptosis esta inhibida.

Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 4.25, a 24 h la activación de la caspasa 3 parece ser responsable, al menos en parte de la muerte inducida por el sorafenib en las células que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, no así en las que están silenciadas de Bak, donde la activación de la caspasa 3 es igual al nivel basal. Por lo que según estos resultados la activación de la vía extrínseca no justifica la muerte inducida por el sorafenib en estas células por lo que se podría pensar en una ruta alternativa de muerte celular.



**Figura 4.25.**-Porcentaje de activación de caspasa 3 al incubar las células con 20 μM de sorafenib durante 24 h.

## 4.2.-El sorafenib muestra actividad antitumoral en modelos de mieloma múltiple *ex vivo* e *in vivo*

### 4.2.1.-El sorafenib muestra el mismo perfil de actividad frente a muestras de pacientes que el observado en las líneas celulares

Según los resultados mostrados el sorafenib es capaz de inducir muerte en células de líneas de mieloma múltiple, incluso en aquellas que, ya sea por sobreexpresión de proteínas antiapoptótica, por silenciamiento de proteínas proapoptóticas o por inhibición de las caspasas, tienen inhibida la apoptosis.

Para estudiar el efecto de este fármaco en un modelo mejor y determinar si este fármaco pudiera tenerse en consideración para el tratamiento del mieloma múltiple, se procedió a realizar experimentos “*ex vivo*”.

En estos experimentos se contó con la colaboración de diferentes hospitales que proporcionaron muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple, tanto nuevos diagnósticos como pacientes de recaídas.

Las células plasmáticas mielomatosas se obtuvieron según apartado 3.8 y posteriormente se incubaron con diferentes dosis de sorafenib durante 24 y 48 h. Transcurrido este tiempo las células se marcaron con CD138-Fitc, CD56-PE, CD38-Tricolor y Anexina APC. En aquellos casos que se tenían suficiente células se realizó aislamiento de las células de mieloma múltiple por MACS (figura 4.26), se obtuvo una purificación mayor del 95%, y en aquellas muestras en que se tenían suficientes células, se procedió a lisar las células controles y tratadas para realizar western blot.

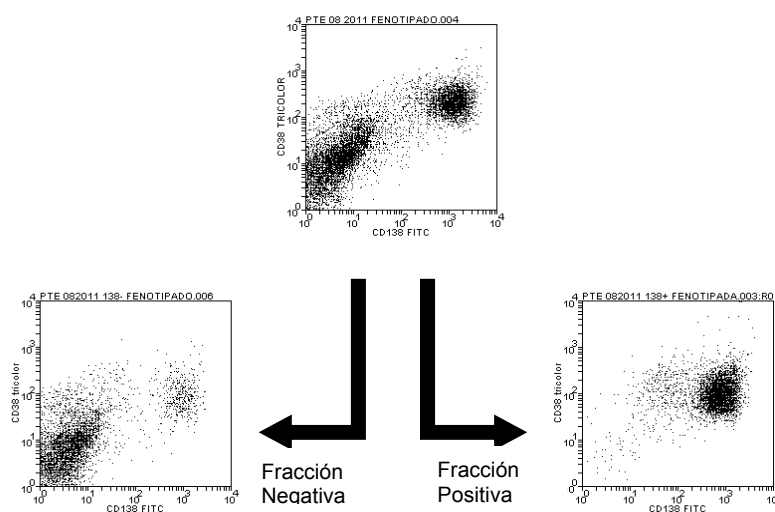
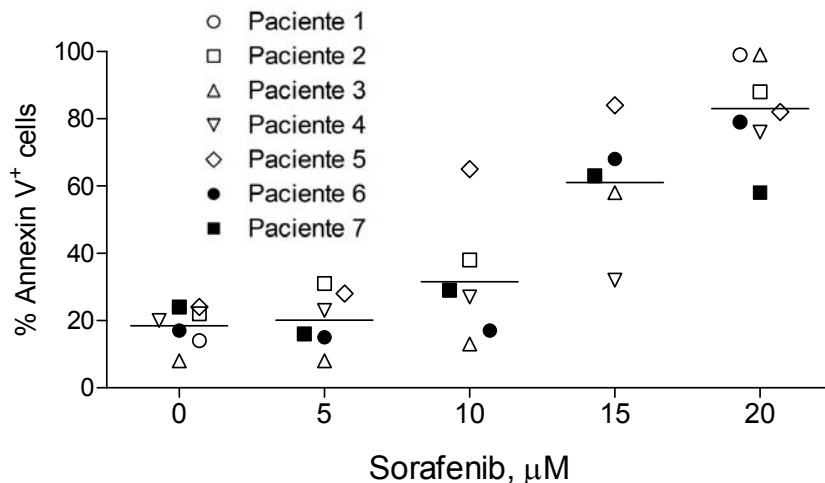


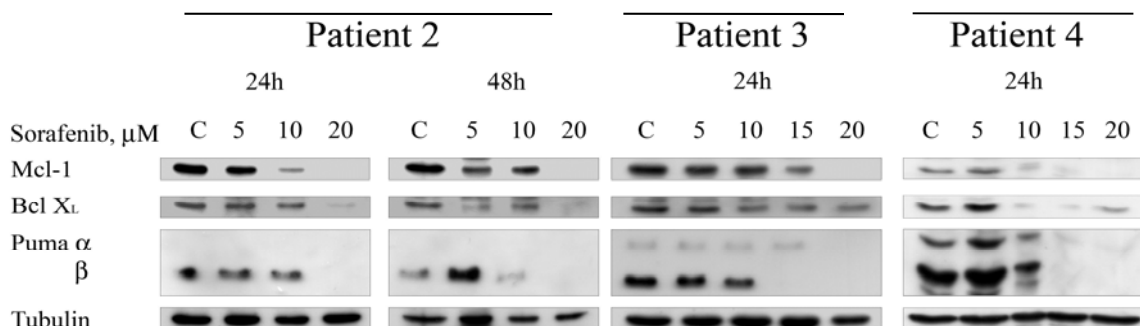
Figura 4.26.-Separación magnética de células CD138 positivas.

Como se muestra en la figura 4.27 el sorafenib es capaz de inducir apoptosis en todas las células plasmáticas mielomatosas analizadas, aunque con una sensibilidad variable de una paciente a otro. Las concentraciones siempre se encontraron dentro de los límites de los niveles plasmáticos que se alcanzan con la dosis que actualmente se usa en clínica.



**Figura 4.27.**-Citotoxicidad del sorafenib en células plasmáticas de pacientes de mieloma múltiple.

En las muestras de pacientes de las que se pudo analizar por western blot la expresión de proteínas se observó un comportamiento similar al observado en las líneas celulares. Los niveles de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> disminuyeron con el aumento de la dosis y la inducción de apoptosis. Comportamiento similar se observó con la proteína antiapoptótica Puma, aunque a dosis baja (5 µM) en el paciente 4 se observó un ligero aumento no detectado en el resto de las muestras de pacientes. Como se mencionó anteriormente, la proteína Puma puede tener un papel importante en la inducción de la apoptosis por este fármaco, pero solo se aprecia su aumento en los casos en que las caspasas están inhibidas o en momentos iniciales de la inducción de la apoptosis, ya que posteriormente parece ser degradado por las mismas caspasas.



**Figura 4.28.**-Efecto del sorafenib sobre la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en células plasmáticas de pacientes de mieloma múltiple.

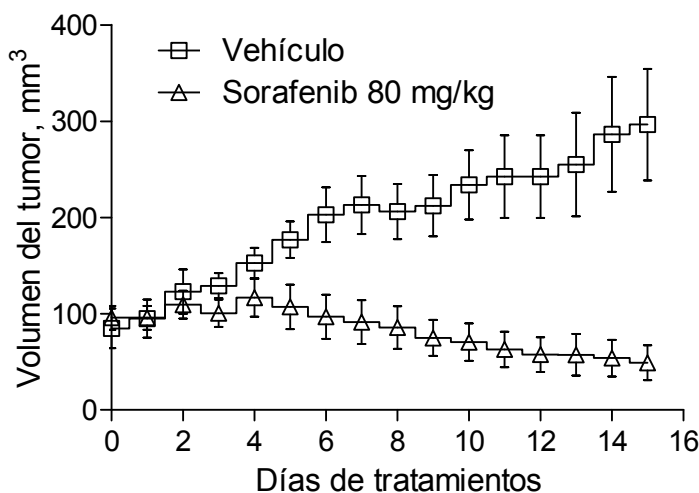
En la muestra del paciente 4 se observó que a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  el porcentaje de muerte es prácticamente igual al basal, sin embargo, se detectó una marcada disminución de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub>. Esto indica que si bien, el aumento de Puma es necesario para el inicio de la inducción de la apoptosis, la disminución de los niveles de Mcl-1 y Bcl-X<sub>L</sub> son necesarias para que la apoptosis se ejecute en la célula.

#### 4.2.2.-El sorafenib es activo *in vivo* en tumores generados en ratones nude

Para determinar si el sorafenib *in vivo* tenía un comportamiento similar al observado *in vitro*, se inyectó, de forma subcutánea,  $1 \times 10^6$  células de NCI-H929 en ratones Nude. Una vez que los ratones desarrollaron los tumores, los ratones se dividieron, de manera aleatoria, en dos grupos: control y tratados. A los ratones tratados se les administraron 80mg/kg/día en dosis única por vía oral con cánula intragástrica. Mientras que al grupo control se le administró el vehículo usado para diluir el fármaco.

Los ratones se comenzaron a tratar una vez que los tumores habían alcanzado un volumen entre 50 y 100mm<sup>3</sup>. Los ratones se trataron diariamente durante 15 días. De igual forma cada día los ratones se pesaron y se midió el tamaño del tumor. El volumen del tumor se

determinó por la fórmula  $V = \frac{4}{3} \pi \times \left( \frac{A \times L \times T}{2} \right)$



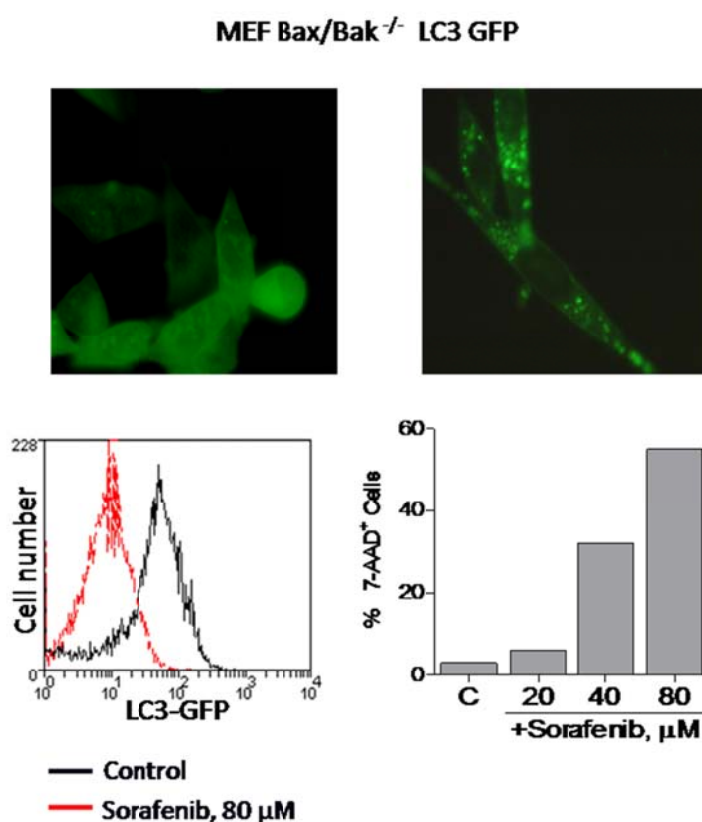
**Figura 4.29.**-Efecto del sorafenib sobre el volumen tumoral en ratones nude implantados con células de la línea H929.

En la figura 4.29 se aprecia como el sorafenib retrasa el crecimiento de los tumores e incluso, en algunos casos, provoca la desaparición casi completa del tumor, mientras que los controles siguen creciendo. Esto demuestra que el efecto citotóxico del sorafenib se mantiene en

tumores de mieloma múltiple *in vivo*. La concentración plasmática alcanzada con las pautas de dosificación actualmente en uso está entre 10-20  $\mu\text{M}$ . No obstante, el sorafenib se une a las proteínas plasmáticas por lo que la concentración efectiva que alcanza el sorafenib en el sitio del tumor puede ser mucho mayor. Esto puede justificar, en parte, el efecto provocado por el sorafenib en la inhibición del crecimiento de los tumores implantados en los ratones.

### 4.3.-El sorafenib induce autofagia células de mieloma múltiple

Según la figura 4.1 el sorafenib inhibe los complejos mTORC1 y mTORC2 los cuales entre otras funciones provocan la activación de la autofagia cuando son inhibidos.



**Figura 4.30.**-Inducción de autofagia en Fibroblastos embrionarios de ratón Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup>.

Debido a los resultados observados al incubar las células con sorafenib, se decidió analizar la capacidad de inducción de autofagia por parte de este fármaco. Esta descrito que este proceso celular está implicada en la muerte celular, ya sea protegiendo la célula de la apoptosis o en la muerte celular asociada a autofagia.

Como primera aproximación se trataron las células MEF Bax/Bak<sup>-/-</sup> LC3-GFP con diferentes dosis de sorafenib durante 24 h y se analizó por citometría la muerte celular y la inducción de autofagia mediante marcaje con 7AAD y la disminución de los niveles de la LC3-GFP

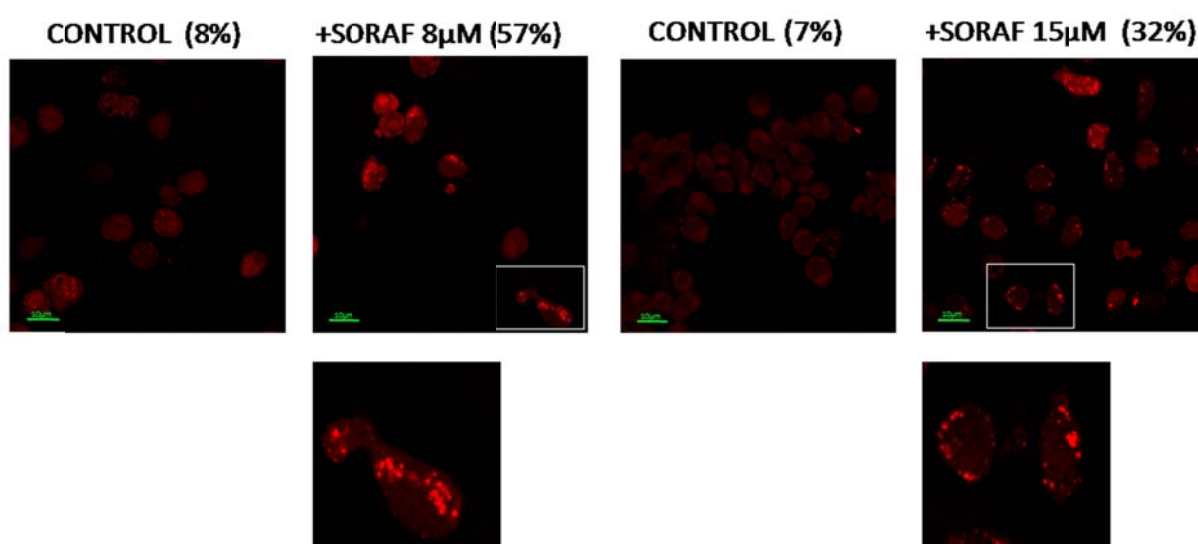


respectivamente. Esto último ocurre cuando en la célula hay niveles altos de autofagia ya que parte de la LC3 es degradada en los propios autofagolisosoma y porque la fluorescencia de la GFP desaparece en los autofagolisosomas debido al pH ácido de los mismos.

En figura 4.30 se aprecia como el sorafenib induce autofagia en estas células, lo que se detecta gracia a la bajada de la fluorescencia de la LC3-GFP y al cambio del patrón de fluorescencia de la célula, de difusa por todo el citosol a punteada. Estas células son más resistente al sorafenib por lo que se necesitaron concentraciones más altas para inducir muerte.

Debido a estos resultados, se decidió obtener unas células de mieloma que sobreexpresarán la LC3-RFP para analizar si, en estas células, el sorafenib también era capaz de inducir autofagia.

Las células RPMI 8226 y 8226 Bcl-X<sub>L</sub> se tranfectaron con un plásmido que contenía la LC3 fusionada a la proteína fluorescente RFP mediante el uso de retrovirus. Luego por dilución límite se seleccionó un clon que sobreexpresaba de forma estable esta proteína de fusión. Y se incubaron con sorafenib durante 24 h. Como las 8226 Bcl-X<sub>L</sub> son más resistentes al sorafenib, se usó una dosis mayor, en este caso 15  $\mu$ M.



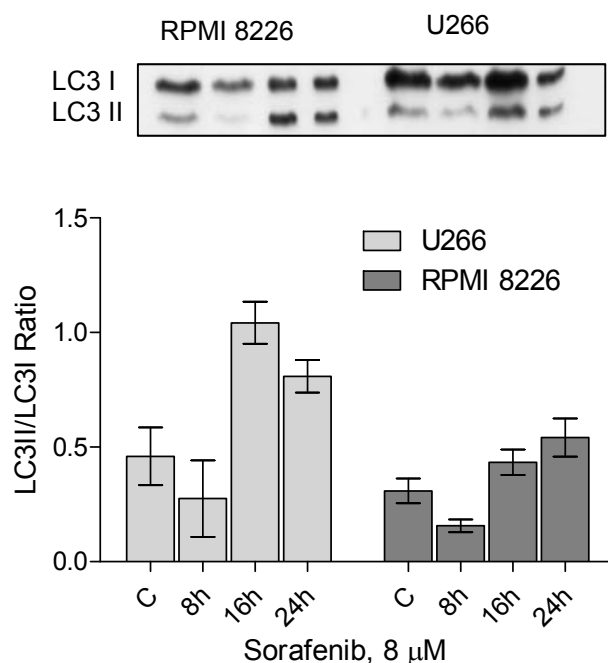
**Figura 4.31.**-Detección por microscopía de fluorescencia la inducción de autofagia en células de mieloma RPMI-8226 y 8226 Bcl-X<sub>L</sub> transfectadas con la proteína de fusión LC3-RFP.

Como se observa en la figura 4.31 se obtuvieron clones que sobreexpresaban la LC3-RFP y el sorafenib indujo autofagia en las dos líneas celulares ensayadas como lo muestra el cambio en el patrón de fluorescencia de difusa a punteada.

La proteína Bcl-X<sub>L</sub>, además de ser una proteína antiapoptótica, está implicada en la regulación de la autofagia, ya que esta descrito que es capaz de unirse a Beclina 1 y de esta forma inhibir la autofagia. Sin embargo, en estas células se ve como tanto en las RPMI-8226 como en las que se sobreexpresa Bcl-X<sub>L</sub> se induce autofagia por este fármaco. De hecho, en estas ultima se aprecia una mayor inducción de autofagia lo que se debe a que son más

resistente a la apoptosis o a la mayor dosis de sorafenib empleada.

La inducción de autofagia también se analizó por blots y se empleó un anticuerpo que reconocía la LC3-I y la LC3-II. Luego se cuantificó la intensidad de estas dos bandas y la relación entre ambas se usó como medida de autofagia.

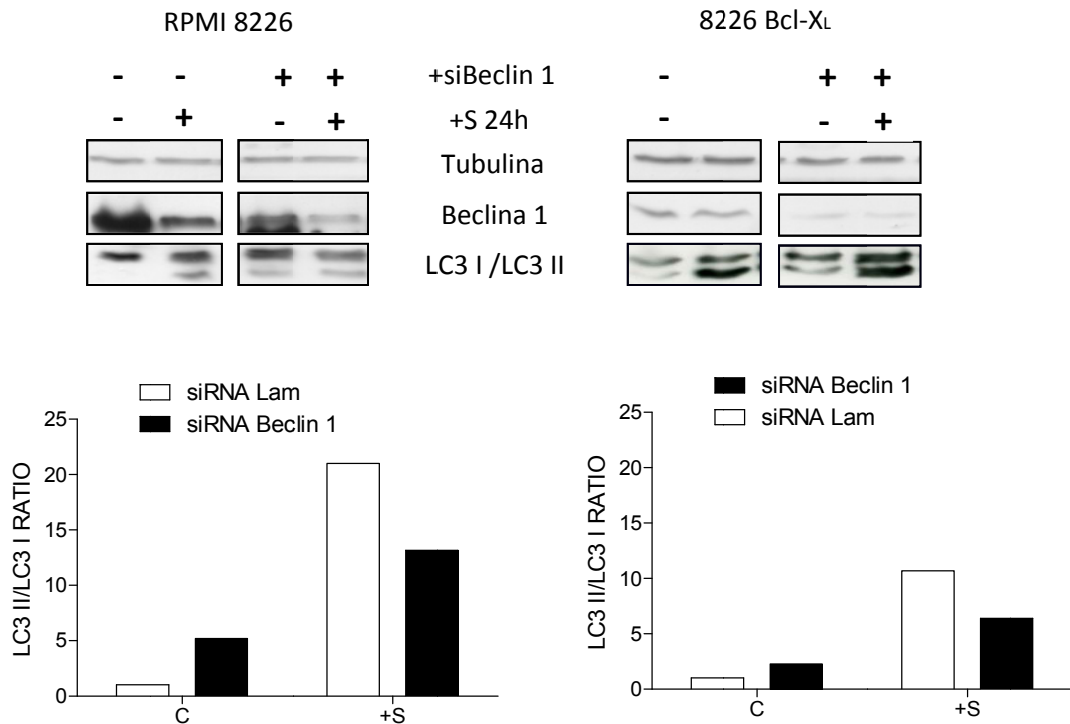


**Figura 4.32.**-Detección la proteína LC3-I y LC3-II por western blot como medida de la inducción de autofagia.

Como se muestra en la figura 4.32, por esta técnica también se corrobora la capacidad de inducir autofagia en las RPMI 8226 y se observa como en otras líneas celulares, en las U266, también el sorafenib es capaz de inducir autofagia. Según estos experimentos las células de mieloma presentan valores basales de autofagia los cuales aumentan al incubarse con sorafenib, alcanzándose los valores máximos a tiempos de 16 y 24 h.

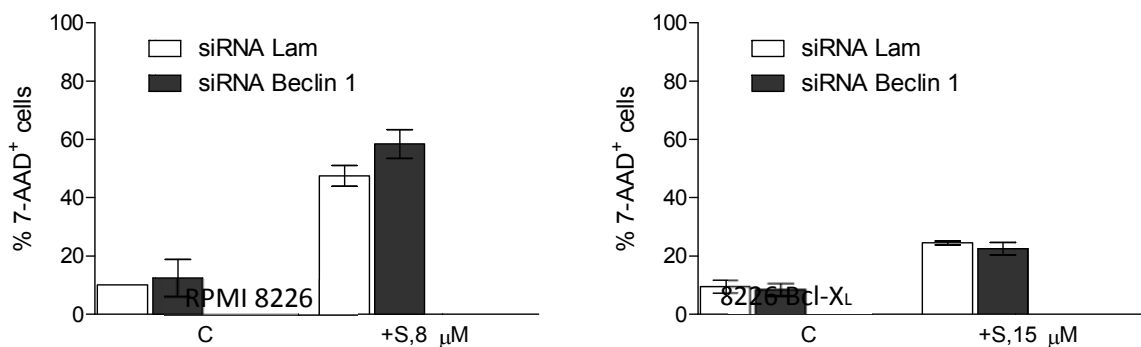
Según estos datos el sorafenib es capaz de inducir autofagia en las células de mieloma múltiples ensayadas, no obstante, este proceso celular puede tener un efecto protector de la apoptosis inducida por el sorafenib o puede que el sorafenib induzca muerte asociada a autofagia. Por lo que para analizar la implicación de la autofagia en la muerte inducida por sorafenib se inhibió la autofagia en estas células y se vio cómo responden al incubarlas con este fármaco. Para esto se silenció Beclina 1 por nucleofeción con siRNA de manera transitoria.

Como se muestra en le figura 4.33 solo se consiguió un silencimiento parcial, sin embargo suficiente para que se viera representado en los niveles de autofagias medida por la relación entre la LC3-II y la LC3-I.



**Figura 4.33.**-Silenciamiento de Beclina-1 en células RPMI 8226 y 8226-Bcl-X<sub>L</sub>

A pesar de esta disminución de los niveles de autofagia, solo se observó un ligero aumento en la muerte inducida por el sorafenib en las RPMI-8226 y prácticamente ningún efecto en las células de la línea 8226-BCL-X<sub>L</sub> (figura 4.34).

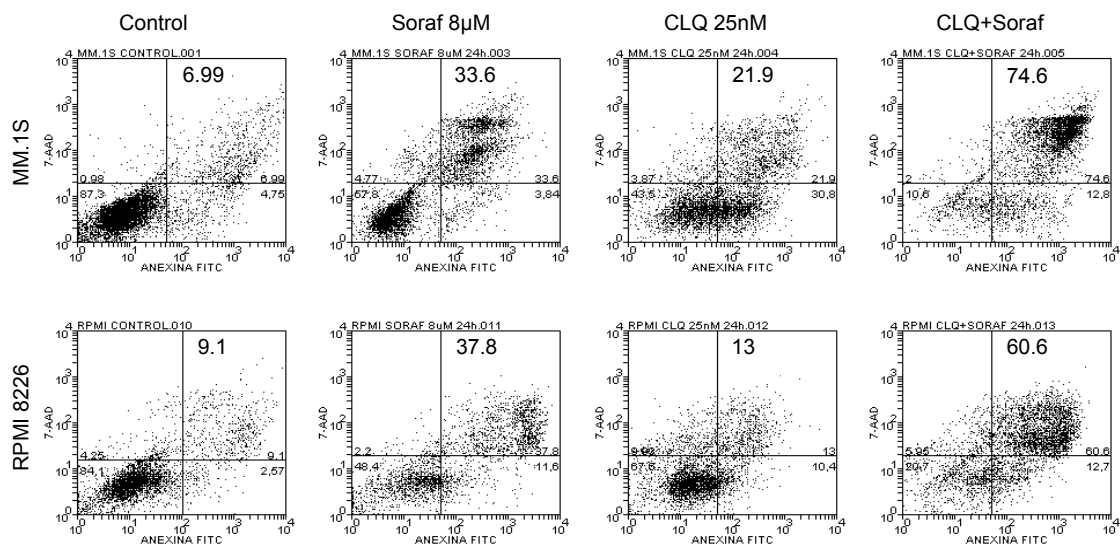


**Figura 4.34.**-Efecto del silenciamiento de Beclina-1 en células RPMI 8226 y 8226-Bcl-X<sub>L</sub> sobre la muerte inducida por el sorafenib.

Además de silenciar beclina-1, existen otras formas de inhibir la autofagia, como es el uso de drogas que pueden inhibir este proceso de diferentes maneras. Una de estas drogas es la cloroquina. Este es un fármaco, que entre otros efectos, inhibe la acidificación de los lisosomas y la fusión de estos con los autofagosomas, lo que Inhibe la autofagia e induce una acumulación de autofagosomas. Debido a esto también se usó esta estrategia para analizar el efecto que

tiene la inducción de autofagia sobre la muerte celular provocada por el sorafenib.

En este experimento se incubaron las células con cloroquina 25nM una hora antes de tratar las células con sorafenib durante 24h



**Figura 4.35.-**Efecto de la inhibición del flujo autofágico mediante cloroquina sobre la muerte inducida por el sorafenib en células MM.1S y RPMI 8226.

Como se aprecia en la figura 4.35 la inhibición de la autofagia con esta estrategia sí provocó un aumento marcado de la muerte inducida por el sorafenib. Por lo que con estos datos podemos decir que la autofagia que se genera cuando las células son incubadas con sorafenib parece tener un efecto protector de la muerte inducida por esta droga.

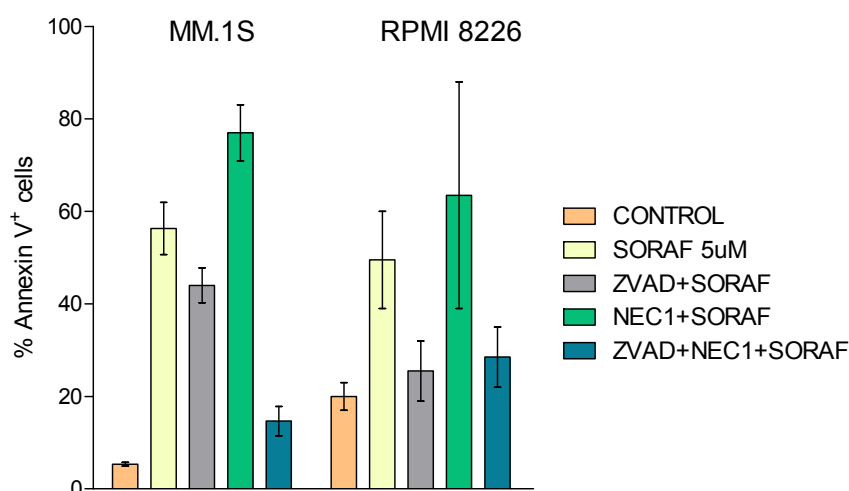
#### 4.4.-El sorafenib induce necroptosis en células de mieloma múltiple

Según los resultados obtenidos el sorafenib induce muerte apoptótica en las células de mieloma múltiple empleadas. No obstante, es capaz de inducir muerte en aquellas células en las que la apoptosis esta inhibida. La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programa. Sin embargo, existen otras formas de muerte celular descritas. Una de ellas es la necrosis programa o necroptosis.

Como se muestra en la figura 4.8 y 4.10, el ZVAD es incapaz de inhibir la muerte inducida por el sorafenib en las MM.1S, mientras que en las RPMI 8226 la inhibición es muy notable y en el resto de las líneas tiene un efecto parcial. Además, al incubar estas células con un inhibidor de caspasa 8 (IETD) y al tratarlas con sorafenib, aumenta la muerte (figura 4.8). Los modelos en que esta descrita la necroptosis tienen un comportamiento similar a las MM.1S al incubarlas inhibidores de caspasas. Por lo que se hipotetizó que el sorafenib puede estar induciendo necroptosis en esta línea celulares.

Para comprobar esta hipótesis se trataron las células con sorafenib previa incubación con

ZVAD, Necrostatina-1 (inhibidor de la necroptosis) y la combinación de los dos durante una hora antes de adicionar el sorafenib.



**Figura 4.36.**-Efecto de la inhibición del flujo autofágico mediante cloroquina en células MM.1S y RPMI 8226 sobre la muerte inducida por el sorafenib.

Como se muestra en la figura 4.36 la combinación de ambos inhibidores en las MM.1S provoca una disminución de la muerte inducida por el sorafenib mucho mayor que cualquiera de los dos inhibidores por sí solo. Además, la necrostatina aumenta la muerte inducida por el sorafenib, efecto similar al observado al inhibir la caspasa 8 con el IETD. Este efecto no se aprecia en el caso de la línea RPMI 8226 ya que en este caso el Z-VAD sí inhibe la muerte causada por el sorafenib, al menos a las concentraciones y tiempos ensayados en este experimento.

Según estos datos, la muerte independiente de caspasa descrita en el acápite 4.1.3 puede ser debida a la que el sorafenib es capaz de inducir necroptosis en aquellas células que las caspasas se encuentran inhibidas. Esto también podría explicar la muerte observada en aquellas células que tienen inhibida la maquinaria apoptótica, ya sea por sobreexpresión de proteínas antiapoptótica o por silenciamiento de proteínas proapoptóticas, en las cuales si se ve una protección de la muerte inducida por el sorafenib a tiempos cortos y dosis bajas pero no a tiempos largos y dosis más altas.

#### 4.5.-El Sorafenib muestra potencial en terapia combinada

En la práctica clínica habitual se suelen emplear combinaciones de fármacos para obtener mejores resultados terapéuticos y de esta forma atacar varias dianas terapéuticas y evitar la aparición de células resistentes y las recaídas. El mieloma múltiple es un buen ejemplo del empleo de estas combinaciones para el tratamiento de esta enfermedad.

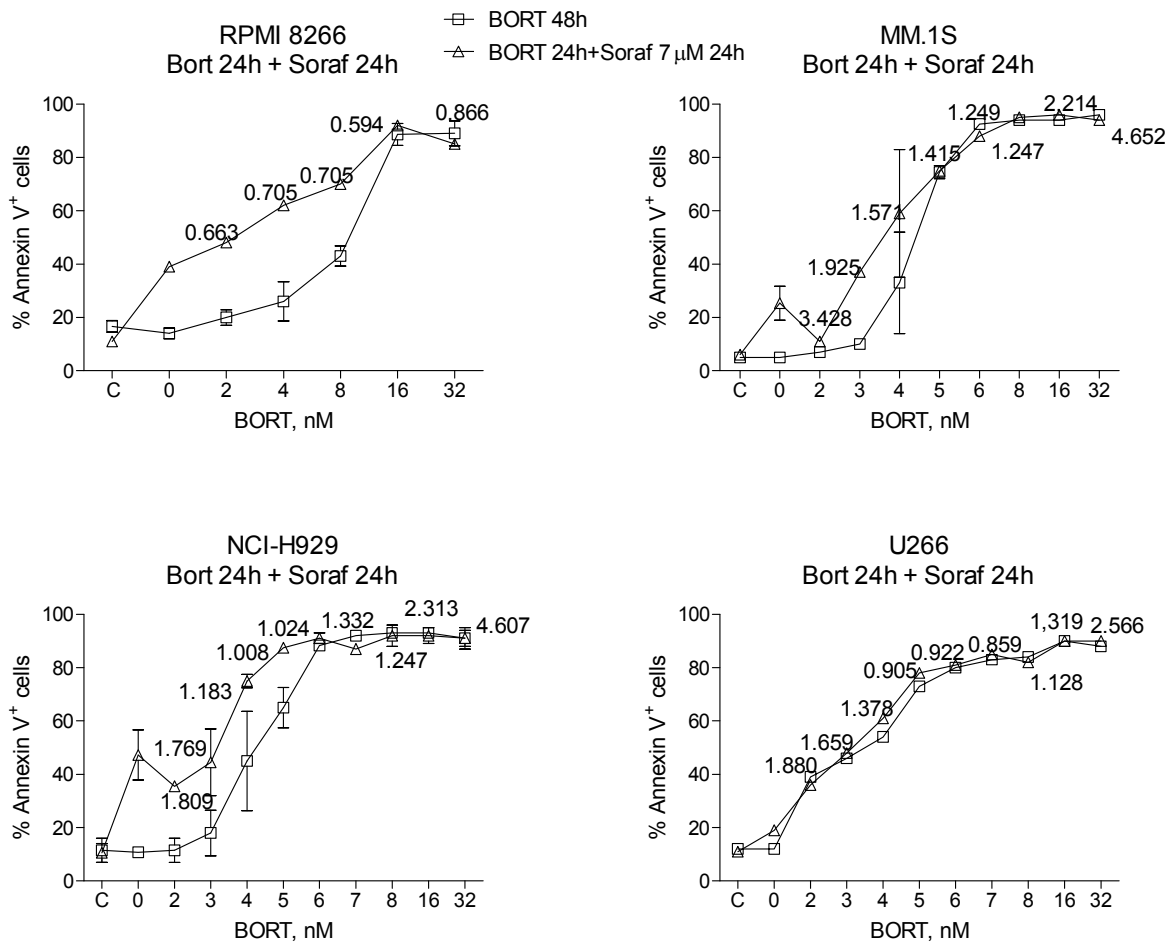
Debido a esto, en este trabajo se realizaron varias combinaciones de este fármaco con otras drogas que se usan en la práctica clínica para el tratamiento de esta patología, así como

con otros fármacos que podrían tener futuras aplicaciones para el tratamiento del mieloma múltiple.

### 4.5.1.-La combinación de Sorafenib y Bortezomib debe ser personalizada

El Bortezomib es un inhibidor del proteosoma que se utiliza actualmente en el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple en cualquier estadio de la enfermedad (Richardson et al. 2003). El funcionamiento óptimo del proteosoma es esencial para la supervivencia celular y las células plasmáticas tumorales tienen una gran necesidad de este mecanismo, en primer lugar porque todas las células tumorales tienen una alta tasa de recambio proteico, mayor que las células normales, y por otro lado porque las células plasmáticas tumorales son productoras de inmunoglobulinas y dependen en gran medida de un correcto funcionamiento del proteosoma.

A pesar de la mejora que ha supuesto el uso del bortezomib en el tratamiento del mieloma múltiple, el hecho es que esta enfermedad sigue siendo incurable, de aquí la necesidad de que se sigan buscando nuevas combinaciones con el bortezomib que mejoren el pronóstico de esta enfermedad.



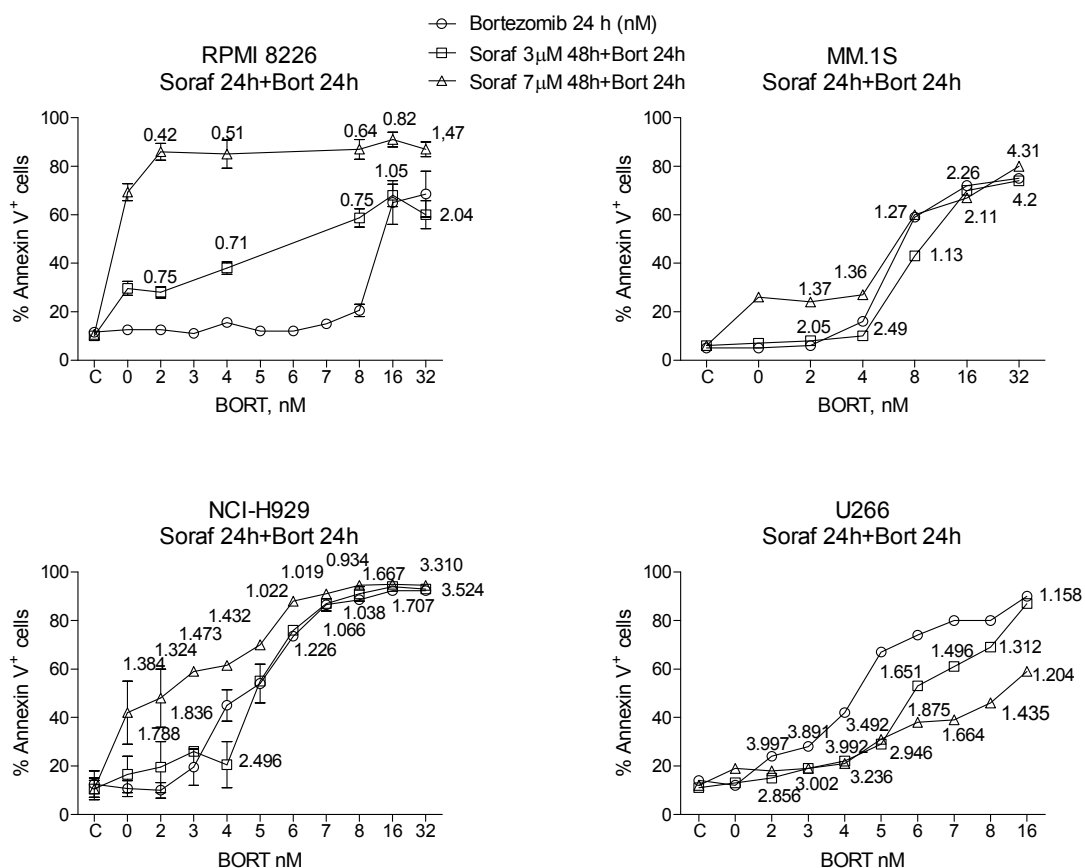
**Figura 4.37.-**Combinación de Bortezomib y Sorafenib. Las células se incubaron inicialmente con diferentes dosis de bortezomib y transcurrido 24h se incubaron con sorafenib 7 μM durante 24 h más. Como se observa solo en las 8226 se produjo un efecto sinérgico claro.

Se diseñaron varios experimentos para buscar si la combinación entre sorafenib y bortezomib pudiera tener un efecto sinérgico. En un primer experimento se incubaron las células con varias dosis de bortezomib durante 24 h, transcurridas estas, las células se incubaron con una dosis fija de sorafenib durante 24 h más.

Como se observa en la figura 4.37 solo se observó efecto sinérgico, determinado por el CI, en la línea RPMI 8226, mientras que en el resto de las líneas el efecto observado fue antagónico.

Como el resultado obtenido no fue el esperado ni el reportado en otros estudios (Yu et al. 2006a; Ramakrishnan et al. 2009) se decidió realizar el mismo estudio pero cambiando el orden en el cual se expusieron las células a los fármacos.

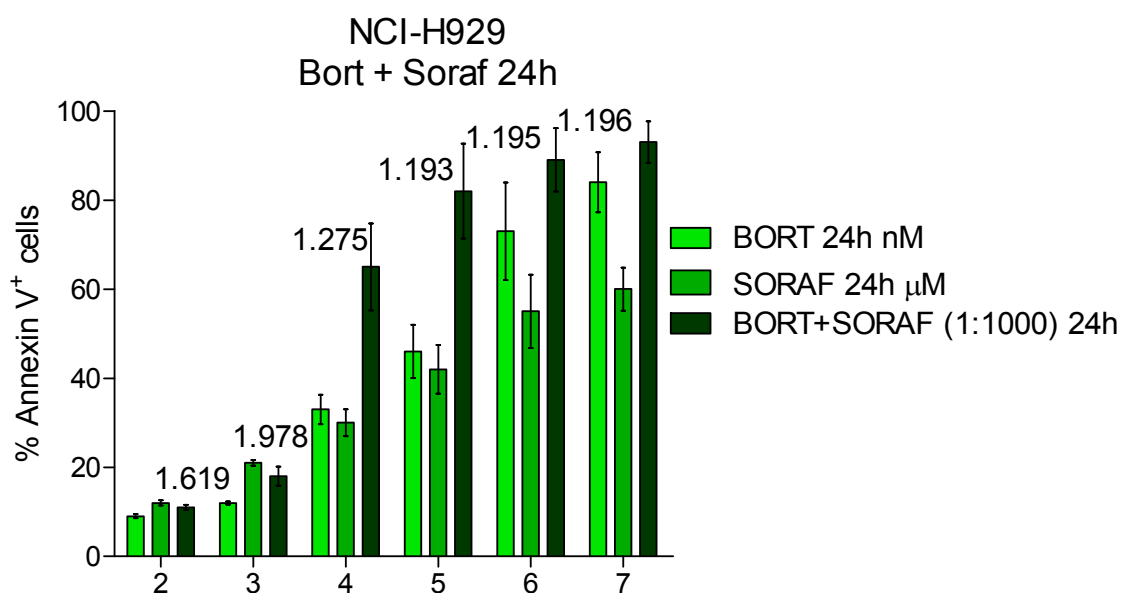
En un segundo experimento se cambio el orden en que se incubaron las células con cada fármaco y se usaron dos dosis diferentes de sorafenib, una baja, 3  $\mu$ M, que induce muy poca muerte y una más alta 7  $\mu$ M. Inicialmente se incubaron las células con sorafenib durante 24 h y posteriormente se incubaron con diferentes dosis de bortezomib. Como se muestra en la figura 4.38 se obtiene el mismo resultado que en el experimento anterior, solo se observa efecto sinérgico en la línea RPMI 8226, tanto a unas dosis bajas de sorafenib, 3  $\mu$ M, como a una dosis más alta 7  $\mu$ M. En el resto de las líneas, ninguna de las dosis ensayadas, mostró efecto sinérgico, más bien se detecto un efecto antagónico, siendo este más marcado en la línea U266.



**Figura 4.38.**-Combinación de Sorafenib y Bortezomib. Las células se incubaron inicialmente con dos dosis de sorafenib y transcurrido 24h se incubaron con diferentes dosis de bortezomib durante 24 h más. Como se observa solo en las 8226 se produjo un efecto sinérgico claro y llama la atención el efecto marcadamente antagónico observado en las U266.

Por último se decidió realizar un último experimento en el que se incubaban las células simultáneamente con los dos fármacos a una relación de concentración 1:1000. Para este experimento solo se escogió la línea NCI-H929 ya que en esta línea, a algunas dosis se apreció un efecto aditivo.

Como se observa en la figura 4.39, tampoco se observó ningún efecto sinérgico en esta línea, tampoco se observó el ligero efecto aditivo hallado en los experimentos anteriores. En cambio, se observó el mismo efecto antagónico previamente descrito, el cual, fue mucho mayor a las dosis más bajas.



**Figura 4.39.**-Incubación simultanea con Bortezomib y sorafenib. Las células se incubaron simultaneamente con sorafenib y bortezomib en una relación 1:1000 durante 24 h. Como se observa no se detectó ningún efecto sinérgico, si no antagónico, muy marcado éste a las dosis más bajas.

Aunque previamente se había reportado que la combinación de sorafenib y bortezomib podrían tener un efecto sinérgico, en este estudio se demuestra que esta combinación puede tener un efecto altamente variable pudiendo provocar un efecto antagónico en unas líneas, ligeramente aditivo en otras y mostrando un potente efecto sinérgico en otras. Este resultado no descarta la posibilidad del uso combinado de estos dos fármacos, si no que refuerza la necesidad de que la implementación de tratamientos personalizados con el objetivo de aprovechar el máximo potencial terapéutico del arsenal farmacológico disponibles en el mercado.

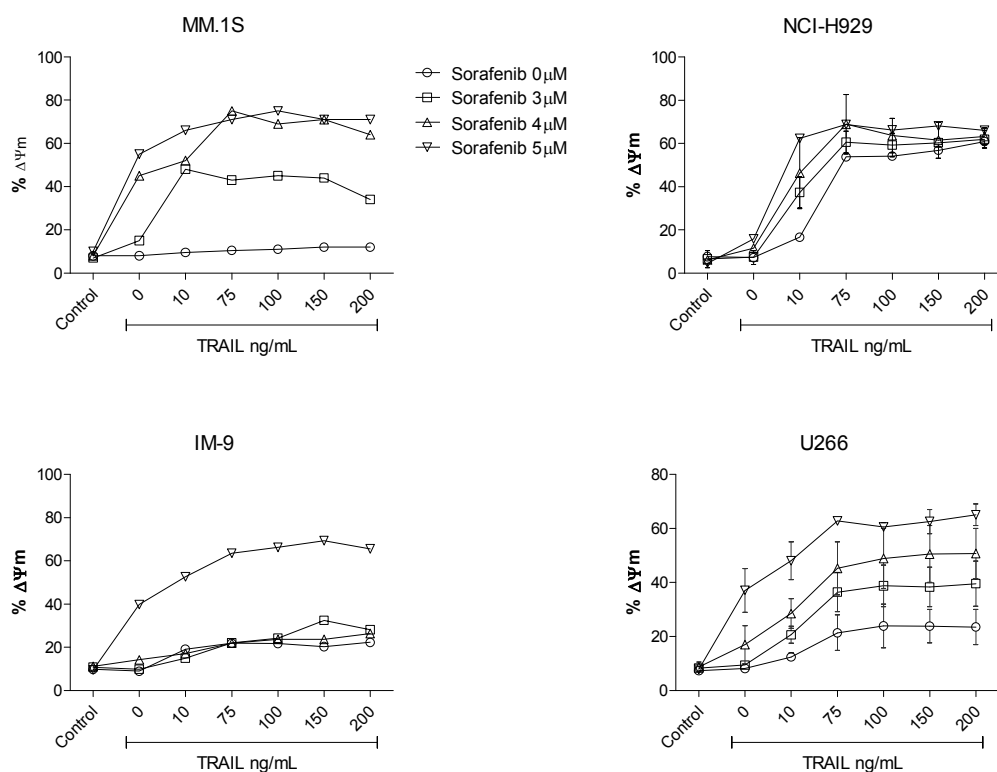
#### 4.2.2.- El Sorafenib sensibiliza a células a Apo2L/TRAIL

Apo2L/TRAIL es un ligando mortal que es capaz de inducir apoptosis en líneas de MM. Sin embargo, no todas las células de mieloma son sensibles a Apo2L/TRAIL. La sensibilidad depende de varios factores como pueden ser la expresión de los receptores de muerte DR4 ó DR5, la expresión de la caspasa 8 o la facilidad de estos receptores para oligomerizar. Por



ejemplo, las células tumorales de pacientes con mieloma múltiple refractario a menudo dejan de expresar los receptores DR4 y DR5, lo que aumenta la resistencia a Apo2L/TRAIL de estos pacientes.

Se decidió evaluar el efecto de la combinación de sorafenib con Apo2L/TRAIL, con el objetivo de ver si células que fueran poco sensibles a Apo2L/TRAIL podrían ver aumentada su sensibilidad al ser tratadas con esta droga. Se usaron 4 líneas celulares, 3 de mieloma y una leucemia las que en estudios anteriores en este laboratorio habían mostrado ser poco sensible a Apo2L/TRAIL.

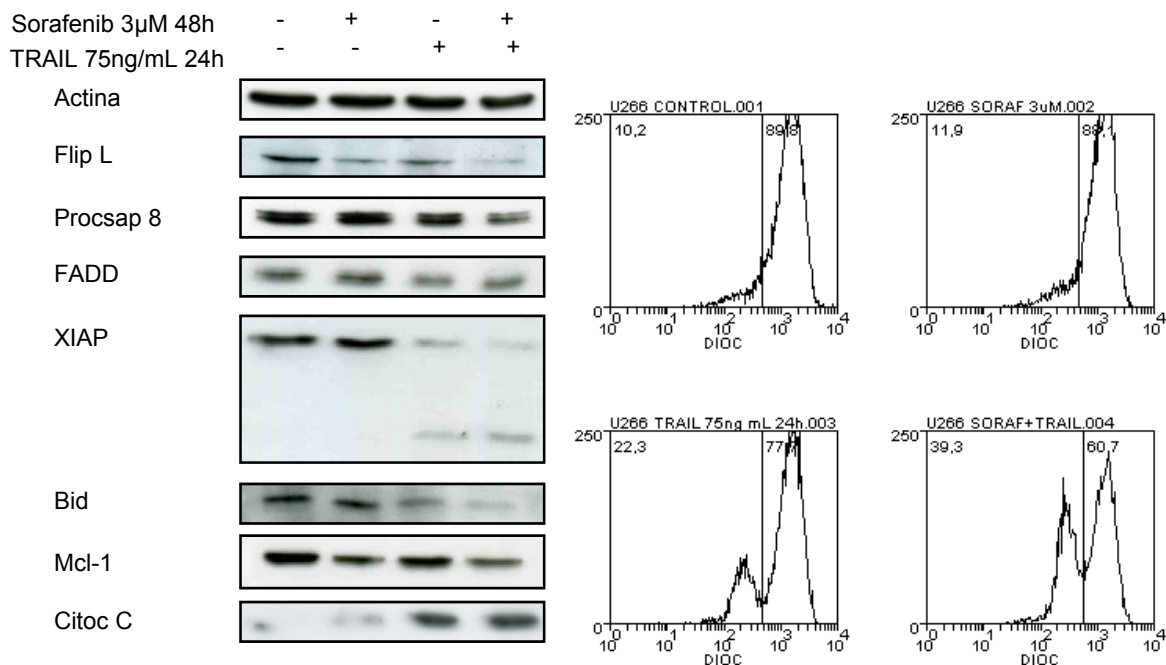


**Figura 4.40.-**Efecto sensibilizador de sorafenib a la inducción de muerte mediada por APO2L/TRAIL. Las células se incubaron previamente con sorafenib durante 24 h. transcurrido este tiempo se adicionaron dosis creciente de APO2L/TRAL durante 24 h más. En todos lo casos se observo un efecto sencibilizador por parte del sorafenib.

Con estas líneas se realizaron curva dosis respuestas de Apo2L/TRAIL previa incubación durante 24 h con sorafenib a tres dosis diferentes. Como se muestra en la figura 4.40 se observo una potenciación del efecto de Apo2L/TRAIL, incluso a dosis bajas de este ligando mortal. Aunque el efecto observado fue variable de una línea a otra, se observo el efecto mas significativo en las MM.1S y en las U266, en las cuales, incluso la dosis más bajas de sorafenib, la cual por si sola no induce muerte, logro potencia significativamente el efecto citotóxico de Apo2L/TRAIL.

Para tratar de analizar el mecanismo por cual el sorafenib contribuye a sensibilizar las células a Apo2L/TRAIL se escogió la línea celular U266 y las dosis de sorafenib de 3 μM y

Apo2L/TRAIL 75 ng/mL. Tras 24 h de incubación con sorafenib se adicionó Apo2L/TRAIL durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se midió la inducción de apoptosis y se lisaron las células para analizar la expresión de proteínas.



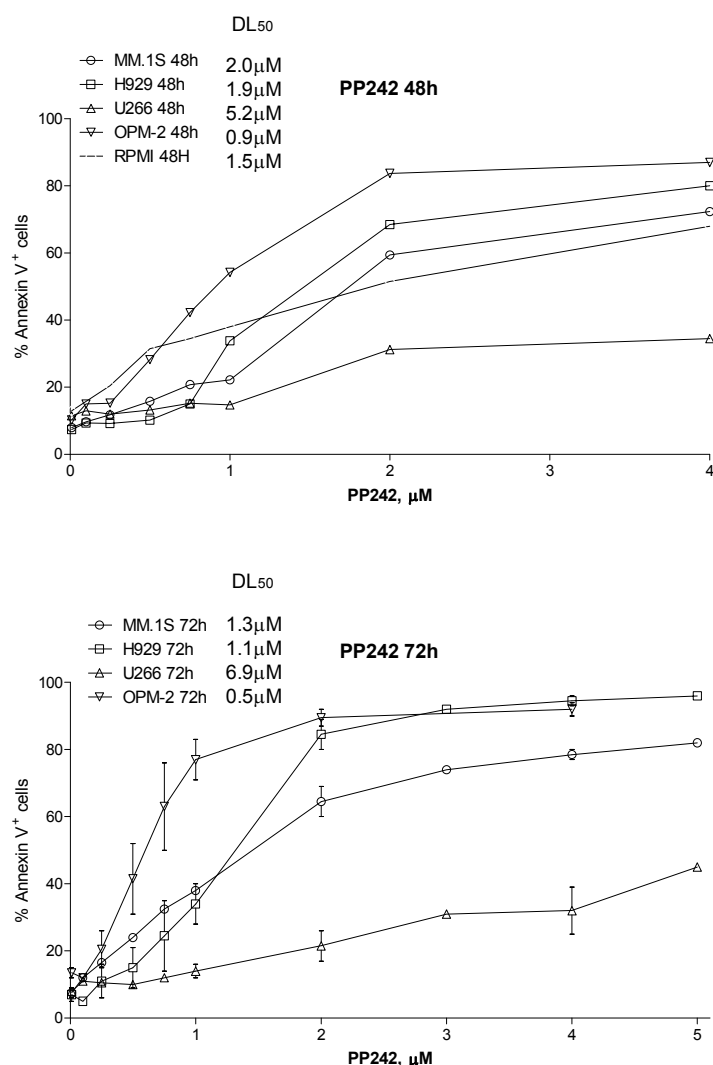
**Figura 4.41.**-Análisis de la expresión de proteínas tras el tratamiento de la línea U266 con Sorafein y TRAIL. Se observa una mayor salida de citocromo c, procesamiento de caspasa 8 y Bid.

Como se muestra en la figura 4.41 la dosis de sorafenib empleada no induce muerte, no obstante, induce disminución de los niveles de las proteínas: Flip, Mcl-1 y procesamiento de Bid. Por otro lado, Apo2L/TRAIL sólo induce una ligera caída del potencial de membrana (22%) lo que se corresponde con la salida del citocromo c de la mitocondrial. Por lo que en estas células TRAIL está induciendo la activación de la vía mitocondria atreves del procesamiento de Bid lo que se corresponde con la disminución de los niveles de esta proteína observado por western blot.

Sin embargo, al incubar estas células con sorafenib y TRAIL aumenta la caída del potencial mitocondrial con la consiguiente mayor salida de citocromo c observada por western blot y el procesamiento de la caspasa 8. Este efecto sinérgico observado entre estos dos fármacos puede deberse a el efecto de la proteína proapoptótica tBid inducida por TRAIL que puede ser mayor por la bajada de Mcl-1 inducida por el sorafenib. Por otro lado el sorafenib parece inducir un aumento de la proteína adaptadora FADD lo cual provocar una mayor eficiencia en la formación del DISC induciendo de esta forma una mayor señalización de TRAIL hacia el interior de la célula.

### 4.2.3.-Sorafenib muestra un gran potencial en la combinación con varios fármacos

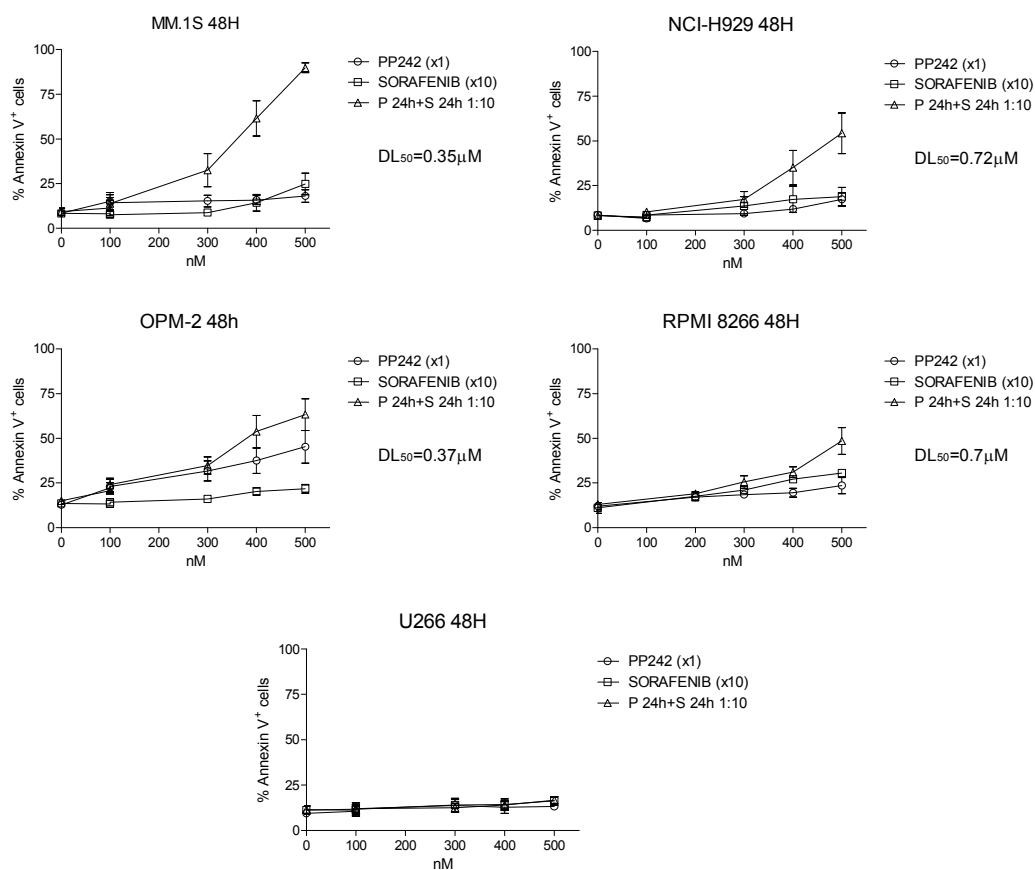
Debido al mecanismo de acción del Sorafenib, este fármaco tiene utilidad en la clínica no solo por su capacidad para inducir muerte celular, sino también, por tener propiedades antiangiogénicas (Chang et al. 2007). Este es un proceso fundamental para el progreso del tumor. Sin embargo, en la práctica clínica los beneficios de este tipo de fármacos son transitorios y eventualmente el tumor progresa por lo que se requiere el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que refuerces el efecto de estos fármacos. mTORC también es clave en la regulación del crecimiento celular, proliferación y supervivencia, además de angiogénesis. Por lo que numerosos estudios han demostrado que el bloqueo de mTORC reduce el crecimiento tumoral. Pese a esto, existen numerosas evidencias que sostienen que la inhibición de mTORC resulta en una retroalimentación negativa que activa Akt y la vía Ras/Raf-1/MEK/ERK lo que reduce los efectos beneficiosos de este tipo de fármacos.



**Figura 4.42.**-Dosis respuesta de las líneas de mieloma durante 48 y 72 h de exposición a PP242. Los cálculos se incubaron con una concentración creciente de PP242 durante 48 y 72 h y posteriormente se analizó la muerte celular por citometría de flujo mediante la exposición de fosfatidil serina.

Recientemente se han desarrollado muchas moléculas capaces de inhibir mTORC de forma selectiva, tanto el complejo 1 como el 2. Sin embargo los beneficios clínicos siguen siendo menos exitosos que lo esperado, posiblemente por el efecto anteriormente descrito. Debido a esto seleccionamos dos compuesto que son inhibidores de mTORC para analizar si sus efectos se veían reforzado por el uso simultaneo con Sorafenib un potente inhibidor de la vía de señalización Ras/Raf-1/MEK/ERK.

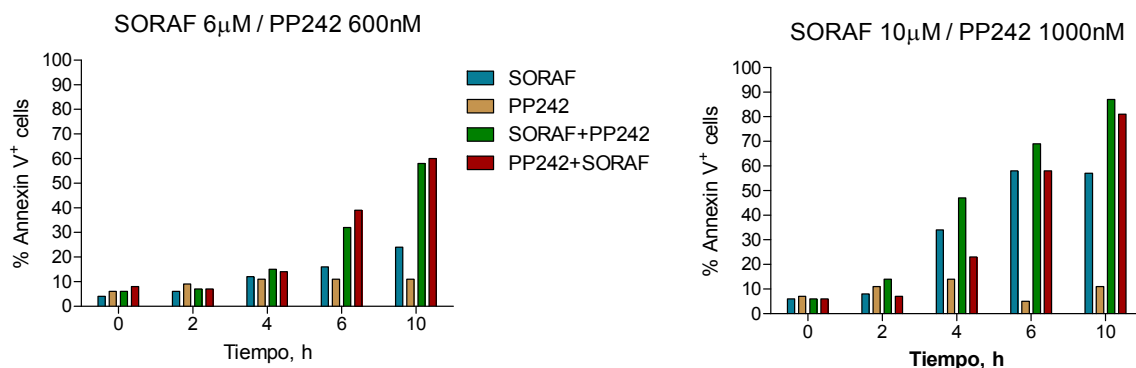
Los fármacos seleccionados fueron OSI-027 y PP242. Estos son inhibidor de TORC1 y TORC2 con actividad significativamente mayor que la rapamicina. Y como se muestran en la figura 4.42, con excepción de las U266, todas las líneas fueron sensibles a PP242, no obstante las línea OPM-2 resulto ser la más sensible como se esperaba ya que la misma presenta mutación en PTEM por lo que presenta una alta actividad de esta vía de traducción de señales y es muy dependiente de la vía PI3K/AKT/mTORC



**Figura 4.43.**-Efecto del tratamiento de las células de MM con sorafenib seguido de PP242. Las células se incubaron 24 h con el sorafenib seguido de 24 h más con PP242. El mayor efecto potenciador de la muerte se observó en la línea MM.1S.

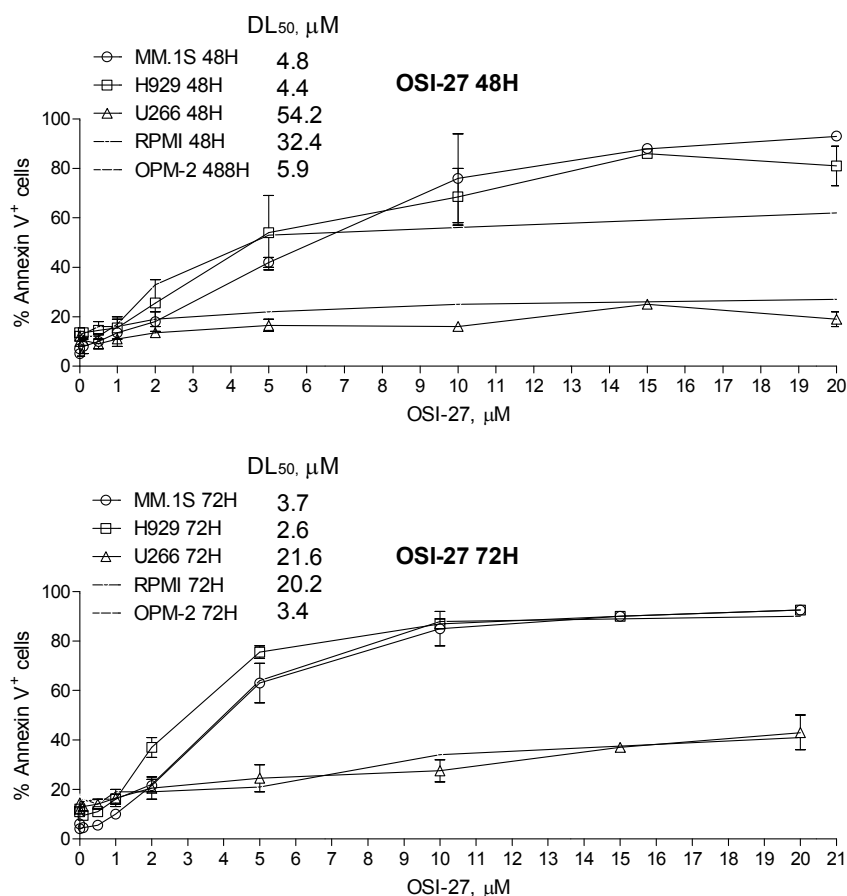
Para analizar si el sorafenib tenía algún efecto sinérgico en la apoptosis inducida por esta droga se incubaron las células, incluida las U266, con PP242 durante 24 h y se adicióno el sorafenib durante 24 h más. En todas las líneas, menos las U266, se observó que el sorafenib potenció el efecto del inhibidor de mTORC de manera significativa, aunque en las MM.1S fue donde se detectó el mayor efecto sinérgico. La dosis letal de PP242 en el caso de las MM.1S desciende de 2 μM a 0.35 μM al tratar las células simultáneamente con estos dos fármacos

(figura 4.43)



**Figura 4.44.**-Análisis de la influencia sobre la muerte celular que tiene el orden en el que las células son expuesta a diferentes fármacos.

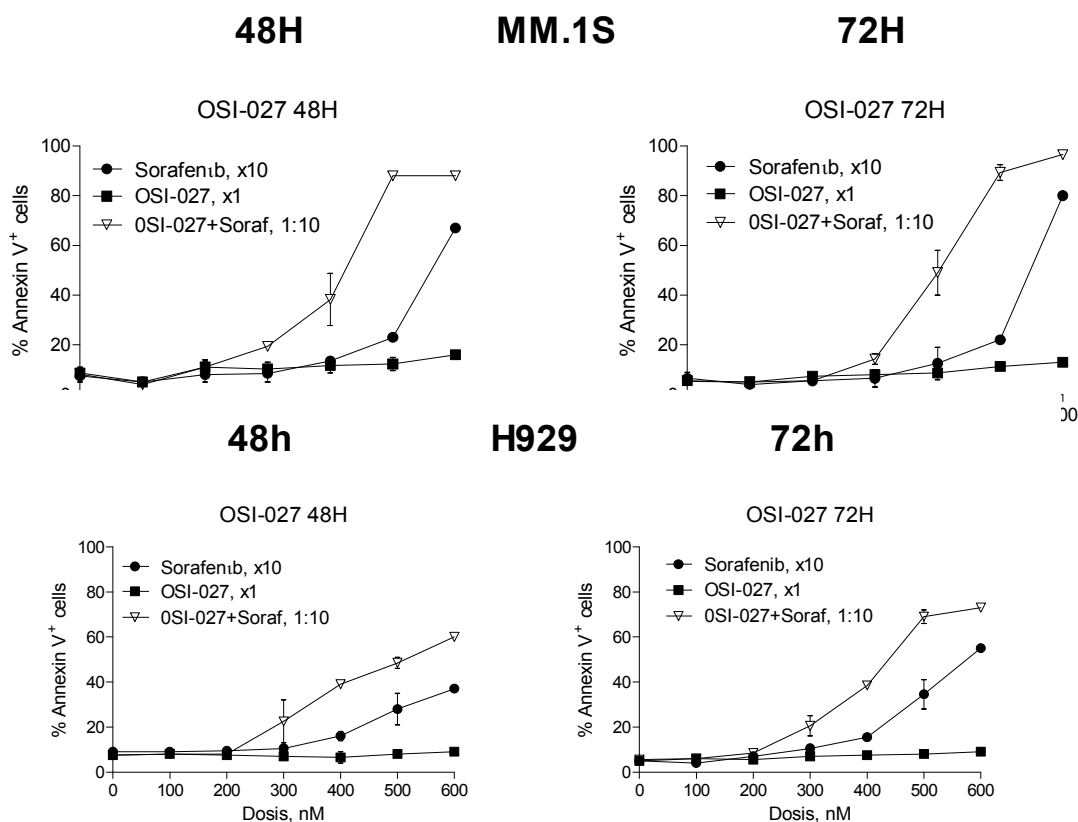
Debido a que al combinar algunos fármacos, el orden en que se administran los tratamientos puede influir en el resultado obtenido se realizó un experimento en el cual se incubaron las células inicialmente con sorafenib y luego con PP242 y viceversa. Como se observa en la figura 4.44 sólo a tiempos cortos (4 h) y dosis altas de sorafenib, 10 µM y 1 µM de PP242 se observó que el orden influye en los niveles de muerte inducida.



**Figura 4.45.**-Dosis respuesta de las líneas de mieloma durante 48 y 72 h de exposición a OSI-027. Las células se incubaron con una concentración creciente de PP242 durante 48 y 72 h y posteriormente se analizó la muerte celular por citometría de flujo mediante la exposición de fosfatidil serina.

Con el otro fármaco elegido, OSI-027, se realizó el mismo estudio. En este caso al realizar la dosis respuesta a 48 y 72 h, se observó el mismo resultado. Las U266 eran insensibles al efecto del inhibidor de mTORC con la diferencia de que las RPMI 8226 mostraron un comportamiento muy similar a las U266. Además, no se apreció que las OPM-2 fueran más sensibles ni que la efectividad del fármaco aumentara al prolongar el tiempo de incubación de 48 a 72 h.

Al combinar el inhibidor de mTORC con sorafenib, solo las MM.1S y las H929 mostraron un efecto sinérgico. Resultado que difirió mucho del observado con el otro inhibidor de mTORC, el PP242. No obstante, es importante destacar la marcada potenciación observada en estas dos líneas tanto por el PP242 como por el OSI-027.

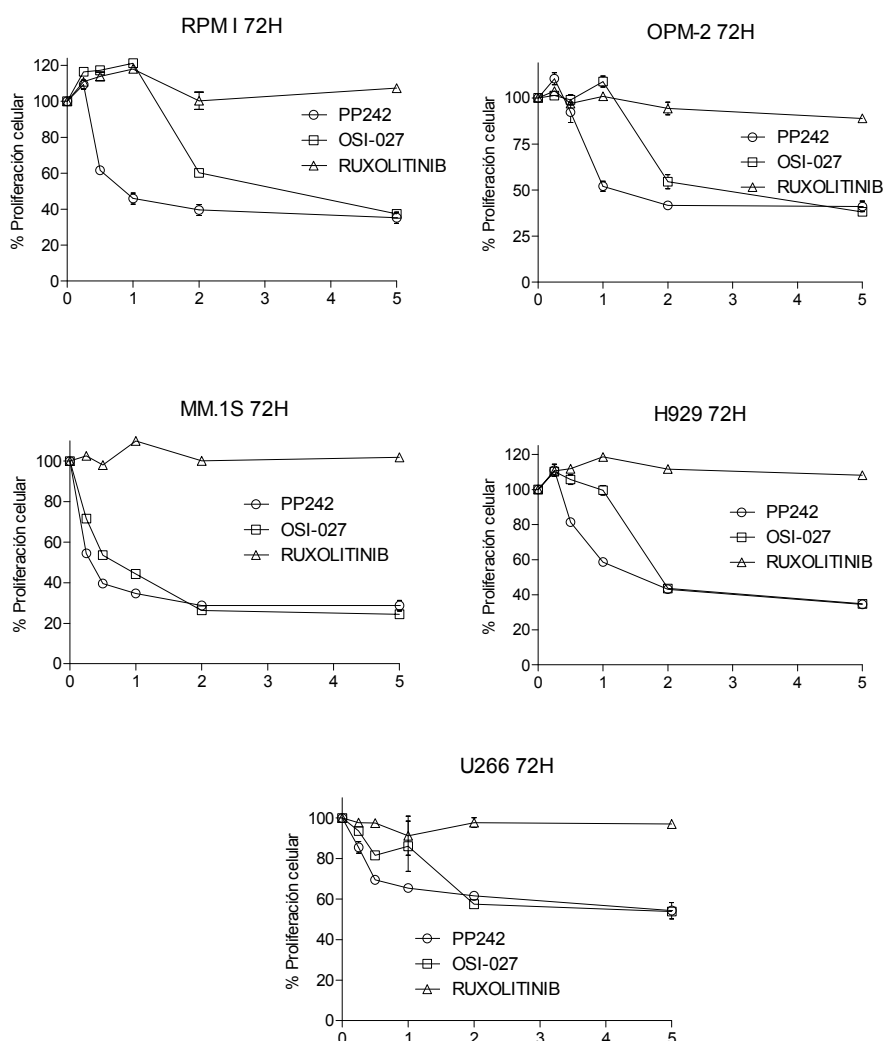


**Figura 4.46.**-Efecto del tratamiento de las células de MM con sorafenib seguido de OSI-027. Las células se incubaron 24 h con el sorafenin seguido de 24 h más con PP242. Se observó una marcada potenciación del efecto citotóxico al combinar estos dos fármacos en las líneas MM.1S y H929.

Con el uso de estos fármacos conseguimos inhibir dos de las principales vías de supervivencia y proliferación de las células tumorales. En el caso del sorafenib, la vía Ras/Raf-1/MEK/ERK, mientras que con el PP-242 y el OSI-027 la PI3K/AKT/mTORC. Sin embargo, en algunas de las líneas ensayadas, no se observó beneficio alguno al combinar estos fármacos. Por lo que decidimos usar un fármaco que fuera capaz de inhibir otra de las vías de supervivencia y proliferación. La vía de las Jak/Stat. Esta comprende las kinasas Jak1, Jak 2 (Janus-associated kinase 1 y 2) y Tyk2. Son un grupo de tirosín quinasas citoplasmáticas que funcionan transmitiendo señales intracelulares de receptores de factores de crecimiento mediante

la expresión de genes responsables de diversas funciones celulares como diferenciación, proliferación y resistencia a la apoptosis. Jak 1 es un conocido mediador de la IL-6 entre otras citoquinas. Jak es reclutado en la parte citoplasmática de estos receptores donde es activado por fosforilación y cambio conformacional. Posteriormente activa a Stat por fosforilación y dimerización. Una vez Stat es activada se trasloca al núcleo donde se une a zonas reguladoras y promueve la expresión de genes relacionadas con diferentes funciones celulares.

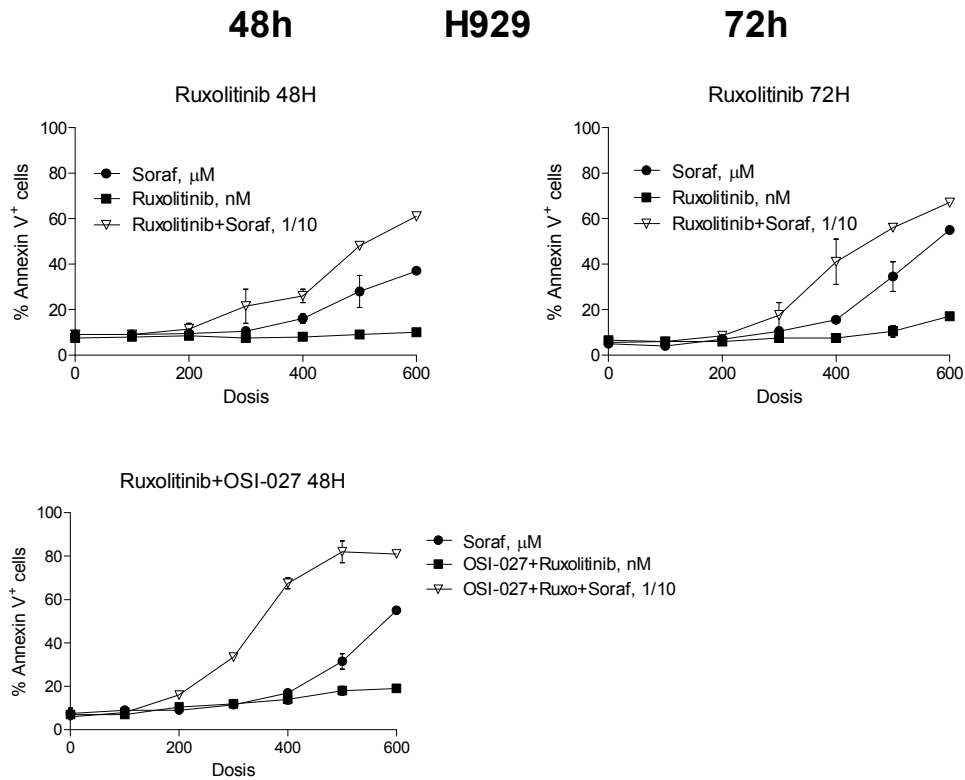
Uno de los fármacos recientemente aprobado por la FDA para su uso en humano como inhibidor de esta vía de señalización es el Ruxolitinib. Este es un potente inhibidor de Jak 1 y Jak 2 con una concentración inhibitoria (IC<sub>50%</sub>) de 3.3 nM y 2.8 nM respectivamente. Este fármaco no tiene efecto citotóxico en las células de mieloma en un rango de dosis de 0 a 5 μM (figura 4.47). No obstante al combinarlo con sorafenib y con OSI-027 si mostro potenciación de la citotoxicidad de estos dos compuestos.



**Figura 4.47.**-Efecto sobre la proliferación en las células de MM tras incubar con OSI-027, PP242 y Ruxolitinib. Las células se incubaron durante 72 h.

Las células se incubaron con ruxolitinib durante 24 h y posteriormente se adicionó sorafenib durante 24 o 48 h más. En la figura 4.48 se aprecia como en las H929, al combinar Ruxolitinib con sorafenib durante 48 o 72 h aumenta la apoptosis inducida, no obstante el

aumento es mucho mayor al incubar además con un inhibidor de mTORC durante 48 h.

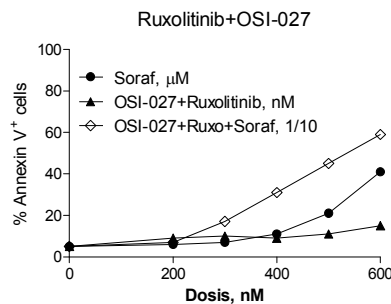


**Figura 4.48.**-Citotoxicidad inducida en las células NCI-H929 de MM tras incubar con OSI-027, Ruxolitinib y sorafenib. Las células se incubaron durante 24 h con ruxolitinib o con ruxolitinib+OSI-027, trascurridas 24 h se adiciona sorafenib durante 24 o 48 h más. El efecto citotóxico se midió por exposición de fosfatidil serina.

En el caso de las OPM-2 también se observó un aumento significativo al incubar las células con estos tres fármacos, figura 4.49, en este caso durante 72 h, es decir 24 h con ruxolitinib+OSI-027 y posteriormente se adiciona durante 48 h el sorafenib. Estas células debido a la mutación en PTEM son sensibles a los inhibidores de mTORC, Sin embargo, se observa un mayor efecto al combinarlo con un inhibidor de Ras/Raf-1/Mek/Erk y Jak/Stat.

### OPM-2

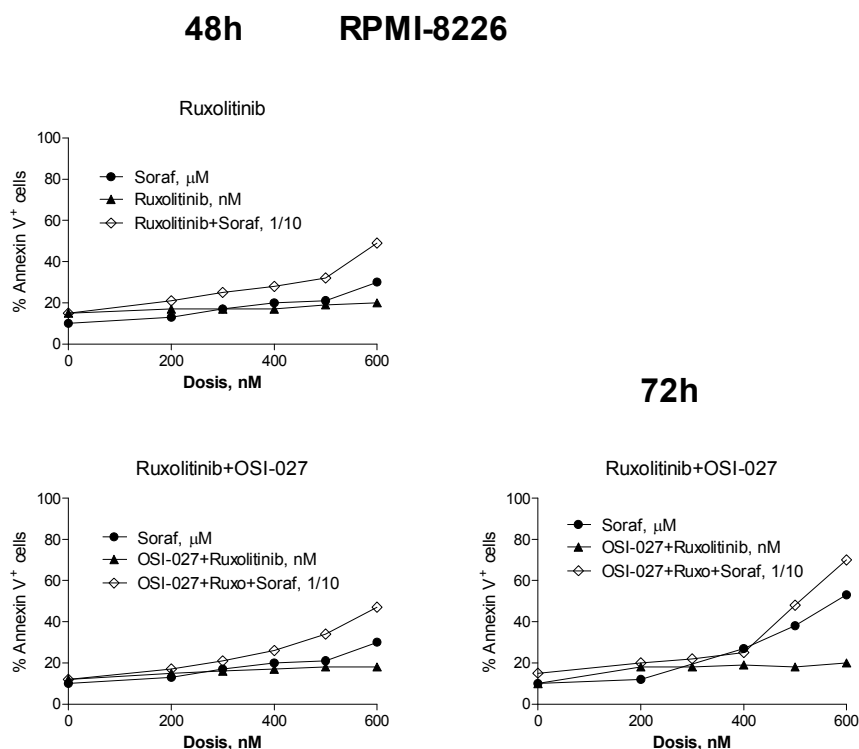
72h



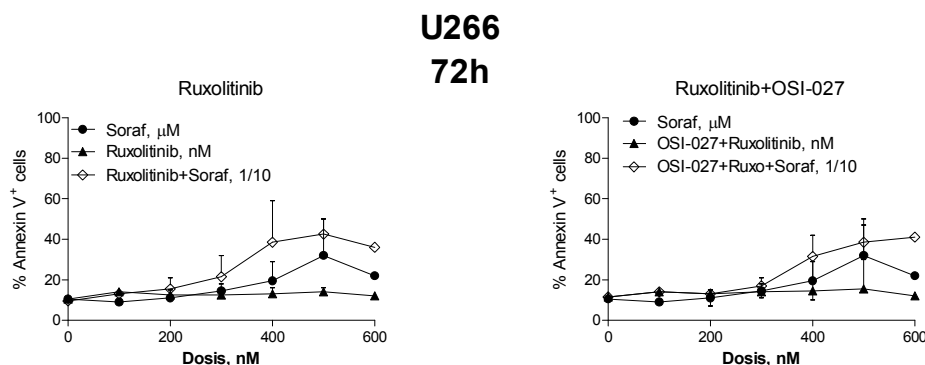
**Figura 4.49.**-Citotoxicidad inducida en las células OPM-2 de MM tras incubar con OSI-027, Ruxolitinib y sorafenib. Las células se incubaron durante 24 h con ruxolitinib+OSI-027, trascurridas 24 h se adiciona sorafenib durante 48 h más. El efecto citotóxico se midió por exposición de fosfatidil serina.



Efecto similar aunque mucho más modesto se observa en las RPMI 9226, figura 4.50, aunque si se tiene en cuenta que el OSI-027 es prácticamente inactivo frente a estas células se puede decir que al combinar con ruxolitinib se consigue un aumento significativo de la actividad de estos fármacos. En el caso de la línea U266 que no mostró ser sensible a ninguno de los inhibidores de mTORC, llama la atención que si aumentó la inducción de la apoptosis al incubarlo con ruxolitinib. Lo que podría sugerir que la vía de las Jak/Stat tiene mayor importancia en unas líneas celulares que en otras.



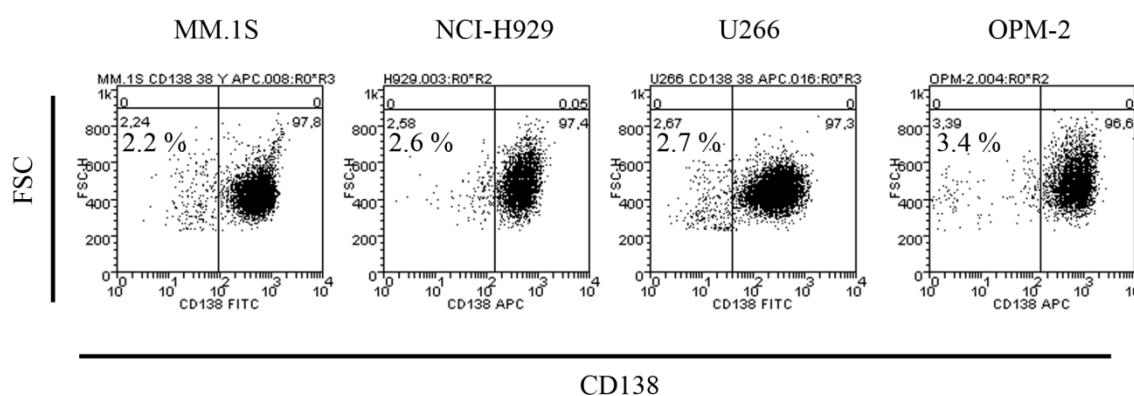
**Figura 4.50.**-Citotoxicidad inducida en las células RPMI 8226 de MM tras incubación con OSI-027, Ruxolitinib y sorafenib. Las células se incubaron durante 24 h con ruxolitinib+OSI-027, trascurridas 24 h se adicionó sorafenib durante 48 h más. El efecto citotóxico se midió por exposición de fosfatidil serina.



**Figura 4.51.**-Citotoxicidad inducida en las células U266 de MM tras incubación con OSI-027, Ruxolitinib y sorafenib. Las células se incubaron durante 24 h con ruxolitinib+OSI-027, trascurridas 24 h se adicionó sorafenib durante 48 h más. El efecto citotóxico se midió por exposición de fosfatidil serina.

#### 4.6.-Optimización del análisis de presuntas células madres de mieloma múltiple.

Según lo descrito en la bibliografía las células madres de mieloma son las células CD138 negativas (Matsui et al. 2004). Por lo que para identificar estas células se marcaron con anticuerpo anti CD138 y anexina ya que las células de mieloma pierden la expresión de este antígeno de superficie celular cuando sufren apoptosis. Inicialmente se hizo una región sobre la población de células para de esta forma eliminar los fragmentos celulares y agregados, luego se hizo otro sobre las células anexinas negativas para eliminar las células apoptóticas y finalmente identificar las células CD138 negativas.

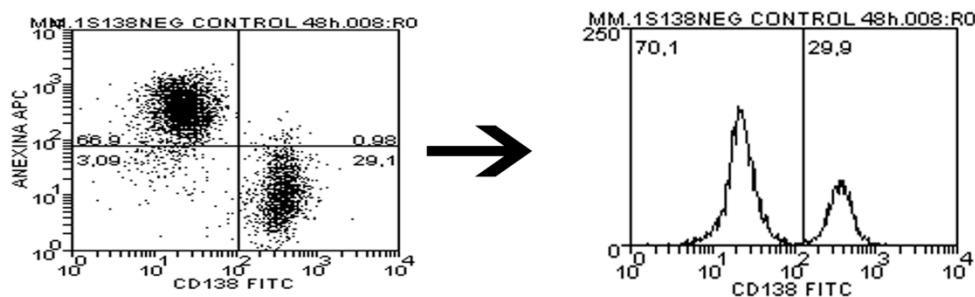


**Figura 4.52.-** Identificación de las células CD138 negativas en diferentes líneas de mieloma múltiple. El porcentaje de la población de células CD138 negativas fue de un 2.2 a un 3.4 %

Como se aprecia en la Figura 4.52, en estas líneas, se encontró solo de un 2,2% a un 3,4% de células CD138 negativas. Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde el porcentaje de células madres tumorales se encuentra por debajo del 5 % en mieloma múltiple (Matsui et al. 2004).

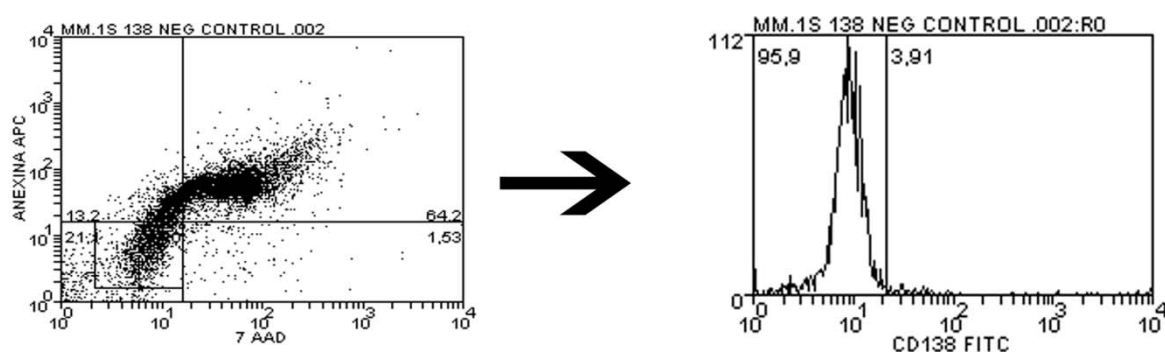
Para realizar subsecuentes experimentos con estas células se procedió a su purificación mediante selección negativa por procedimientos magnéticos (ver materiales y métodos acápite 3.6.3). Se separaron  $100 \times 10^6$  células por columna. Las células CD138 negativas se separaron mediante MACS con anticuerpo anti CD138. Se recogió la fracción negativa y se fenotiparon con anticuerpo anti CD138 y anexina. Como se muestra en la Figura 4.53, se logró enriquecer el cultivo en células CD138 negativa pero seguían quedando células CD138 positivas aunque la mayoría de las células CD138 negativas obtenidas eran células anexina positivas, es decir apoptóticas, solo una pequeña fracción pertenecían a células vivas.

## MM.1S CD138 Neg



**Figura 4.53.-** Purificación de la población de células CD138 negativas. Se separaron  $100 \times 10^6$  células por columnas. Se recogió la fracción no unida a la columna y se fenotiparon.

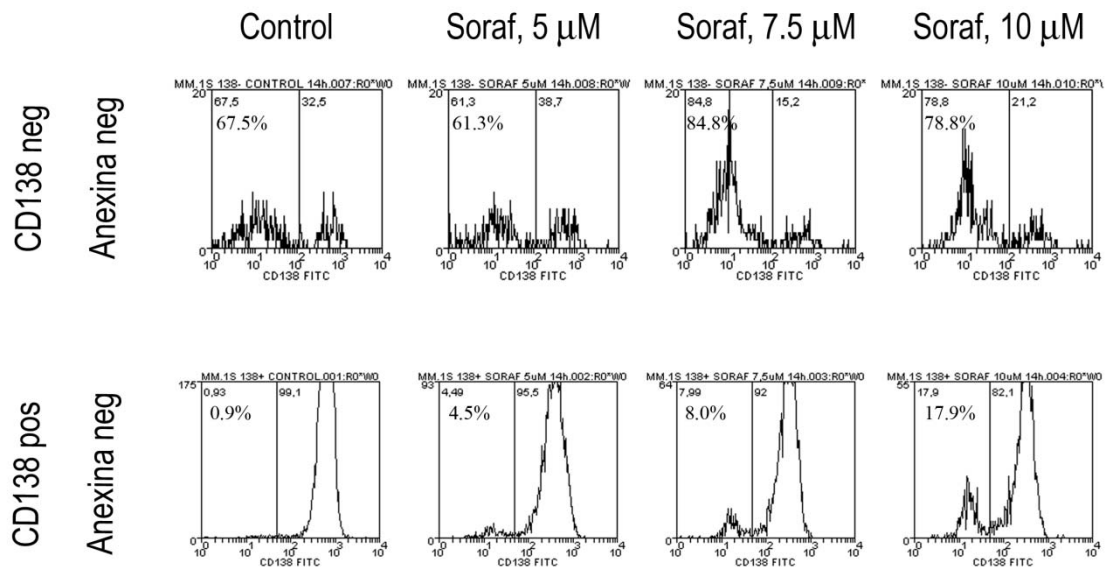
Para poder obtener una mayor eficiencia de separación se necesitó separar solo  $40 \times 10^6$  células por columna ya que con cantidades mayores se saturaba la capacidad de retención de la columna. De esta forma, se obtuvo una mayor fracción de células CD138 negativas, aunque de estas, solo aproximadamente el 20% eran células vivas, es decir anexina negativas/7AAD negativas, Figura 4.54, y de estas más del 60% eran células CD138 negativas aunque se obtuvo una gran variabilidad entre experimentos.



**Figura 4.54.-** Puesta a punto de la purificación de la población de células CD138 negativas. Se separaron  $40 \times 10^6$  células por columnas. Se recogió la fracción no unida a la columna y se fenotiparon.

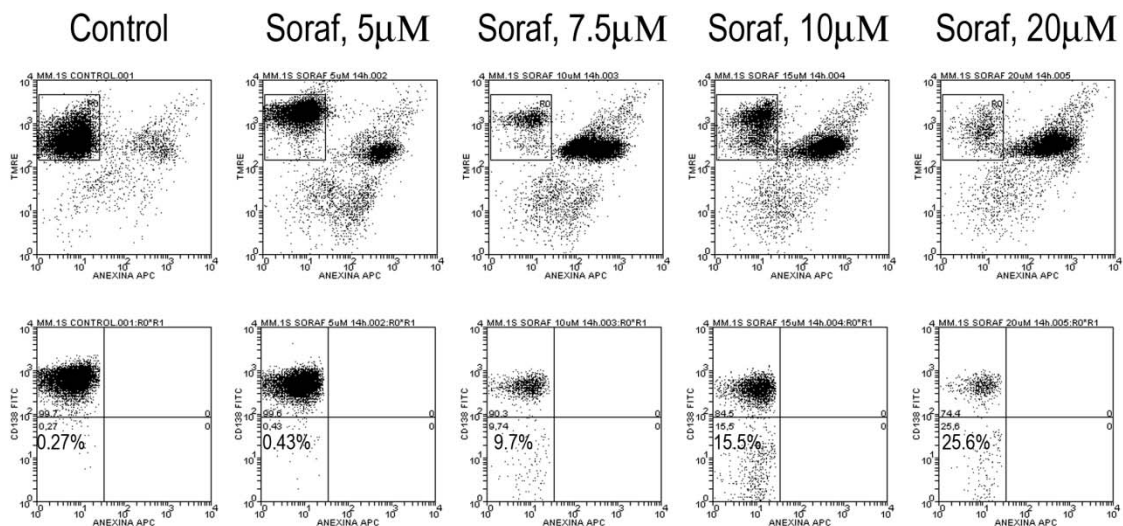
Una vez enriquecido el cultivo en células CD138 negativas, estas se trataron con sorafenib durante 14h con el objetivo de detectar si el sorafenib era activo sobre las presuntas células madres de mieloma múltiple. Al enriquecer el cultivo en células CD138 negativas, un alto porcentaje de las células son anexina positiva, por lo que se seleccionaron las células anexina negativas, y en esta población se analizó como respondían las poblaciones de células CD138 positivas y negativas al sorafenib. Como se aprecia en la Figura 4.55, ambas fracciones procedente de la separación magnética, es decir la población enriquecida en células CD138 negativa y la depleta de estas células, se enriquecieron en las células CD138 negativas al tratarlas con sorafenib. Aunque en la fracción negativa, a la mayor concentración de sorafenib se aprecia que la población de células CD138 negativas disminuye con respecto a la concentración

anterior. Esto indica que las células CD138 negativas son más resistentes al sorafenib que las células CD138 positivas.



**Figura 4.55.-** Respuesta de las células CD138 negativas al tratarlas con sorafenib. Como se aprecia en este experimento, éstas parecen ser más resistente al sorafenib que las CD138 positivas.

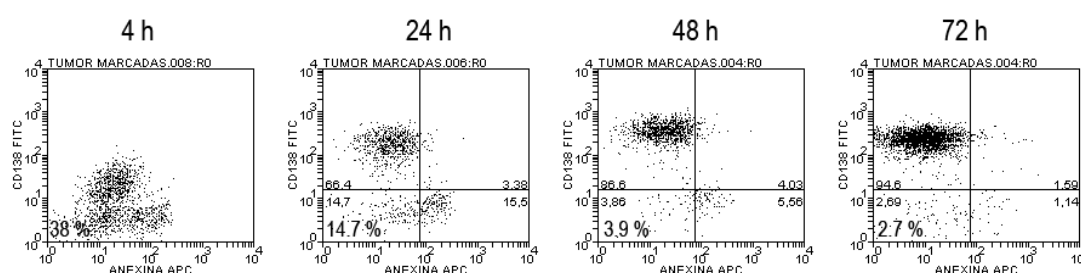
Para corroborar este resultado se realizó el mismo experimento pero usando el cultivo completo, es decir sin separa las células CD138 negativas. Y como se aprecia en la figura 4.56 el resultado es muy similar al del experimento anterior. A medida que se aumenta la dosis aumenta la población de células CD138 negativo, indicativa que estas células son más resistentes al sorafenib.



**Figura 4.56.-** Células tratadas con sorafenib durante 14 h. se ve como el cultivo celular se enriquece en las células CD138 negativas.

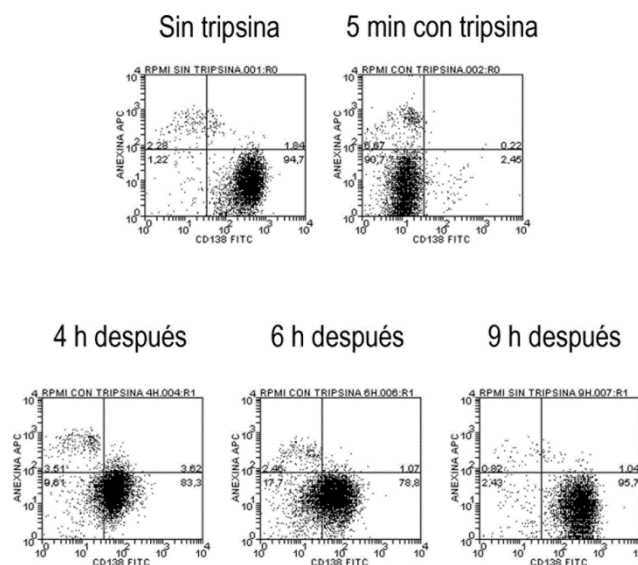
Debido a que estas células sólo representan una fracción muy pequeña del cultivo celular resulta muy complicado trabajar con estas células. Una de las formas descrita en la bibliografía para enriquecer el cultivo en estas células es inyectándolas en ratones inmunodeficientes. Para esto se tomaron ratones NOD/SCID a los cuales se le inyectaron de forma subcutánea  $1 \times 10^6$  células en resuspendidas en 100  $\mu$ L de matrixgel durante 7 semanas. Trascurrido este tiempo se extrajeron se fenotiparon y se realizó un ensaya de formación de colonias.

Como se observa en la Figura 4.57 la población de células CD138 negativa se incrementó de forma que a las 24 h se tenía un 7% de estas células aunque descendió de manera progresiva de forma que a las 72 h solo quedaba un 2.7% de dichas células.



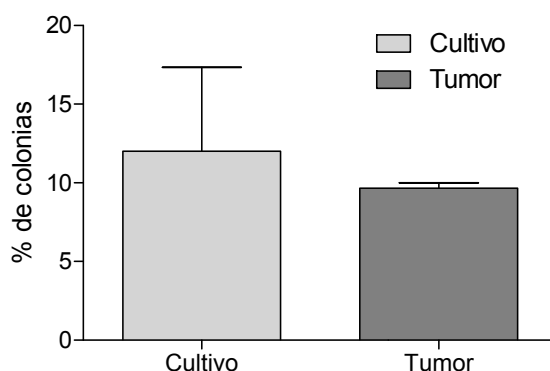
**Figura 4.57.**-Evolución de la población de células CD138 negativas tras ser extraídas del raton. Se inyectaron de forma subcutánea 50 000 células de la línea MM.1S en 100  $\mu$ L de matrixgel durante 7 semana y posteriormente se extrajeron.

En el momento de la extracción si se detectó un por ciento mayor de células CD138 negativas pero debe ser analizado con cuidado ya que la tripsina utilizada para disgregar el tumor también elimina el antígeno de superficie CD138. Al analizar este hecho, se constató lo dicho anteriormente y que hasta transcurridas 9 h no se recupera casi en su totalidad dicho antígeno de superficie (Figura 4.58)



**Figura 4.58.**-Cinética de recuperación del antígeno de superficie CD138 tras incubar las células RPMI 8226 con tripsina durante 5 min. Como se aprecia a las 9 h se ha recuperado la proteína de superficie CD138 casi en su totalidad.

A pesar del aumento de la población de las células CD138 negativas, el porcentaje de colonias formadas no mostro diferencias significativas al comparar las células injertadas en el ratón con las células de la línea que procedían (Figura 4.59).

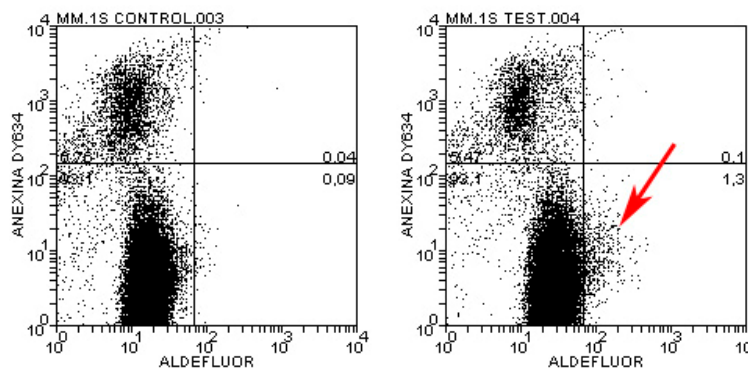


**Figura 4.59.**-Comparación del porcentaje de formación de colonias entre las células extraídas de ratón y las células de la línea que proceden.

El uso del antígeno de superficie CD138 como un marcador negativo de presuntas células madres tumorales presenta varios inconvenientes como es el hecho de que es un marcador negativo, que las células lo dejan de exponer cuando entran en apoptosis y que puede ser cortado proteolíticamente por varias metaloproteasas. Además al purificar estas células de un cultivo celular, se obtienen conjuntamente un gran porcentaje de células en apoptosis. Esto hace que los experimentos que se realicen con estas células, sobre todo los de citotoxicidad tengan el inconveniente de que las células se encuentren en un entorno desfavorable.

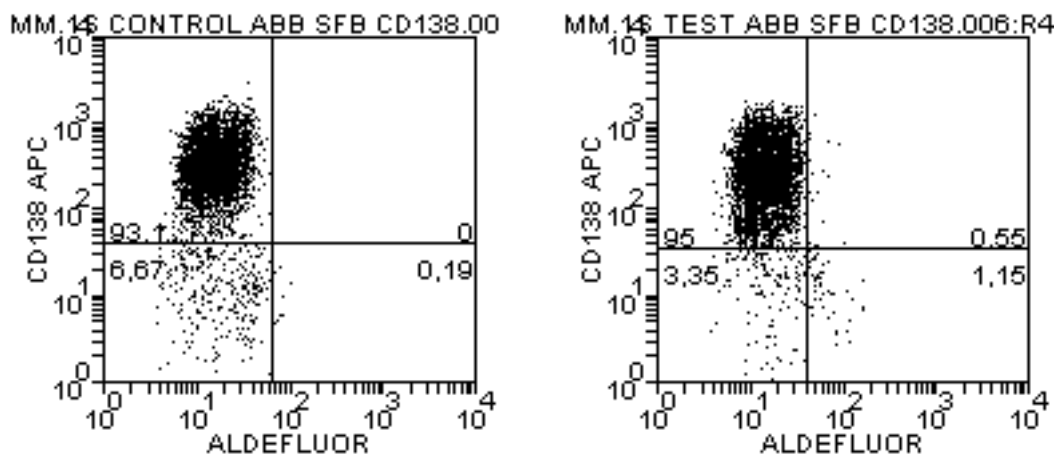
Al tener en cuenta estos motivos, se decidió buscar otro marcador de células madres de mieloma múltiple. Sin embargo existe una extensa controversia sobre las características fenotípicas de estas células y se encontraron muchas contradicciones en la bibliografía consultada (Matsui et al. 2004; Matsui et al. 2008; Pilarski et al. 2008; Paino et al. 2012).

Existe un marcador de células madres desarrollado gracias a la mayor capacidad que poseen estas células para detoxificarse. Estas células poseen mayor actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y esta característica la comparten todas las células madres, tanto las normales como las tumorales, por lo que se uso el kit de STEMCELL Technologies Inc (ver acápite 3.9.1). Como se aprecia en la figura 4.60 las MM.1S muestran una población de células Aldefluor positivas perfectamente distinguible.



**Figura 4.60.-** Células de la línea MM.1S marcadas con la sonda Aldefluor para identificar las células madres de mieloma múltiple. Se detecta claramente un 1,3% de células brillantes para la sonda aldefluor y que son anexina negativas.

En este experimento se realizó inicialmente el marcaje con Aldefluor y posteriormente el marcaje con antiCD138 y anexina. Como se aprecia en la Figura 4.61, a diferencia de lo reportado en la bibliografía estas células Aldefluor positivas tienen un porcentaje (32 %) de células CD138 positivas aunque la mayoría son negativas. También se observa que todas las células que expresan el antígeno de superficie CD138 no son Aldefluor positivas. En este experimento el porcentaje de células Aldefluor positiva fue ligeramente mayor que en el mostrado anteriormente.



**Figura 4.61.-**Caracterización de las células Aldefluor positivas en la línea MM.1S. Como se aprecia estas células son mayoritariamente CD138 negativas aunque existe una pequeña población CD138 positivas.





## 5.-DISCUSIÓN

### 5.1-El sorafenib induce apoptosis en células de mieloma múltiple de líneas celulares y de muestras de pacientes

A pesar de los nuevos fármacos y estrategias introducidas en la terapia del mieloma múltiple humano, esta continúa siendo una enfermedad incurable. Por esto, la introducción de nuevas estrategias y la búsqueda de nuevos fármacos es una prioridad en las investigaciones relacionadas con esta enfermedad. Las nuevas aproximaciones en el tratamiento del mieloma múltiple deben beneficiarse de los avances recientes en la comprensión de la biología de esta enfermedad, especialmente en los mecanismos de supervivencia y su interacción con el microambiente en que se desarrolla.

El microambiente tumoral en el mieloma múltiple humano juega un papel crucial en el desarrollo de esta enfermedad. La interacción entre las células tumorales y el microambiente está mediada por varios mecanismos que incluyen citoquinas tales como VEGF, IL-6, IGF-1 y HGF entre otras (Ogata et al. 1997; Ferlin et al. 2000). La vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK se encuentra por debajo de la mayoría de los receptores de estas citoquinas y tiene un importante papel en esta dolencia (Platanias 2003). El bloqueo de esta vía de señalización puede inducir apoptosis en células de mieloma múltiple incluso en presencia de estroma, el cual típicamente protege a estas células de terapias convencionales como dexametasona (Chatterjee et al. 2002; Chatterjee et al. 2004).

Esta vía de señalización puede también ser activada por oncogenes como Ras, las mutaciones en esta proteína se encuentran en el 30-50% de las células plasmáticas de pacientes de MM. Su hallazgo es más frecuente en los estados tardíos de esta patología (Bezieau et al. 2001; Rasmussen et al. 2005), en cambio en los pacientes de nuevo diagnóstico, las mutaciones de Ras se detectan solo en un tercio de los pacientes y se suelen correlacionar con menor supervivencia y poca respuesta a los tratamientos (Liu et al. 1996) y su progresiva adquisición se relaciona con progresión de la enfermedad (Liu et al. 1996)

Esta vía de señalización también está implicada en el efecto angiogénico de VEGF (Podar et al. 2001; Giuliani et al. 2004), que es secretado tanto por las propias células de MM como por BMSC (Gupta et al. 2001). Está demostrado que la inhibición de esta vía de señalización en células, tanto de líneas de MM como en muestras primarias, induce apoptosis (Tai et al. 2007).

Dada la importancia de la vía de señalización de Raf en la progresión tumoral del MM, es lógico examinar esta vía de señalización como posible diana terapéutica en el MM (Roberts and Der 2007). Por lo que la posibilidad de inhibir varias quinasas involucradas en diversas vías de señalización sería una aproximación prometedora. En este contexto el sorafenib podría tener un sitio en el tratamiento del mieloma múltiple. El sorafenib es un fármaco diseñado para inhibir a B-Raf y C-Raf, sin embargo, este también inhibe otras quinasas como VEGFR (Wilhelm et al.

2004). Actualmente es usado en clínica para el tratamiento del carcinoma renal avanzado y el hepatocarcinoma (Wilhelm et al. 2006) y podría ser una nueva terapia para el MM, de hecho recientemente se ha reportado que es citotóxico para células de MM y que presenta efecto sinérgico con bortezomib *in vitro* (Ramakrishnan et al. 2009). Sin embargo, el mecanismo de acción a través del cual induce muerte celular en células MM no ha sido completamente dilucidado.

En este estudio se demuestra que el sorafenib induce apoptosis en líneas de células de MM que expresan p53 de forma wild-type (MM.1S, H929) o que poseen una forma mutada de esta proteína (U266, OPM-2, RPMI 8226), así como en células plasmáticas de pacientes de MM a concentraciones que se alcanzan con las pautas de dosificación actualmente aprobadas para su uso (Strumberg et al. 2005). La capacidad del sorafenib para inactivar esta vía de señalización (Ras-Raf-Mek-Erk) se confirma por la inhibición de la fosforilación de Erk observada en las líneas de mieloma después del tratamiento. A las dosis usadas se demuestra que el sorafenib es capaz de inhibir eficazmente la fosforilación de Mek y Erk en células de MM, incluso en una línea (OPM-2) que presenta una forma mutada de Ras (H-Ras). Esto concuerda con publicaciones recientes que demuestran que el sorafenib es capaz de inhibir la activación de Mek y Erk en otros tipos de células tumorales (Peng et al. 2009). Además, estudios iniciales de secuenciación del genoma de pacientes de mieloma múltiple indican que un pequeño número de pacientes presentan mutaciones en B-Raf (Chapman et al. 2011). Y en este trabajo se demuestra que el sorafenib es capaz de inducir apoptosis en células U266 que expresan la mutación V600E Raf (Ng et al. 2003) y en células RPMI 8226 que expresan K-Ras (Zhang and Fenton 2002). Todos estos resultados sugieren que el sorafenib podría ser de gran utilidad en el tratamiento de estos pacientes de mieloma múltiple.

En este estudio se observa un potente efecto del sorafenib sobre el microambiente en que se desarrolla este tipo de tumor, específicamente en la modulación en la interacción entre las células tumorales y las células estromales. Al cocultivar las células de MM con células estromales se observó como la protección ejercida por estas últimas es mínima. VEGF es un importante mediador en las interacciones entre las células MM y las células estromales. Cuando las células de MM se ponen en contacto con las células estromales se produce un incremento en la producción de VEGF por parte de las células tumorales, las del estroma y las endotelial, lo cual conduce a su vez a la secreción de IL-6 por parte de las células estromales lo cual a su vez aumenta la secreción de VEGF (Gupta et al. 2001). La vía de Ras/Raf/MEK/ERK tiene un importante papel en la secreción de VEGF y se ha demostrado que la disminución de Erk puede inhibir la secreción de VEGF por parte de las células de (Giuliani et al. 2004; Ramakrishnan et al. 2009). Éste efecto del sorafenib podría tener un papel importante de forma indirecta en la disminución de la proliferación de las células de MM y a su vez disminuir algunas resistencias a drogas y aumentar la actividad de otros fármacos.

Al análisis de las vías de señalización celulares se identificó que el sorafenib actúa sobre diferentes vías de señalización de proliferación y supervivencia incluida aquellas mediada por

Mek/Erk ya discutida, así como Jak/Stat y PI3K/Akt. El sorafenib inhibió la fosforilación de proteínas como Stat-3, Stat-5 y la actividad del complejo mTORC1. En este contexto, la fosforilación de Stat-5 es realizada por Jak2 y por la tirosín-quinasa Scr, miembro de una familia de kinasas que se encuentran por debajo de múltiples receptores tirosín-quinasa como PDGFR y VEGFR los cuales son blancos reconocidos del sorafenib (Wilhelm et al., 2004). Por lo que es posible que el sorafenib inhiba a Stat5 a través de un mecanismo que involucre la inhibición de PDGFR y VEGFR y por tanto las quinasas Jak2 y Scr (Rahmani et al. 2007).

Se puede ver que el sorafenib induce una eficiente disminución de la fosforilación de Stat-3 que es inducida por el efecto estimulador de IL-6, una citoquina de supervivencia para las células de mieloma múltiple (Barille et al. 2000). En tumores se ha observado que Stat-3 está constitutivamente fosforilado y esto conduce a una activación aberrante de proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL y MCL-1. Estos niveles aumentados de Stat-3 fosforilada han sido detectado en células plasmáticas de medula ósea de pacientes de MM y en la línea U266 (Catlett-Falcone et al. 1999b; Chim et al. 2004). La inhibición de la vía Jak/Stat conduce a disminución de los niveles de las proteínas antiapoptóticas e incremento de la apoptosis en líneas de células de MM (Catlett-Falcone et al. 1999a; Catlett-Falcone et al. 1999b). Evidentemente la inhibición de las vías MEK/ERK y JAK/STAT pueden contribuir a la actividad citotóxica en células de mieloma del sorafenib.

Mcl-1 es una proteínas antiapoptótica de gran importancia, y previamente se ha descrito en otros tipos tumorales que el sorafenib reduce los niveles de esta proteína (Le Gouill et al. 2004a; Le Gouill et al. 2004b; Rahmani et al. 2005; Yu et al. 2005). En este modelo el sorafenib indujo una marcada disminución de los niveles de Mcl-1 de forma dependiente del tiempo. Sin embargo, el pretratamiento de las células de MM con ZVAD-fmk, evitó la disminución de esta proteína al tratar las células con sorafenib. Esto sugiere que la disminución de sus niveles es responsabilidad de la degradación mediada por caspasas. Este resultado concuerda con otros trabajos en los cuales también se aprecia la inducción por parte del sorafenib de una disminución de los niveles de esta proteína. Aunque en células de leucemia y de cáncer de pulmón la disminución de los niveles de Mcl-1 es mediada por inhibición en su traducción y de su transcripción respectivamente (Rahmani et al. 2005; Yu et al. 2005). Puthier *et al.* han mostrado que la vía de JAK/STAT y no la Ras/Raf/MEK/ERK está involucrada en la inducción de la expresión de Mcl-1 dependiente de la IL-6 lo que sugiere que el efecto del sorafenib sobre la expresión de Mcl-1 puede no estar relacionado a la inhibición de la vía Ras/Raf/MEK/ERK (Puthier et al. 1999).

A pesar de lo anterior, la apoptosis inducida por el sorafenib fue bloqueada más eficientemente por la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-XL que por la sobreexpresión de Mcl-1. El papel clave de Bcl-2 y Bcl-XL en la apoptosis en estas células también quedó demostrado por el hecho de que la reducción en los niveles de la proteína Bcl-XL, mediante el silenciamiento transitorio de esta proteína por el uso de siRNA, potencia marcadamente la apoptosis inducida por el sorafenib. En cambio, el papel poco relevante de Mcl-1, concuerda con el hecho de que

el silenciamiento, tanto transitorio con siRNA en MM.1S, como permanente con shRNA en Jurkat, de Bim, su agonista natural (Lopez-Royuela et al. 2010), no se tradujo en cambio en la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por el sorafenib. De igual forma, las células IM-9 que no expresan Bim (Gomez-Benito et al. 2005), también son sensibles a la apoptosis inducida por el sorafenib. No obstante, Bim si parece participar en la apoptosis inducida por el sorafenib en otros tipos celulares (Zhang et al. 2008).

En nuestros modelos, parece que es la proteína Puma la que tiene un papel más determinante. PUMA es una proteína sólo-BH3 miembro de la familias de las Bcl-2 y un potente inductor de apoptosis. La transcripción de la proteína Puma es activada por p53 en respuesta a daños en el DNA por radiaciones  $\gamma$  y a quimioterapia. Puma se une a las 5 proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL los cuales liberan de su inhibición a Bax y Bak conduciendo a la permeabilización de la membrana mitocondrial y subsecuentemente a la activación de las caspasas.

Al incubar las células con sorafenib se aprecia que los niveles de esta proteína aumentan, al igual que ocurre con los niveles de su mRNA demostrado mediante dos técnicas diferentes, RT-MLPA y Real Time. El papel relevante de Puma se corroboró mediante el silenciamiento de ésta proteína mediante el uso de siRNA. Sin embargo, el aumento de los niveles de esta proteína durante la apoptosis inducida por el sorafenib se aprecia de manera más clara al incubar las células con sorafenib en presencia del inhibidor de múltiples caspasas Z-VAD, ya que Puma es proteolisada por las caspasas activadas posterior a la permeabilización mitocondrial. De igual forma, estas caspasas proteolisan las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-XL, lo que genera un circuito de amplificación mitocondrial que acelera la inducción de la apoptosis. La contribución relativa de este circuito de amplificación a la apoptosis depende de la permeabilización mitocondrial causada por Puma inicialmente y esta varia de forma dependiente a la línea ensayada. De esta forma la línea RPMI 8226 es altamente dependiente de esta amplificación, ya que el uso de inhibidores de caspasas retrasan marcadamente la inducción de la apoptosis, mientras que es mucho menos importante en líneas como las MM.1S donde la permeabilización mitocondrial inicial parece ser suficiente para que se ejecute la apoptosis incluso en ausencia de la activación de las caspasas.

Esto a su vez podría estar relacionado con el hecho de que Puma es una proteína diana transcripcional de p53. Mientras que MM.1S presenta la forma *wild-type* de p53, RPMI 8226 presenta una forma mutada. Esto justifica en parte la dependencia de esta última línea de un bucle de amplificación necesario para llevar a cabo la apoptosis ya que la inducción de Puma es menos intensa que en las MM.1S, no obstante, diversos factores de transcripción han sido involucrados en la inducción de Puma de manera independiente de p53. Entre estos se incluyen p65, p73, FoxO3a y NF- $\kappa$ B (Dudgeon et al. 2010; Dudgeon et al. 2012; Sun et al. 2012). Puma media apoptosis independiente de p53 inducida por una variedad de estímulos no genotóxicos como TNF- $\alpha$ , privación de suero, eliminación de citoquinas, glucocorticoides e isquemia/reperfusión.

La vía de señalización PI3K/AKT se encuentra por debajo de múltiples quinasas dianas del sorafenib. Este fármaco inhibe la fosforilación de Akt inducida por la IL-6. FoxO3a es un factor de transcripción el cual es diana de Akt, cuando FoxO3a es fosforilado, se inactiva y se localiza fuera del núcleo. Por lo que el tratamiento con sorafenib conduciría a la desfosforilación de FoxO3a y por tanto a su activación lo que conduciría a la transcripción de mRNA de Puma.

## **5.2.-El sorafenib induce autofagia y necroptosis en células de mieloma múltiple**

Claramente el sorafenib induce apoptosis por la vía mitocondrial. No obstante, la incubación de forma prolongada de células que sobreexpresan Bcl-XL o carente de Bax y Bak, lo cual inhibe la vía intrínseca de inducción de la apoptosis, termina induciendo muerte celular independiente de ésta vía. De igual forma, la incubación con diferentes inhibidores de caspasas también consiguen una protección, aunque de forma parcial. Según estos datos, es evidente que el sorafenib es capaz de inducir muerte celular por un mecanismo independiente de las caspasas cuando estas no pueden ser activadas.

Existen suficientes evidencias que sostienen la idea de que la autofagia es un proceso fisiológico que puede regular la iniciación y la progresión tumoral, así como la respuesta terapéutica a fármacos anticancerígenos usados en clínica (Eisenberg-Lerner and Kimchi 2009). En contraste a la apoptosis donde su inducción, objetivo primordial de la mayoría de los fármacos usada en terapia, tiene como objetivo la muerte celular, la autofagia esta involucrada tanto en la muerte de las células tumorales como en su supervivencia. A pesar de esto, numerosas publicaciones describen mecanismos de inducción de muerte celular mediado por autofagia al incubar las células con diferentes fármacos (Fazi et al. 2008; Grander et al. 2009).

El principal regulador de la autofagia es mTOR. Este complejo juega un papel crucial como sensor molecular de la energía celular, niveles de factores de crecimientos y disponibilidad de nutrientes y promueve crecimiento celular, síntesis de proteínas e inhibición de autofagia. Cuando hay escases de nutrientes mTOR es inactivado y la autofagia es inducida como un mecanismo compensatorio. Sin embargo, existen numerosas señales moleculares que también regulan la actividad de mTORC. Por ejemplo Akt y Erk, que son activados por factores de crecimiento y consecuentemente inhiben la autofagia. Debido a que el sorafenib es capaz de inhibir Akt y Erk, como se discutió anteriormente, también se analizó el efecto de este fármaco sobre la actividad de mTOR (Eisenberg-Lerner et al. 2009; Eisenberg-Lerner and Kimchi 2009).

Para esto se analizó la fosforilación de sustratos diana de este complejo, específicamente del complejo 1 (mTORC1). En el contexto, del análisis del efecto del sorafenib sobre las vías de traducción de señales, se demostró que el sorafenib inhibe el complejo mTORC1, ya que inhibe la fosforilación de varios de sus sustratos (S6, 4E BP y Gsk 3). Este complejo es uno de los reguladores de la autofagia, por lo que seguidamente se decidió analizar la capacidad de inducción de la autofagia en células de MM por parte del sorafenib.

Como se pudo demostrar, este fármaco es capaz de inducir autofagia en estas células, por lo que se evaluó si la autofagia estaba implicada en esta forma de muerte celular.

No obstante, la interrelación entre la apoptosis y la autofagia es compleja. Esta existe desde niveles de las vías de traducción de señales que detectan señales de muerte y supervivencia y las traducen en acontecimientos moleculares que activan o inhiben programas de muertes y supervivencia. Por lo que la mayoría de estas señales moleculares no son específicas de autofagia o apoptosis ya que promueven un amplio rango de actividades en la célula en el contexto de la muerte y la supervivencia (Eisenberg-Lerner et al. 2009; Yee et al. 2009)

Debido a esto, para bloquear la autofagia se usaron dos estrategias diferentes, por un lado se silenció de forma transitoria con siRNA de beclina 1 y por otro lado, se preincubaron las células con cloroquina. En ambos casos el bloqueo de la autofagia aumentó la apoptosis inducida por el sorafenib en las células MM, lo que concuerda con el papel citoprotector de la autofagia en estas células, sin embargo, en las células 8226 Bcl-XL y en las Jurkat deficiente de Bax y Bak, la disminución de los niveles de beclina 1 y por tanto de la autofagia, no mostró el mismo resultado. Sugiriendo que en células resistente a la apoptosis la autofagia podría contribuir al menos, en parte a esta forma de muerte celular.

Aunque numerosas publicaciones se refieren a la muerte celular asociada a autofagia, el consenso general es que este proceso es un mecanismo de supervivencia y aunque las células durante su muerte puedan mostrar características de autofagia, este no es, generalmente, el mecanismo a través del cual las células mueren. Sin embargo, es posible que la autofagia pueda contribuir a la inducción o ejecución de la muerte celular. Existen claras evidencias de que la autofagia puede tanto inhibir como promover la apoptosis, dependiendo del modelo. En el primer caso, está claro que la inducción de la autofagia en condiciones de privación de nutrientes tiene un objetivo de supervivencia, sin embargo en otros contextos se ha demostrado que la inhibición o reducción de la autofagia reduce la muerte celular (Espert et al. 2006; Chu et al. 2007). Por ejemplo, se ha propuesto que la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas (mitofagia) contribuye a proteger la célula de la apoptosis a través de la reducción de la liberación de factores apoptogénicos. Sin embargo, la inhibición de la mitofagia asociada al daño mitocondrial producido por la neurotoxina inductora de Parkinson, 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP(+)) confiere protección frente a la muerte celular asociada a la autofagia inducida por MPP(+) (Zhu et al. 2007). Además recientemente se ha descrito una mitofagia inducida por Puma y Bax muy similar a la inducida por MPP(+) lo cual complica más, si cabe, la interrelación entre la apoptosis y la autofagia (Yee et al. 2009).

Sin embargo, debido a que durante la incubación del sorafenib con diferentes inhibidores de caspasa se observó que las células seguían muriendo y que, incluso, en las MM.1S la muerte producida por el sorafenib se incrementaba en presencia del inhibidor de caspasa 8, se pensó que podía existir algún otro mecanismo implicado en el efecto que el sorafenib induce en estas células. La caspasa 8 es la cisteín- proteasa iniciadora de la muerte celular por apoptosis

en respuesta a la activación de receptores de muerte o vía extrínseca de activación de la apoptosis. Sin embargo, esta caspasa también tiene un papel no apoptótico, ya que es requerida para el desarrollo embrionario de ratón y la proliferación de células del sistema inmune. Trabajos recientes han indicado que los requerimientos de la caspasa 8 para estos procesos son debido al efecto inhibidor de esta caspasa sobre RIP3, una quinasa involucrada en una forma de muerte celular llamada necrosis programada, lo que estaría en concordancia con el papel no apoptótico de la caspasa 8 (Vandenabeele et al. 2010; Oberst and Green 2011).

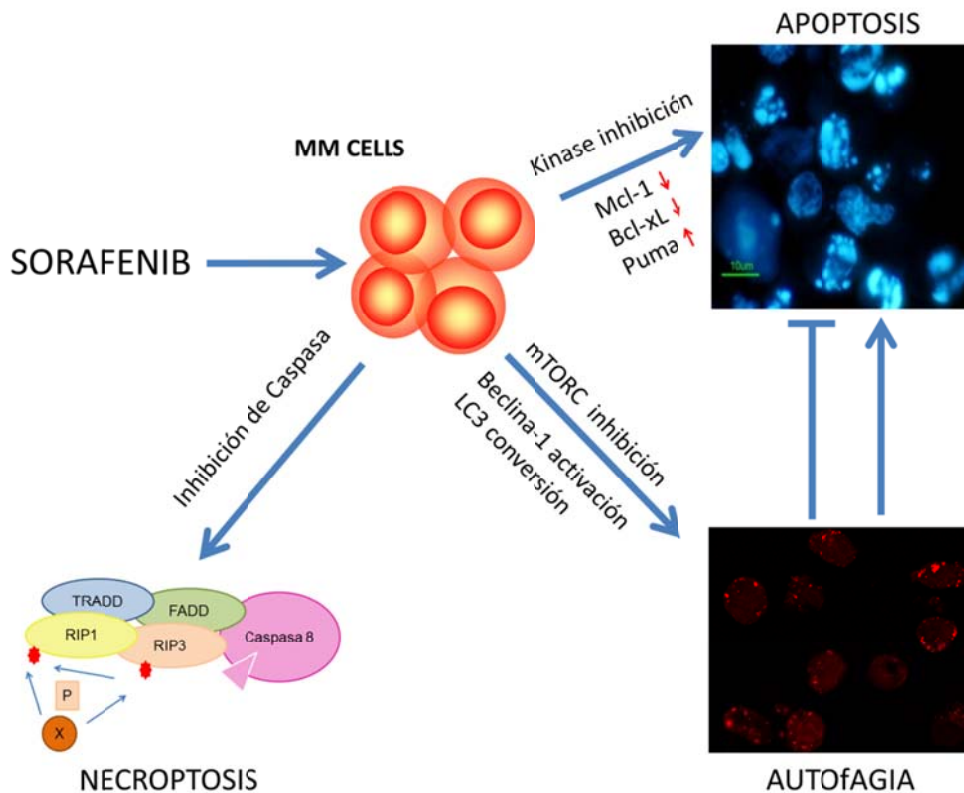
Según los resultados obtenidos en este trabajo, la inactivación de la caspasa 8 hace que, al exponer las células de MM al sorafenib, se observen dos comportamientos diferentes. Por un lado están las células MM.1S, las cuales siguen mostrando el mismo patrón de muerte celular al preincubarlas con Z-VAD pero que al incubar concomitantemente con necrostatina-1 la muerte si se reduce significativamente. Y por el otro lado las RPMI 8226, las cuales al preincubarlas con Z-VAD si se reduce la muerte inducida por el sorafenib pero que al incubarlas con necrostatina-1 no hay una mayor reducción de la muerte.

Estos resultados indican que el sorafenib, dependiendo de las células ensayadas, puede activar la quinasa RIP3 por un mecanismo no dilucidado, la cual, en caso de que las caspasas estén inhibidas es capaz de inducir la muerte celular, en este caso por necrosis. Hecho este, que evidentemente no sucede en otras líneas celulares.

Por muchos años la necrosis ha sido vista como un tipo de muerte que ocurre de manera incontrolada, resultado de condiciones adversas y daños a la célula. Sin embargo, recientemente ha sido descrita una forma regulada de muerte celular por necrosis mediada por los receptores mortales que puede ser inducida cuando se inhibe la apoptosis a través de la inhibición de las caspasas (Vercaemmen et al. 1998). Esta nueva forma de necrosis celular es mediada por quinzas de la familia RIP (Rip1 y Rip3) (He et al. 2009; Zhang et al. 2009). A la vez se descubrió la necrostatina-1 como un potente inhibidor de este tipo específico de necrosis que recibió el nombre de necroptosis (Degterev et al. 2005). Desde entonces, numerosos estudios han contribuido a avances significativos en la comprensión del mecanismo de necroptosis. El hecho de que se produzca necrosis tras el tratamiento con quimioterapia no es poco frecuente, sobre todo debido a la muerte celular observada en células tumorales en la cual la maquinaria apoptótica es defectuosa (Zong et al. 2004).

La identificación de la necroptosis como una forma alternativa de muerte celular programada es particularmente prometedora en el contexto del tratamiento del cáncer, ya que esta involucra una vía altamente especializada que permite el diseño de drogas que activen esta dicha vía. En este sentido la inducción de la necrosis puede tener, además, el beneficio adicional de estimular la respuesta del sistema inmune del paciente con el objetivo de eliminar las células tumorales (Amaravadi and Thompson 2007). En este contexto, el sorafenib podría ser de gran utilidad para el tratamiento de aquellos pacientes de MM refractarios, resistentes a la apoptosis, en los que este fármaco sea capaz de inducir necrosis.

A pesar del gran progreso realizado últimamente en la clasificación de los diferentes modelos de muerte celular, la muerte celular *in vivo* normalmente comprende una compleja interrelación entre la apoptosis, la necrosis y la autofagia. Estas pueden ocurrir independientemente o simultáneamente. En algunas situaciones, un estímulo específico involucra solo uno de estos procesos, pero en otras situaciones, se observa un fenotipo de muerte celular combinado en respuesta al mismo estímulo (Samara et al. 2008; Bellot et al. 2009; Yang et al. 2010). En otros casos, una vía puede predominar sobre las otras, las cuales son solo activadas si la vía dominante es inhibida. Esto tiene una complicación adicional por el hecho de que la autofagia puede actuar tanto como pro-supervivencia o pro-muerte.



**Figura 5.1.**-Esquema del mecanismo a través del que el sorafenib induce el efecto citotóxico en las células de mieloma múltiple

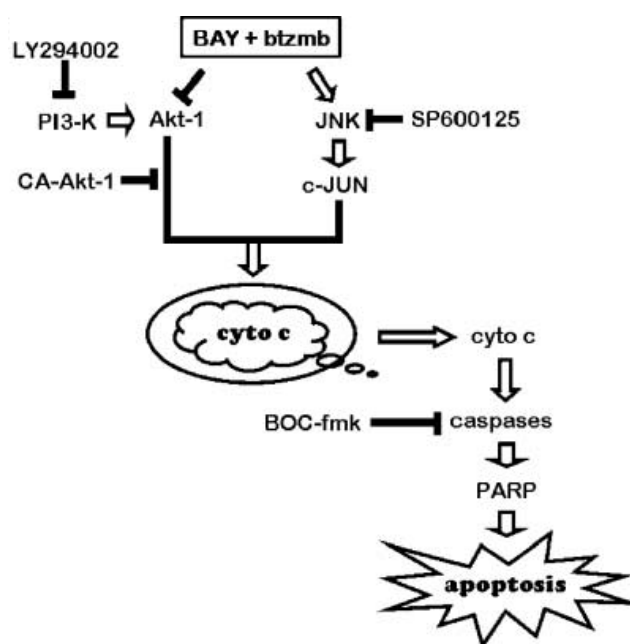
### 5.3.-El Sorafenib muestra potencial en terapia combinada

En la terapia actual del mieloma múltiple, al igual que del resto de las enfermedades cancerígenas, lo habitual es el uso de más de un fármaco, de forma que se ataquen diferentes dianas terapéuticas para evitar la aparición de resistencia y de esta forma aumentar la efectividad del tratamiento. En este trabajo se estudiaron tres combinaciones posibles con el sorafenib. Se analizó la combinación con bortezomib, un inhibidor del proteosoma; la combinación con APO2/TRTAIL recombinante y la combinación con inhibidores de quinasas, específicamente mTORC y Jak.



Uno de los nuevos fármacos introducidos con éxitos en el tratamiento del mieloma múltiple es el bortezomib. Este fármaco es un inhibidor del proteosoma 26S. Este es un complejo enzimático con actividad proteasa que está compuesto de un núcleo catalítico, denominado 20S, donde se produce la proteólisis de las proteínas, y una o dos subunidades reguladoras 19S, que contienen los sitios de unión a las cadenas de poliubiquitina y la actividad isopeptidasa necesaria para la rotura y liberación de la ubiquitina. Para que una proteína sea degradada por el proteosoma es necesario que esté unida a la ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos, muy conservada evolutivamente, lo cual es realizado por una cascada de enzimas que activan la ubiquitina libre y se encargan de su unión a la proteína diana.

Aunque este fármaco ha logrado mejorar significativamente la respuesta de los paciente de MM a la terapia, ésta continua siendo una enfermedad incurable con una esperanza de vida de aproximadamente 7 años, sin embargo la introducción de este fármaco ha representado una evolución en el tratamiento de esta patología. Debido a esto, decidimos combinar el sorafenib con el bortezomib. Además, en líneas celulares de otros tipos tumorales como leucemia y glioma, entre otros, se ha descrito un potente efecto sinérgico al combinar estos dos fármacos (Yu et al. 2006a).



**Figura 5.2.-**Modelo propuesto para el efecto sinérgico observado entre el sorafenib y el bortezomib. Tomado de (Yu et al. 2006a)

Estos dos fármacos actúan en dianas terapéuticas diferentes por lo que se esperaba que se observara un efecto beneficioso. Sin embargo, al combinar estos dos fármacos, solo en una de las líneas empleadas se demostró la existencia de un efecto sinérgico mientras que en el resto se detectó un efecto antagónico y solo en algunos puntos un efecto aditivo. Estos resultados no coinciden con los descritos por (Ramakrishnan et al. 2009) quienes plantean que al combinar sorafenib y el bortezomib se obtiene un efecto sinérgico en su caso en las MM.1S, en cambio nosotros solo encontramos efecto sinérgico en las RPMI 8226, y no en las NCI-

H929, MM.1S, U266 y OPM-2 donde el resultado es antagónico. Es importante destacar que el efecto sinérgico lo describen en inhibición de la proliferación, y no en la inducción de apoptosis como en éste trabajo. En otras publicaciones (Yu et al. 2006a) el efecto sinérgico lo atribuyen a que la combinación de estos dos fármacos consiguen una inhibición de Akt y una activación de la vía Jnk por lo que propones el esquema Figura 5.2.

Sin embargo, debido a la diversidad de efectos que inducen estos dos fármacos es difícil establecer un único mecanismo que sea capaz de explicar tanto el efecto sinérgico como antagónico observado.

Sin embargo, se ha descrito que el bortezomib, al igual que la inhibición del proteosoma, induce un aumento de la autofagia como mecanismo compensatorio a la inhibición de la degradación de las proteínas por esta vía (Zhu et al. 2009; Zhang et al. 2011a; Zang et al. 2012). Debido a que el sorafenib, como se ha explicado anteriormente, inhibe mTORC y por tanto induce autofagia, esto podría contribuir a compensar la inhibición del proteosoma por parte del bortezomib y de esta forma contribuir al efecto antagónico observado en algunas líneas. De hecho varios estudios describen que el uso de inhibidores de la autofagia conjuntamente con inhibidores del proteosoma presenta un efecto sinérgico (Zhu et al. 2009; Zhang et al. 2011a; Zang et al. 2012).

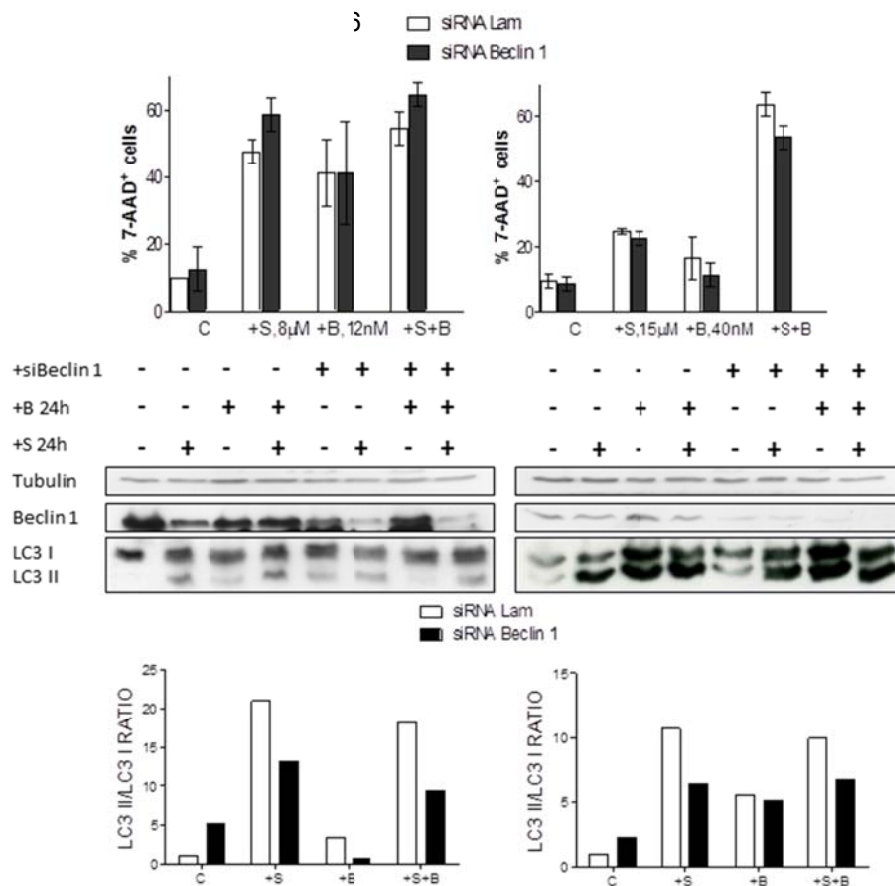


Figura 5.3.-Papel de la autofagia en la muerte inducida por la combinación de sorafenib y bortezomib.

No obstante también se ha descrito que la autofagia puede contribuir a la muerte celular, por lo que un aumento excesivo de este proceso por estos dos fármacos podría contribuir a la muerte. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde al silenciamiento de Beclina-1 tanto en células capaces de realizar apoptosis como en células en las cuales la apoptosis esta inhibida por sobreexpresión de Bcl-xL, muestra que en las primeras la autofagia contrarrestaría la inducción de la muerte de esta combinación mientras que en las últimas la autofagia puede contribuir a la muerte al combinar sorafenib y bortezomib.

Según los resultados obtenidos podemos decir que el efecto que se obtendrá al combinar el sorafenib con el bortezomib puede estar condicionado a las características de las células de MM. Por lo que se necesitaría analizar cada caso específico para decidir si esta combinación de fármacos es de utilidad.

La otra combinación estudiada fue con APO2/TRAIL. Este es uno de los ligandos mortales de la familia de TNF. A diferencia del resto de los ligandos mortales, TRAIL induce apoptosis en diversas líneas tumorales mientras que exhiben poca toxicidad hacia células normales (Ashkenazi 2002). Esto lo convierte en una molécula antitumoral muy atractiva. El MM es una de las patologías candidatas para el uso de este fármaco y de hecho existen numerosas citas respecto al efecto de esta molécula sobre células de mieloma múltiple aunque usando una molécula diferente mucho más tóxica a la empleada en este trabajo (Gazitt 1999; Lincz et al. 2001; Mitsiades et al. 2001). Aquí se ha usado una forma recombinante y soluble de esta molécula (APO2L/TRAIL.0) mucho menos toxica.

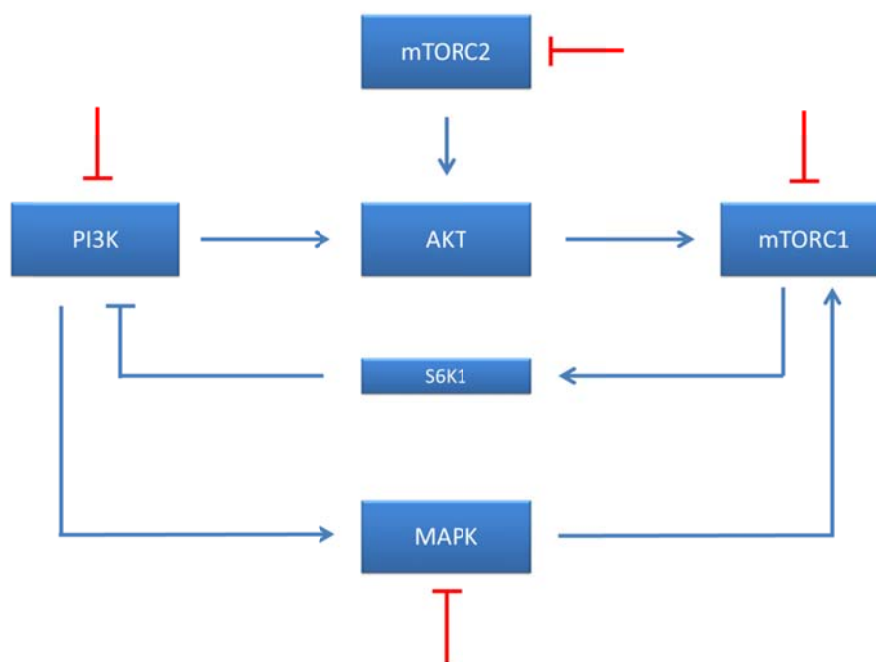
Muchos trabajos realizados indican que no todas las líneas de mieloma múltiple son sensibles a APO2L/TRAIL (Lincz et al. 2001). En algunos estudios atribuyen esta falta de sensibilidad a bajos niveles de procaspasa 8, a los niveles de expresión relativa de DR4, DR5, DcR1 y DcR2, o a la dificultad para que los receptores trimericen por estar fuera de las balsas lipídicas (Gomez-Benito et al. 2007). En cambio otros lo atribuyen al papel protector de la vía PI3K/Akt, por lo que usando inhibidores de esta vía aumenta la sensibilidad a APO2L/TRAIL (Chen et al. 2001; Kim and Lee 2005). En concordancia con esto se ha descrito que el sorafenib muestra un potente efecto sinérgico al combinarlo con APO2L/TRAIL en células de leucemia (Rosato et al. 2007).

Una vez que TRAIL se une a sus receptores DR4 y DR5, induce su trimerización y la fonación del DISC. La proteína adaptadora FADD es reclutada al DISC y facilita la incorporación de la procaspasa 8 lo que conduce a su activación. La vía extrínseca se puede conectar a la vía intrínseca a través de la proteína sólo BH3 Bid, la cual es activada por la caspasa 8. La activación de la vía intrínseca induce liberación del citocromo c. la activación simultanea de la vía intrínseca y extrínseca conduce a una amplificación y una marcada potenciación de la apoptosis (Rosato et al. 2003; Gomez-Benito et al. 2007).

Como se observa en nuestros resultados la preexposición con sorafenib de las células de mieloma resistente a TRAIL, sensibiliza éstas al efecto de este ligando mortal. El sorafenib reduce los niveles de Mcl-1, lo cual puede tener un papel esencial en los efecto observados en

esta combinación al facilitar la conexión entre la vía extrínseca e intrínseca. Además, también se observa que el sorafenib reduce los niveles de cFLIP<sub>L</sub> y aumenta ligeramente los niveles de FADD. El aumento de FADD por un lado facilita la formación del DISC y por tanto el reclutamiento de la caspasa 8 mientras que la reducción de cFLIP<sub>L</sub> facilitarían la activación de la caspasa 8 y por tanto la activación de Bid, lo que unido a la bajada de Mcl-1, proteína antiapoptótica que bloquea a tBid (Clohessy et al. 2006), facilita la ejecución de la vía intrínseca. Aunque en nuestro laboratorio se ha demostrado que la resistencia de la línea U266 a TRAIL es debida a la dificultad que presentan los receptores mortales para trimerizar lo cual puede ser mejorado con ácido valproico (Gomez-Benito et al. 2007), en este caso parece que el aumento en los niveles de FADD y fundamentalmente la disminución de los niveles de Mcl-1 y cFlip<sub>L</sub> cooperan para que la vía intrínseca potencie el efecto apoptótico de los receptores mortales lo cual queda demostrado al observarse una mayor salida de citocromo c y mayor procesamiento de la caspasa 8. Estos resultados coinciden con otros estudios en los que demuestran el papel de Mcl-1 en la apoptosis inducida por TRAIL (Clohessy et al. 2006; Han et al. 2006; Menoret et al. 2006). En el caso de cFLIP<sub>L</sub> la relación es más compleja ya que unos niveles muy alto bloquean la activación de la caspasa 8 al impedir el reclutamiento de esta al DISC, en cambio unos niveles intermedios son capaces de cooperar en la activación de la caspasa 8 al heterodimerizar con ésta (Boatright et al. 2004) aunque se le atribuyen funciones diferentes que al homodímero (van Raam and Salvesen 2011).

Numerosos estudios han sugerido la existencia de un bucle de retroalimentación mTORC→PI3K y en 2006 el grupo de Neil Rosen y Jose Baselga demostró que la inhibición de mTORC1 conduce a la activación de AKT (O'Reilly et al. 2006). Este descubrimiento tiene importantes implicaciones terapéuticas ya que explica en parte los pocos beneficios obtenidos de los compuestos que inhiben a mTORC y permite mejorar el potencial antitumoral de estos compuestos al poder bloquear la vía de PI3K. Sin embargo otro grupo, recientemente ha demostrado que la inhibición de mTORC activa la vía de señalización de las MAPK (Carracedo et al. 2008b). En muestras de biopsias de pacientes incluidos en un ensayo clínico encontraron una fuerte estimulación de la vía de las MAPK lo que se expresaba en la fosforilación de Erk. Esto también explicaría la pobre actividad antitumoral de los inhibidores de mTORC. Esta fosforilación de Erk es dependiente de Ras y de Mek1/2 así como del bucle de retroalimentación de PI3K y de S6K aunque el mecanismo exacto aun no ha sido dilucidado (Carracedo et al. 2008a; Carracedo et al. 2008b).



**Figura 5.4.**-Bucle de retroalimentación tras la inhibición de mTORC que justifican el poco beneficio clínico de estos fármacos. Para conseguir una inhibición eficiente se necesita inhibir también estos bucles.

Si las MAPK son activadas en respuesta a la inhibición de mTORC1, se puede mejorar la actividad antitumoral de esta familia de compuesto combinando los inhibidores de mTORC con inhibidores de Mek1/2. Actualmente se están estudiando muchos inhibidores de esta vía de señalización debido al papel de esta vía en oncogénesis ya sea por mutaciones en receptores tirosín-quinasa, en Ras o en Raf (Dhillon et al. 2007). Diferentes estudios con inhibidores de Mek y de mTORC han demostrado un fuerte aumento de la actividad antiproliferativa y apoptótica de los inhibidores de mTORC.

Debido a esto se seleccionaron dos fármacos inhibidores de mTORC1 y 2. PP242 y OSI-027 han mostrado tener un potente efecto inhibitor no solo de mTORC1 sino también de mTORC2 (Hoang et al. 2010; Bhagwat et al. 2011; Hoang et al. 2012). Estos se combinaron con sorafenib, que inhibe la vía de las MAPK como se demostró anteriormente en este trabajo, aunque también tiene algo de efecto sobre mTORC1 y 2 como lo demuestra el hecho de la inhibición de la fosforilación de 4E BP, S6, Gsk-3 y la inhibición de la fosforilación de AKT en la serina 473 respectivamente.

Ambos fármacos, PP242 y OSI-027, mostraron tener actividad antiproliferativa y citotóxica en la mayoría de las líneas de mielomas ensayadas, no obstante la línea U266 mostró ser resistente a los dos fármacos. En cambio la línea OPM-2 mostró ser ligeramente más sensible al PP242 pero no al OSI-027. Esta línea tiene mutado la fosfatasa PTEM lo que la hace muy dependiente de la vía PI3K→Akt→mTORC lo que explicaría su mayor susceptibilidad a PP242. El resto de las líneas mostró una sensibilidad intermedia entre las U266 y las OPM-2 a PP242.

En cambio la sensibilidad a OSI-027 no tuvo el mismo comportamiento. Las U266 continuaron siendo poco sensibles pero además, las RPMI 8226 mostraron una sensibilidad muy similar a las U266 y las OPM-2 se comportaron como las MM.1S y NCI-H929.

mTORC es esencial para el crecimiento tumoral, por eso se ha hecho popular como diana terapéutica. Sin embargo el uso de fármacos que tengan esta diana terapéutica es complicado debido a diferentes bucles de retroalimentación que activan diferentes vías compensatorias. Estos fármacos originalmente inhibían alostericamente mTORC1. La inhibición de mTORC1 evitaba la inhibición por parte de p70S6k y del propio mTORC1 de IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*). La de-represión de IRS-1 hiperactiva la vía receptor IGF-1/PI3K/AKT lo cual aumenta la actividad de AKT limitando el efecto antitumoral de estos fármacos, esto también ha sido descrito en MM (Shi et al. 2005). mTORC también participa en un segundo complejo, mTORC2, el cual media la fosforilación de AKT en S473. Esta fosforilación es requerida para la completa activación de AKT (Ma and Blenis 2009). Sin embargo, la segunda generación de inhibidores de mTORC, como PP242 y OSI-027, inhiben tanto mTORC1 como mTORC2 lo cual induce una mayor actividad antitumoral comparado con rapamicina, incluido en MM (Hoang et al. 2010). Aunque esta segunda generación de inhibidores de mTORC parcialmente contrarrestan el bucle de retroalimentación PI3K/AKT aun existe un segundo mecanismo de retroalimentación compensatorio, por parte de MAPK, que puede contrarrestar la actividad de estos compuestos (Hoang et al. 2012). Por lo que la resistencia observada de la línea U266 podría ser debido a una gran dependencia de esta línea de la vía de señalización Ras/Raf/Mek/Erk.

Sin embargo al combinar los inhibidores de mTORC con sorafenib, un inhibidor de Raf y por tanto de la vía de las MAPK, el mayor efecto sinérgico se obtuvo en las líneas MM.1S y H929 alcanzándose altos índices de muerte celular a dosis subletales de estos fármacos. También se obtuvo cierto efecto aunque en menor medida en las RPMI 8226 y OPM-2. Mientras que en las U266 no se observó ningún efecto. Este resultado se obtuvo de forma muy similar tanto con el PP242 como con el OSI-027. Esto corrobora que la activación de Erk producida por los inhibidores de mTORC contrarresta la actividad antitumoral de la inhibición de mTORC. No obstante, las U266 continuaron siendo insensibles a estos inhibidores por lo que la hipótesis de que la activación de las MAPK fuera responsable de la resistencia de esta línea a los inhibidores de mTORC no es correcta.

Una hipótesis alternativa es que esta línea sea más dependiente de la vía de Jak/Stat. Jak es una tirosín quinasa activada por receptores como el de la IL-6, una citoquina con un papel muy importante en la progresión del mieloma múltiple. La activación de Jak fosforila el receptor de la IL-6 y la proteína gp130 lo que permite la activación de Stat-3 entre otras vías de señalización. Al igual que la IL-6 otras citoquinas también pueden activar a Jak. Esta vía de señalización IL-6/IL-6R/Jak/Stat esta sujeta a una regulación negativa por tres familias de fosfatasa (Valentino and Pierre 2006; Xu and Qu 2008). Y puede estar activada aberrantemente, tanto por mutaciones, como la encontrada en la enfermedad mieloproliferativa

(JAK2V617F) como por inactivación epigenética de sus reguladores negativos como *SOCS1* encontrado en hepatoma o *SHP-1* encontrado en el 63-80% de los pacientes de mieloma (Chim et al. 2004). Esta última es una tirosín fosfatasa expresada en células hematopoyética y considerado un posible gen supresor tumoral. La línea de mieloma múltiple U266 comparte esta característica de presentar hipermetilado el promotor de *SHP-1* por lo que su expresión génica esta inhibida y *Stat-3* hiperactivada (Catlett-Falcone et al. 1999b; Chim et al. 2004). Debido a esto seleccionamos un fármaco como el Ruxolitinib el cual es un potente inhibidor de *Jak1/2* lo cual interrumpiría la constante activación de *Stat-3* (Egthedar et al. 2012).

A pesar de esto, al tratar las líneas de mieloma múltiple con este fármaco no se apreció ningún efecto antiproliferativo o citotóxico, al menos a la las dosis ensayadas. Esto en parte coincide con lo descrito con otros compuestos de este perfil donde solo han encontrado alguna actividad en las U266 al usar el fármaco de forma individual, no así al combinarlo con otras moléculas (Li et al. 2010). Sin embargo, al combinar el Ruxolitinib con sorafenib o con sorafenib y OSI-027 si se observa cierto efecto citotóxico en prácticamente todas las líneas de mieloma múltiple ensayadas. Este efecto fue significativamente notable en las H929 al combinar ruxolitinib+OSI-027+sorafenib y en las OPM-2 mientras que en las RPMI 8226 fue modesto. En cambio en las U266 se pudo observar potenciación del efecto, tanto del sorafenib, como del sorafenib+OSI-027. Aunque esta potenciación fue modesta en las U266 a estas dosis ensayadas estos experimento muestran que la inhibición de *Jak1/2* potencia los efectos de otros drogas al antagonizar los efectos protectores de la vía *IL-6/IL-6R/Jak/Stat* y sugiera que la falta de efectividad clínica de algunos compuestos pude ser debida a la activación de esta vía.

Según todos estos resultados podemos decir que se necesita una cuidadosa e individualizada evaluación de los beneficios con respecto a la toxicidad de cada terapia, así como una cuidadosa estratificación de los pacientes con el objetivo de optimizar y obtener los mejores resultados posibles del arsenal farmacoterapéutico que se dispone.

#### **5.4.- Optimización del análisis de presuntas células madres de mieloma múltiple.**

A pesar de los avances en la terapia del mieloma múltiple, esta continúa siendo una enfermedad incurable. Los nuevos tratamiento consiguen una remisión casi completa entre el 80 y 90% de la enfermedad, pero nunca la cura y los pacientes casi siempre recaen. Una posible explicación a este hecho es la novedosa pero controvertida hipótesis de las células madres tumorales. Esta hipótesis plantea que la quimioterapia consigue la erradicación de las células plasmáticas malignas pero deja un reservorio de células madres tumorales que siguen creciendo y pueden producir más células plasmáticas malignas. Estas células madres son actualmente resistentes a los fármacos disponibles, por lo que si una nueva terapia consiguen erradicar estas células tumorales se conseguiría la cura de la enfermedad.

En base a esta hipótesis nos propusimos analizar si el sorafenib tenía alguna actividad sobre las presuntas células madres tumorales de mieloma múltiple. Para esto inicialmente se

identificaron estas células. Según Matsui estas células sería CD138 negativas y CD20 positivas aunque según Paino este antígeno de superficie es indetectable en las líneas en cultivo por lo que no sería un buen marcador (Matsui et al. 2004; Matsui et al. 2008; Paino et al. 2012).

En este trabajo se ha realizado un estudio preliminar de la actividad del sorafenib sobre esta población de presuntas células madres utilizando inicialmente como marcador de estas células la falta de expresión del antígeno de superficie CD138. Se detectó que en todas las líneas estudiadas existe una pequeña población de células CD138 negativas siempre por debajo del 5% aunque con gran variabilidad de un experimento a otro. Esto coincide con el porcentaje de presuntas células madres detectada en estos cultivos por otras técnicas como es la detección de la “*side population*” (SP) (Jakubikova et al. 2011). Al tratar, tantos los cultivos completos como las fracciones enriquecidas o depletadas de células CD138 negativas, aumenta la población de las presuntas células madres por lo que estas células parecen ser menos sensibles a este fármaco.

Esto está justificado por el hecho demostrado de que estas células presentan una expresión incrementada de transportadores de fármacos (ABCG2 y MDR/Pgp) lo que justifica, en parte, una relativa resistencia a la terapia ya que producen una disminución de la concentración de drogas en el interior de las células (Jakubikova et al. 2011). Además, las células madres, tanto normales como tumorales, presentan mecanismos intracelulares de detoxificación lo que también contribuyen a una mayor resistencia a los fármacos como es una mayor actividad de la enzima ALDH (Matsui et al. 2004; Matsui et al. 2008). Y por último, la mayoría de las células madres se encuentran quiescentes y esta característica también contribuye a los mecanismos de resistencia a fármacos (Cheng et al. 2000).

Aunque purificando las células CD138 negativo o incluso trabajando con los cultivos completo se pudo apreciar que las presuntas células madres son más resistente al sorafenib que las células CD138 positivas. El uso de este marcador presenta numerosas desventajas. Al tratar de purificar estas células por MACS la población de células obtenidas es mayoritariamente células anexina positiva ya que las células una vez inician la ejecución de la apoptosis pierden este antígeno de superficie. Además existen contradicciones en cuanto al fenotipo real de las presuntas células madres tumorales y diferentes grupos se contradicen en cuanto a los antígenos de superficie que expresa esta población de células, por lo que se decidió analizar las células madres tumorales usando otro marcador ampliamente aceptado como característico de células madres, tanto tumorales como normales (Rasmussen et al. 2000b; Matsui et al. 2004; Matsui et al. 2008; Pilarski et al. 2008; Jakubikova et al. 2011; Hosen et al. 2012; Paino et al. 2012).

La ALDH, específicamente ALDH1A1, media la biosíntesis del ácido retinoico todo trans, así como la detoxificación de una gran variedad de compuestos tales como etanol y metabolitos activos de ciclofosfamida. Las células madres adultas exhiben unos niveles relativamente altos de actividad ALDH con respecto a su progenie diferenciada y la sonda fluorescente Aldefluor, sustrato de esta enzima, puede diferenciar las células madres de tejidos



adultos (Jones et al. 1995).

Al marcar las células MM.1S con esta sonda se observó que esta línea presenta una pequeña población de células con unos niveles mayores de actividad de esta enzima. Al marcar simultáneamente con anticuerpo anti CD138 se detectó que el 68 % de estas células son CD138 negativas pero el restante 32 % son CD138 positivas y todas las células CD138 negativas no eran Aldefluor positivas. Existen publicaciones recientes que ya han llamado la atención sobre este hecho (Jakubikova et al. 2011).

Diferentes antígenos de superficies han sido usados para identificar las presuntas células madres tumorales y diferentes estudios han intentado identificar y estudiar estas células. Algunos estudios han identificado las propiedades clonogénicas de la fracción celular CD138 negativa por lo que se han propuesto estas como presuntas células madres de mieloma múltiple, sin embargo estas células no se solapan completamente con otros marcadores de células madres como el *SP* (Jakubikova et al. 2011). En este estudio se observa como tampoco hay una completa concordancia con la expresión de ALDH, otro marcador característico de células madres. Aunque este ha sido un estudio preliminar, que ha consistido más en poner a punto las técnicas para la identificación y separación de la presuntas células madres de mieloma múltiple, estos resultados, junto con los publicados por otros grupos podrían indicar que las presuntas células madres de mieloma múltiple tienen una expresión heterogénea del antígeno de superficie CD138 aunque con un predominio de una expresión baja.



## 6.-CONCLUSIONES

1- El sorafenib es capaz de inducir apoptosis por la vía intrínseca en líneas celulares y en muestra de pacientes de mieloma múltiple. El sorafenib induce una reducción en los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X<sub>L</sub> y Mcl-1 mientras que hace que aumente la expresión de la proteína proapoptótica Puma. Estos dos efectos parecen ser suficiente para que se active la vía intrínseca y se activen las caspasas.

2- El sorafenib induce autofagia en las células de mieloma múltiple debido a la inhibición del complejo mTORC1. Esto tiene un efecto protector en células capaces de efectuar la apoptosis en cambio participa en la muerte en aquellas células resistentes a la apoptosis por sobreexpresión de Bcl-X<sub>L</sub>.

3- El sorafenib es capaz de inducir necroptosis en MM.1S cuando se inhiben las caspasas. La necroptosis es responsable del mantenimiento de los niveles de muerte cuando se incuban estas células con Z-VAD.

4- El sorafenib y el bortezomib pueden tener efecto sinérgico o antagónico dependiendo de la línea ensayada. En la línea RPMI 8226 se observó un potente efecto sinérgico entre estos dos fármacos.

5- El sorafenib sensibiliza a APO2L/TRAIL a las células resistentes a este ligando mortal. Este efecto es debido principalmente a la disminución de los niveles de Mcl-1 lo que permite una mejor conexión entre la vía extrínseca e intrínseca así como a una más eficiente formación del DISC por disminución de los niveles de cFLIP<sub>L</sub> y un aumento de los niveles de FADD.

6- La combinación de los inhibidores de mTOR de nueva generación con el sorafenib aumenta la actividad citotóxica de estas drogas. Este efecto es debido a una mejor inhibición del bucle de retroalimentación positiva que inducen los inhibidores de mTOR.



## 6.-BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**: 2481-2495.
- Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. 2006. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* **407**: 597-612.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**: 171.
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* **48**: 589-601.
- Amaravadi RK, Thompson CB. 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* **13**: 7271-7279.
- Anwar AR, Moqbel R, Walsh GM, Kay AB, Wardlaw AJ. 1993. Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J Exp Med* **177**: 839-843.
- Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**: 420-430.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308.
- Auclair D, Miller D, Yatsula V, Pickett W, Carter C, Chang Y, Zhang X, Wilkie D, Burd A, Shi H et al. 2007. Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia* **21**: 439-445.
- Baccarini M. 2005. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". *FEBS Lett* **579**: 3271-3277.
- Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. 1994. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *Br J Haematol* **87**: 68-74.
- Balsas P. 2011. MECANISMO DE LA MUERTE INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DEL PROTEASOMA BORTEZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA. EFECTO DE SU COMBINACIÓN CON APO2L/TRAIL Y MELFALÁN. *universidad de zaragoza*.
- Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. 2005. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **65**: 3025-3029.
- Barille S, Bataille R, Amiot M. 2000. The role of interleukin-6 and interleukin-6/interleukin-6 receptor-alpha complex in the pathogenesis of multiple myeloma. *Eur Cytokine Netw* **11**: 546-551.
- Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L et al. 2007. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* **110**: 4030-4036.
- Bataille R, Harousseau JL. 1997. Multiple myeloma. *N Engl J Med* **336**: 1657-1664.

- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**: 2570-2581.
- Bergsagel PL, Smith AM, Szczepek A, Mant MJ, Belch AR, Pilarski LM. 1995. In multiple myeloma, clonotypic B lymphocytes are detectable among CD19+ peripheral blood cells expressing CD38, CD56, and monotypic Ig light chain. *Blood* **85**: 436-447.
- Berry DL, Baehrecke EH. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**: 1137-1148.
- Betin VM, Lane JD. 2009. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* **122**: 2554-2566.
- Beutler B, Cerami A. 1986. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**: 584-588.
- Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, Rapp MJ, Harousseau JL, Moisan JP, Bataille R. 2001. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* **18**: 212-224.
- Bhagwat SV, Gokhale PC, Crew AP, Cooke A, Yao Y, Mantis C, Kahler J, Workman J, Bittner M, Dudkin L et al. 2011. Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin. *Mol Cancer Ther* **10**: 1394-1406.
- Bialik S, Kimchi A. 2006. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* **75**: 189-210.
- Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B. 1993. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med* **178**: 1023-1031.
- Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. 2004. Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J* **382**: 651-657.
- Bogner C, Leber B, Andrews DW. 2010. Apoptosis: embedded in membranes. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 845-851.
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D. 1995. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* **270**: 387-391.
- Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. 2006. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* **42**: 1574-1580.
- Bosque A, Aguilo JI, Alava MA, Paz-Artal E, Naval J, Allende LM, Anel A. 2007. The induction of Bim expression in human T-cell blasts is dependent on nonapoptotic Fas/CD95 signaling. *Blood* **109**: 1627-1635.
- Bosque A, Aguilo JI, del Rey M, Paz-Artal E, Allende LM, Naval J, Anel A. 2008. Cell cycle regulation by FasL and Apo2L/TRAIL in human T-cell blasts. Implications for autoimmune lymphoproliferative syndromes. *J Leukoc Biol* **84**: 488-498.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T et al. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**: 1025-1040.

- Brennan SK, Matsui W. 2009. Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *J Mol Med (Berl)* **87**: 1079-1085.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, Haegeman G, D'Herde K, Vandenabeele P. 2004. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* **15**: 1089-1100.
- Brunner T, Yoo NJ, LaFace D, Ware CF, Green DR. 1996. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* **8**: 1017-1026.
- Burke JE, Dennis EA. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S237-242.
- Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM, Clark RS, Graham SH, Chen J. 2007. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* **27**: 9278-9293.
- Carracedo A, Baselga J, Pandolfi PP. 2008a. Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors. *Cell Cycle* **7**: 3805-3809.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC et al. 2008b. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* **118**: 3065-3074.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3666-3670.
- Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. 1999a. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol* **11**: 490-496.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G et al. 1999b. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**: 105-115.
- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**: 351-365.
- Clark EA, Brugge JS. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
- Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gomez G, Brady HJ. 2006. Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **281**: 5750-5759.
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. 2012. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 7-12.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **65**: 10946-10951.
- Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, Gu W, Nilsson K, Knowles DM, Boccadoro M et al. 1994. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* **8**: 758-767.

- Corradini P, Ladetto M, Voena C, Palumbo A, Inghirami G, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A. 1993. Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* **81**: 2708-2713.
- Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**: 647-656.
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**: 2168-2174.
- Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K et al. 2011. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7950-7955.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**: 855-862.
- Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, Bortolon E, Ichetovkin M, Chen C, McNabola A et al. 2007. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* **59**: 561-574.
- Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M et al. 2011. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**: 467-472.
- Chatterjee M, Honemann D, Lentzsch S, Bommert K, Sers C, Herrmann P, Mathas S, Dorken B, Bargou RC. 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.
- Chatterjee M, Stuhmer T, Herrmann P, Bommert K, Dorken B, Bargou RC. 2004. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* **104**: 3712-3721.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. 1999. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* **9**: 967-970.
- Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, Pandey SK, Nwokorie C, Onwudiwe N, Srivastava RK. 2001. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* **20**: 6073-6083.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. 2000. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* **287**: 1804-1808.
- Chim CS, Fung TK, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. 2004. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* **103**: 4630-4635.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010-1014.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**: 299-310.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**: 1112-1123.



- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**: 10-27.
- Chu CT, Zhu J, Dagda R. 2007. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy* **3**: 663-666.
- Daish TJ, Mills K, Kumar S. 2004. Drosophila caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* **7**: 909-915.
- Dal Lago L, D'Hondt V, Awada A. 2008. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist* **13**: 845-858.
- Dalton WS, Grogan TM, Rybski JA, Scheper RJ, Richter L, Kailey J, Broxterman HJ, Pinedo HM, Salmon SE. 1989. Immunohistochemical detection and quantitation of P-glycoprotein in multiple drug-resistant human myeloma cells: association with level of drug resistance and drug accumulation. *Blood* **73**: 747-752.
- Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. 1994. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* **8**: 1280-1284.
- David KK, Sasaki M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL. 2006. EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ* **13**: 1147-1155.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE. 1987. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* **138**: 957-962.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**: 112-119.
- Deisseroth A, Kaminskis E, Grillo J, Chen W, Saber H, Lu HL, Rothmann MD, Brar S, Wang J, Garnett C et al. 2012. U.S. Food and Drug Administration approval: ruxolitinib for the treatment of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis. *Clin Cancer Res* **18**: 3212-3217.
- Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S. 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila. *Curr Biol* **19**: 1741-1746.
- Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239-252.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279-3290.
- Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. 2002. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J* **21**: 64-71.
- Dick JE. 2005. Complexity of the human acute myeloid leukemia stem cell compartment: implications for therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**: 9-11.
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM. 2007. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* **282**: 4702-4710.
- Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. 2010. Cross talk between apoptosis and

- autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* **29**: 1717-1719.
- Dudgeon C, Peng R, Wang P, Sebastiani A, Yu J, Zhang L. 2012. Inhibiting oncogenic signaling by sorafenib activates PUMA via GSK3beta and NF-kappaB to suppress tumor cell growth. *Oncogene*.
- Dudgeon C, Wang P, Sun X, Peng R, Sun Q, Yu J, Zhang L. 2010. PUMA induction by FoxO3a mediates the anticancer activities of the broad-range kinase inhibitor UCN-01. *Mol Cancer Ther* **9**: 2893-2902.
- Durie BG, Salmon SE. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* **36**: 842-854.
- Eghtedar A, Verstovsek S, Estrov Z, Burger J, Cortes J, Bivins C, Faderl S, Ferrajoli A, Borthakur G, George S et al. 2012. Phase 2 study of the JAK kinase inhibitor ruxolitinib in patients with refractory leukemias, including postmyeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia. *Blood* **119**: 4614-4618.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* **16**: 966-975.
- Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. 2009. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis* **14**: 376-391.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R et al. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **273**: 14363-14367.
- Epstein J, Xiao HQ, Oba BK. 1989. P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood* **74**: 913-917.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* **116**: 2161-2172.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. 1998. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **5**: 551-562.
- Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberg K, Elazar Z. 2006. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* **281**: 36303-36316.
- Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L. 2008. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* **4**: 435-441.
- Ferlin M, Noraz N, Hertogh C, Brochier J, Taylor N, Klein B. 2000. Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an interleukin-6-independent transduction pathway. *Br J Haematol* **111**: 626-634.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S et al. 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* **23**: 2210-2221.
- Francois M, Le Cabec V, Dupont MA, Sansonetti PJ, Maridonneau-Parini I. 2000. Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* **68**: 1289-1296.

- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. 2008. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**: 797-806.
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* **2**: 1096-1103.
- Galan-Malo P. 2010. Papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por fármacos antitumorales. *Tesis doctoral Universidad de Zaragoza*.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* **14**: 1237-1243.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S et al. 2011. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*.
- Gamen S, Anel A, Lasierra P, Alava MA, Martinez-Lorenzo MJ, Pineiro A, Naval J. 1997. Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett* **417**: 360-364.
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N et al. 2008. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**: 1076-1081.
- Gazitt Y. 1999. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia* **13**: 1817-1824.
- Giuliani N, Lunghi P, Morandi F, Colla S, Bonomini S, Hojden M, Rizzoli V, Bonati A. 2004. Downmodulation of ERK protein kinase activity inhibits VEGF secretion by human myeloma cells and myeloma-induced angiogenesis. *Leukemia* **18**: 628-635.
- Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. 2011. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* **8**: 136-147.
- Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN. 2005. c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**: 14507-14513.
- Gomez-Benito M, Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Marzo I, Naval J. 2007. Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Exp Cell Res* **313**: 2378-2388.
- Gomez-Benito M, Marzo I, Anel A, Naval J. 2005. Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in myeloma cells through PUMA up-regulation, Bax and Bak activation, and Mcl-1 elimination. *Mol Pharmacol* **67**: 1991-1998.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**: 1797-1806.
- Goto T, Ishizaka A, Kobayashi F, Kohno M, Sawafuji M, Tasaka S, Ikeda E, Okada Y, Maruyama I, Kobayashi K. 2004. Importance of tumor necrosis factor-alpha cleavage process in post-transplantation lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **170**: 1239-1246.

- Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. 2008. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* **15**: 1875-1886.
- Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T. 2009. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy* **5**: 1198-1200.
- Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V et al. 2010. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell* **40**: 863-876.
- Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D et al. 2001. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* **15**: 1950-1961.
- Gupta M, Hendrickson AE, Yun SS, Han JJ, Schneider PA, Koh BD, Stenson MJ, Wellik LE, Shing JC, Peterson KL et al. Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood* **119**: 476-487.
- Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. 2011. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* **146**: 633-644.
- Gutierrez MG, Munafo DB, Beron W, Colombo MI. 2004. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* **117**: 2687-2697.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. 2006. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* **312**: 3701-3710.
- Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**: 3-21.
- Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinowich H. 2006. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* **281**: 10153-10163.
- Harada H, Kawano MM, Huang N, Harada Y, Iwato K, Tanabe O, Tanaka H, Sakai A, Asaoku H, Kuramoto A. 1993. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* **81**: 2658-2663.
- Hari PN, Zhang MJ, Roy V, Perez WS, Bashey A, To LB, Effenbein G, Freytes CO, Gale RP, Gibson J et al. 2009. Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia* **23**: 1528-1534.
- Harousseau JL, Dreyling M. 2010. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **21 Suppl 5**: v155-157.
- He K, Xu T, Goldkorn A. 2011. Cancer cells cyclically lose and regain drug-resistant highly tumorigenic features characteristic of a cancer stem-like phenotype. *Mol Cancer Ther* **10**: 938-948.
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**: 1100-1111.

- Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T et al. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**: 432-438.
- Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J et al. 1996. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* **87**: 265-272.
- Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. 2001. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* **20**: 5991-6000.
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* **14**: 354-359.
- Hirt UA, Leist M. 2003. Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ* **10**: 1156-1164.
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. 2008. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**: 1311-1323.
- Hoang B, Benavides A, Shi Y, Yang Y, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. 2012. The PP242 mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) in multiple myeloma cells via a target of rapamycin complex 1 (TORC1)/eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF-4E)/RAF pathway and activation is a mechanism of resistance. *J Biol Chem* **287**: 21796-21805.
- Hoang B, Frost P, Shi Y, Belanger E, Benavides A, Pezeshkpour G, Cappia S, Guglielmelli T, Gera J, Lichtenstein A. 2010. Targeting TORC2 in multiple myeloma with a new mTOR kinase inhibitor. *Blood* **116**: 4560-4568.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**: 489-495.
- Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, Nakata J, Mizutani Y, Hasegawa K, Mugitani A, Ichihara H, Aoyama Y, Nishida S et al. 2012. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. *Leukemia*.
- Hoshino D, Jourquin J, Emmons SW, Miller T, Goldgof M, Costello K, Tyson DR, Brown B, Lu Y, Prasad NK et al. 2012. Network analysis of the focal adhesion to invadopodia transition identifies a PI3K-PKCalpha invasive signaling axis. *Sci Signal* **5**: ra66.
- Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**: 891-900.
- Huang DC, Strasser A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**: 839-842.
- Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**: 4837-4848.
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**: 574-587.
- Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, Klippel S, Cervi D, Daley JF, Cholujska D,

- Kong SY, Leiba M, Blotta S et al. 2011. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood* **117**: 4409-4419.
- Jane EP, Premkumar DR, Pollack IF. 2006. Coadministration of sorafenib with rottlerin potently inhibits cell proliferation and migration in human malignant glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 1070-1080.
- Jensen GS, Belch AR, Mant MJ, Ruether BA, Yacyszyn BR, Pilarski LM. 1993. Expression of multiple beta 1 integrins on circulating monoclonal B cells in patients with multiple myeloma. *Am J Hematol* **43**: 29-36.
- Johansen T, Lamark T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**: 279-296.
- Jones RJ, Armstrong SA. 2008. Cancer stem cells in hematopoietic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**: 12-16.
- Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J. 1995. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* **85**: 2742-2746.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med* **355**: 1253-1261.
- Kagedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* **359**: 335-343.
- Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, Vandenabeele P. 2002. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ* **9**: 981-994.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**: 571-580.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. 2007a. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253.
- Kim KM, Lee YJ. 2005. Amiloride augments TRAIL-induced apoptotic death by inhibiting phosphorylation of kinases and phosphatases associated with the P13K-Akt pathway. *Oncogene* **24**: 355-366.
- Kim WH, Choi CH, Kang SK, Kwon CH, Kim YK. 2005. Ceramide induces non-apoptotic cell death in human glioma cells. *Neurochem Res* **30**: 969-979.
- Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. 2007b. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* **26**: 675-687.
- Kimberley FC, Screaton GR. 2004. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* **14**: 359-372.
- Kirshner J, Thulien KJ, Martin LD, Debes Marun C, Reiman T, Belch AR, Pilarski LM. 2008. A unique three-dimensional model for evaluating the impact of therapy on multiple myeloma. *Blood* **112**: 2935-2945.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579-5588.

- Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **7**: 129-145.
- Koterski JF, Nahvi M, Venkatesan MM, Haimovich B. 2005. Virulent *Shigella flexneri* causes damage to mitochondria and triggers necrosis in infected human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **73**: 504-513.
- Kraus WL. 2008. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 294-302.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA et al. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1463-1467.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3-11.
- Kroemer G, Levine B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 1004-1010.
- Kroemer G, Martin SJ. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**: 725-730.
- Kumar S. 2009. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma: advances in current therapy. *Med Oncol* **27 Suppl 1**: S14-24.
- Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T, Greipp PR, Witzig TE. 2005. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* **19**: 1466-1470.
- Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, Gertz MA, Greipp PR, Hayman SR, Kyle RA et al. 2009. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* **84**: 1095-1110.
- Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, Huang DC, Colman PM. 2008. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* **15**: 1564-1571.
- Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Bjorklund AC, Hultenby K, Lundin J et al. 2009. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ* **16**: 1018-1029.
- Lasithiotakis KG, Sinnberg TW, Schitteck B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, Garbe C, Meier FE. 2008. Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells. *J Invest Dermatol* **128**: 2013-2023.
- Laubach JP, Richardson PG, Anderson KC. 2010. The evolution and impact of therapy in multiple myeloma. *Med Oncol* **27 Suppl 1**: S1-6.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. 2005a. Death receptor signaling. *J Cell Sci* **118**: 265-267.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. 2005b. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**: 2665-2672.
- Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, Kumar S, Raje

- N, Richardson PG, Harousseau JL et al. 2004a. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* **104**: 2886-2892.
- Le Gouill S, Podar K, Harousseau JL, Anderson KC. 2004b. Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle* **3**: 1259-1262.
- Leber B, Lin J, Andrews DW. 2007. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* **12**: 897-911.
- . 2010. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene* **29**: 5221-5230.
- Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* **18**: 655-664.
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. 2007. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1196-1212.
- Levine B, Sinha S, Kroemer G. 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**: 600-606.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Li J, Favata M, Kelley JA, Caulder E, Thomas B, Wen X, Sparks RB, Arvanitis A, Rogers JD, Combs AP et al. 2010. INCB16562, a JAK1/2 selective inhibitor, is efficacious against multiple myeloma cells and reverses the protective effects of cytokine and stromal cell support. *Neoplasia* **12**: 28-38.
- Li LY, Luo X, Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C et al. 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* **10**: 776-787.
- Lincz LF, Yeh TX, Spencer A. 2001. TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy. *Leukemia* **15**: 1650-1657.
- Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* **66**: 11851-11858.
- Liu P, Leong T, Quam L, Billadeau D, Kay NE, Greipp P, Kyle RA, Oken MM, Van Ness B. 1996. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* **88**: 2699-2706.
- Lopez-Royuela N, Balsas P, Galan-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J. 2010. Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 311-322.



- Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K. 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* **13**: 978-988.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490.
- Ma XM, Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 307-318.
- Ma Y, Temkin V, Liu H, Pope RM. 2005. NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein. *J Biol Chem* **280**: 41827-41834.
- Mace PD, Shirley S, Day CL. 2010. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ* **17**: 46-53.
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monle n I, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Alava MA, Naval J. 1999. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* **163**: 1274-1281.
- Matsui W, Borrello I, Mitsiades C. 2012. Autologous stem cell transplantation and multiple myeloma cancer stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* **18**: S27-32.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. 2004. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* **103**: 2332-2336.
- Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, McNiece I, Lin L, Ambinder RF, Peacock C et al. 2008. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* **68**: 190-197.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A et al. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1263-1284.
- Mehlen P, Bredesen DE. 2011. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* **4**: mr2.
- Menoret E, Gomez-Bougie P, Geffroy-Luseau A, Daniels S, Moreau P, Le Gouill S, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. 2006. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* **108**: 1346-1352.
- Micheau O, Tschopp J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181-190.
- Michels J, Johnson PW, Packham G. 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 267-271.
- Mille F, Thibert C, Fombonne J, Rama N, Guix C, Hayashi H, Corset V, Reed JC, Mehlen P. 2009. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* **11**: 739-746.
- Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S, Hideshima T, Chauhan D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. 2007. The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* **21**: 1007-1034, vii-viii.

- Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC. 2001. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* **98**: 795-804.
- Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J et al. 2001. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* **167**: 6736-6744.
- Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzel E, Basanez G, Meda P et al. 2010. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* **142**: 889-901.
- Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H, Pineau D, Morineau N, Milpied N, Harousseau JL, Bataille R. 2004. Patients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica* **89**: 547-551.
- Morrison SJ, Kimble J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**: 1068-1074.
- Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrour A, Greer PA, Menissier-de Murcia J, Susin SA. 2007. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* **27**: 4844-4862.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365.
- Nagata S, Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* **130**: 165-178.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 458-467.
- Ng MH, Lau KM, Wong WS, To KW, Cheng SH, Tsang KS, Chan NP, Kho BC, Lo KW, Tong JH et al. 2003. Alterations of RAS signalling in Chinese multiple myeloma patients: absent BRAF and rare RAS mutations, but frequent inactivation of RASSF1A by transcriptional silencing or expression of a non-functional variant transcript. *Br J Haematol* **123**: 637-645.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL et al. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* **66**: 1500-1508.
- Oberst A, Green DR. 2011. It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 757-763.
- Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC. 1997. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* **159**: 2212-2221.
- Ozoren N, El-Deiry WS. 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells

- in response to TRAIL. *Neoplasia* **4**: 551-557.
- Paino T, Ocio EM, Paiva B, San-Segundo L, Garayoa M, Gutierrez NC, Sarasquete ME, Pandiella A, Orfao A, San-Miguel JF. 2012. CD20 positive cells are undetectable in the majority of multiple myeloma cell lines and are not associated with a cancer stem cell phenotype. *Haematologica*.
- Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW. 2006. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* **66**: 1611-1619.
- Paquette RL, Berenson J, Lichtenstein A, McCormick F, Koeffler HP. 1990. Oncogenes in multiple myeloma: point mutation of N-ras. *Oncogene* **5**: 1659-1663.
- Pellat-Deceunynck C, Bataille R. 2004. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* **32**: 293-301.
- Peng CL, Guo W, Ji T, Ren T, Yang Y, Li DS, Qu HY, Li X, Tang S, Yan TQ et al. 2009. Sorafenib induces growth inhibition and apoptosis in human synovial sarcoma cells via inhibiting the RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Biol Ther* **8**.
- Perez-Galan P, Marzo I, Giraldo P, Rubio-Felix D, Lasierra P, Larrad L, Anel A, Naval J. 2002. Role of caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **16**: 2106-2114.
- Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG, Sundstrom C, Givol I, Tsujimoto Y, Nilsson K. 1992. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* **79**: 495-502.
- Pilarski LM, Baigorri E, Mant MJ, Pilarski PM, Adamson P, Zola H, Belch AR. 2008. Multiple Myeloma Includes Phenotypically Defined Subsets of Clonotypic CD20+ B Cells that Persist During Treatment with Rituximab. *Clin Med Oncol* **2**: 275-287.
- Pilarski LM, Belch AR. 1994. Circulating monoclonal B cells expressing P glycoprotein may be a reservoir of multidrug-resistant disease in multiple myeloma. *Blood* **83**: 724-736.
- Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K, Pruski E, Coupland RW, Belch AR. 2000. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood* **95**: 1056-1065.
- Pilarski LM, Jensen GS. 1992. Monoclonal circulating B cells in multiple myeloma. A continuously differentiating, possibly invasive, population as defined by expression of CD45 isoforms and adhesion molecules. *Hematol Oncol Clin North Am* **6**: 297-322.
- Pilarski LM, Seeberger K, Coupland RW, Eshpeter A, Keats JJ, Taylor BJ, Belch AR. 2002. Leukemic B cells clonally identical to myeloma plasma cells are myelomagenic in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **30**: 221-228.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**: 12687-12690.
- Platanias LC. 2003. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**: 4667-4679.
- Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D,

- Shima Y, Chauhan D et al. 2001. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* **98**: 428-435.
- Portier M, Moles JP, Mazars GR, Jeanteur P, Bataille R, Klein B, Theillet C. 1992. p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* **7**: 2539-2543.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M. 1999. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* **29**: 3945-3950.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**: 931-946.
- Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S. 2005. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem* **280**: 35217-35227.
- Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. 2007. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly imatinib mesylate-resistant bcr/abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. *Mol Pharmacol* **72**: 788-795.
- Raja KR, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol* **149**: 334-351.
- Rajkumar SV. 2011. Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* **87**: 78-88.
- Ramakrishnan V, Timm M, Haug JL, Kimlinger TK, Wellik LE, Witzig TE, Rajkumar SV, Adjei AA, Kumar S. 2009. Sorafenib, a dual Raf kinase/vascular endothelial growth factor receptor inhibitor has significant anti-myeloma activity and synergizes with common anti-myeloma drugs. *Oncogene* **29**: 1190-1202.
- Rasmussen T, Jensen L, Honore L, Johnsen HE. 2000a. Frequency and kinetics of polyclonal and clonal B cells in the peripheral blood of patients being treated for multiple myeloma. *Blood* **96**: 4357-4359.
- Rasmussen T, Jensen L, Johnsen HE. 2000b. Levels of circulating CD19+ cells in patients with multiple myeloma. *Blood* **95**: 4020-4021.
- Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. 2005. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* **105**: 317-323.
- Rasola A, Bernardi P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* **12**: 815-833.
- Ribatti D. 2012. Cancer stem cells and tumor angiogenesis. *Cancer Lett* **321**: 13-17.
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R et al. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* **348**: 2609-2617.
- Roberts PJ, Der CJ. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**: 3291-3310.
- Rosato RR, Almenara JA, Coe S, Grant S. 2007. The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1

- and cFLIPL down-regulation. *Cancer Res* **67**: 9490-9500.
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S. 2003. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* **2**: 1273-1284.
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* **16**: 6914-6925.
- Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* **46**: 383-393.
- Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. 2008. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* **15**: 105-112.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-1687.
- Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. 2009. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* **16**: 12-20.
- Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* **17**: 1-11.
- Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 655-662.
- Schwartz GG. 1997. Multiple myeloma: clusters, clues, and dioxins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**: 49-56.
- Sengupta TK, Talbot ES, Scherle PA, Ivashkiv LB. 1998. Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11107-11112.
- Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. 2010. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 508-520.
- Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. 2005. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* **4**: 1533-1540.
- Shibue T, Taniguchi T. 2006. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* **119**: 2036-2043.
- Siegel RM. 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **6**: 308-317.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821-5828.
- Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**: 31469-31472.
- Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, Faghieh M, Brendel E, Voliotis D, Haase CG et al. 2005. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid

- tumors. *J Clin Oncol* **23**: 965-972.
- Subramaniam D, Ramalingam S, Houchen CW, Anant S. 2010. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* **10**: 359-371.
- Suffys P, Beyaert R, De Valck D, Vanhaesebroeck B, Van Roy F, Fiers W. 1991. Tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A2 activity, but not with arachidonic acid release per se. *Eur J Biochem* **195**: 465-475.
- Sun J, Sun Q, Brown MF, Dudgeon C, Chandler J, Xu X, Shu Y, Zhang L, Yu J. 2012. The Multi-Targeted Kinase Inhibitor Sunitinib Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells via PUMA. *PLoS One* **7**: e43158.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-446.
- Tai YT, Fulciniti M, Hideshima T, Song W, Leiba M, Li XF, Rumizen M, Burger P, Morrison A, Podar K et al. 2007. Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis. *Blood* **110**: 1656-1663.
- Tait SW, Green DR. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 621-632.
- Takishita M, Kosaka M, Goto T, Saito S. 1994. Cellular origin and extent of clonal involvement in multiple myeloma: genetic and phenotypic studies. *Br J Haematol* **87**: 735-742.
- Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**: 9677-9682.
- Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C et al. 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* **111**: 379-382.
- Temkin V, Huang Q, Liu H, Osada H, Pope RM. 2006. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis. *Mol Cell Biol* **26**: 2215-2225.
- Trcic RL, Skelin IK, Sustercic D, Planinc-Peraica A, Ajdukovic R, Haris V, Kusec R, Begovic D. 2010. Cytogenetics of multiple myeloma. *Coll Antropol* **34**: 41-44.
- Ullman E, Fan Y, Stawowczyk M, Chen HM, Yue Z, Zong WX. 2008. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* **15**: 422-425.
- Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Vidriales MB, Teoh G, Hoshi Y, Schlossman RL, DeCaprio JA, Anderson KC. 1996. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood* **88**: 2219-2227.
- Valentino L, Pierre J. 2006. JAW/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* **71**: 713-721.
- van Raam BJ, Salvesen GS. 2011. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. *Biochim Biophys Acta* **1824**: 113-122.
- Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P. 2010. Necroptosis,

- necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ* **17**: 922-930.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 700-714.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P. 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* **187**: 1477-1485.
- Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**: 1635-1636.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D et al. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**: 855-867.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13884-13888.
- Wang MW, Consoli U, Lane CM, Durett A, Lauppe MJ, Champlin R, Andreeff M, Deisseroth AB. 1998. Rescue from apoptosis in early (CD34-selected) versus late (non-CD34-selected) human hematopoietic cells by very late antigen 4- and vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1-dependent adhesion to bone marrow stromal cells. *Cell Growth Differ* **9**: 105-112.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**: 727-730.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**: 678-688.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**: 673-682.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 835-844.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M et al. 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* **64**: 7099-7109.
- Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M et al. 2007. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* **2**: 147-159.
- Willis SN, Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 617-625.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee

- EF, Fairlie WD, Bouillet P et al. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**: 856-859.
- Won JS, Singh I. 2006. Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic Biol Med* **40**: 1875-1888.
- Wurstle ML, Laussmann MA, Rehm M. 2012. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* **318**: 1213-1220.
- Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102-1109.
- Xu D, Qu CK. 2008. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* **13**: 4925-4932.
- Xu Y, Huang S, Liu ZG, Han J. 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem* **281**: 8788-8795.
- Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. 1998. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood* **92**: 2908-2913.
- Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, Ichikawa R, Kinjo M, Ohsumi Y. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J Cell Biol* **198**: 219-233.
- Yang J, Takahashi Y, Cheng E, Liu J, Terranova PF, Zhao B, Thrasher JB, Wang HG, Li B. 2010. GSK-3 $\beta$  promotes cell survival by modulating Bif-1-dependent autophagy and cell death. *J Cell Sci* **123**: 861-870.
- Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* **17**: 1487-1496.
- Yang W, Monroe J, Zhang Y, George D, Bremer E, Li H. 2006. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett* **243**: 217-227.
- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* **12**: 814-822.
- Yata K, Yaccoby S. 2004. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia* **18**: 1891-1897.
- Yee KS, Wilkinson S, James J, Ryan KM, Vousden KH. 2009. PUMA- and Bax-induced autophagy contributes to apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, Yuo A, Hayashi Y, Georgescu MM, Kondo Y et al. 2008. Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. *Autophagy* **4**: 629-640.
- Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 47-59.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-1132.
- Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH, Adjei AA. 2005. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase



- inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* **24**: 6861-6869.
- Yu C, Friday BB, Lai JP, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA. 2006a. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* **5**: 2378-2387.
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. 2006b. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4952-4957.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**: 259-263.
- Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang HY, Jiang FJ, Zou S, Chen Y, Zheng XL, Klionsky DJ, Liang Y et al. 2012. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **8**: 883-892.
- Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. 2009. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* **10**: 285-292.
- Zang Y, Thomas SM, Chan ET, Kirk CJ, Freilino ML, Delancey HM, Grandis JR, Li C, Johnson DE. 2012. The next generation proteasome inhibitors carfilzomib and oprozomib activate prosurvival autophagy via induction of the unfolded protein response and ATF4. *Autophagy* **8**.
- Zeng Z, Shi YX, Tsao T, Qiu Y, Kornblau SM, Baggerly KA, Liu W, Jessen K, Liu Y, Kantarjian H et al. 2012. Targeting of mTORC1/2 by the mTOR kinase inhibitor PP242 induces apoptosis in AML cells under conditions mimicking the bone marrow microenvironment. *Blood* **120**: 2679-2689.
- Zhang B, Fenton RG. 2002. Proliferation of IL-6-independent multiple myeloma does not require the activity of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *J Cell Physiol* **193**: 42-54.
- Zhang D, Fan Z, Han Y, Bai X, Liu W, Lu S, Wang M, Xu L, Luo J, Li J et al. 2011a. Apoptosis-inducing factor is involved in gentamicin-induced vestibular hair cell death. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **74**: 1-5.
- Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* **325**: 332-336.
- Zhang N, Chen Y, Jiang R, Li E, Chen X, Xi Z, Guo Y, Liu X, Zhou Y, Che Y et al. 2011b. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. *Autophagy* **7**: 598-612.
- Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, McQueen T, Evans RL, Bornmann WG, McCubrey J, Cortes J, Andreeff M. 2008. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia* **22**: 808-818.
- Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. 2007. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am J Pathol* **170**: 75-86.
- Zhu K, Dunner K, Jr., McConkey DJ. 2009. Proteasome inhibitors activate autophagy

- as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* **29**: 451-462.
- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* **18**: 1272-1282.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**: 405-413.
- Zukerberg LR, Benedict WF, Arnold A, Dyson N, Harlow E, Harris NL. 1996. Expression of the retinoblastoma protein in low-grade B-cell lymphoma: relationship to cyclin D1. *Blood* **88**: 268-276.