

Nelia Jiménez Alduán

Estudio de la apoptosis inducida
por el inhibidor de proteasoma
ixazomib en células de mieloma.
Evaluación de factores de
resistencia y análisis de su
potenciación por agonistas BH3

Director/es

Naval Iraberri, José Javier
Marzo Rubio, Isabel

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL
INHIBIDOR DE PROTEASOMA IXAZOMIB EN
CÉLULAS DE MIELOMA. EVALUACIÓN DE
FACTORES DE RESISTENCIA Y ANÁLISIS DE SU
POTENCIACION POR AGONISTAS BH3

Autor

Nelia Jiménez Alduán

Director/es

Naval Iraberri, José Javier
Marzo Rubio, Isabel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2022



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral 2022

ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DE PROTEASOMA IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA. EVALUACIÓN DE FACTORES DE RESISTENCIA Y ANÁLISIS DE SU POTENCIACIÓN POR AGONISTAS BH3

Nelia Jiménez Alduán

Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Facultad de Ciencias



Universidad
Zaragoza



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA
POR EL INHIBIDOR DE PROTEASOMA
IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA.
EVALUACIÓN DE FACTORES DE
RESISTENCIA Y ANÁLISIS DE SU
POTENCIACION POR AGONISTAS BH3.**

Memoria presentada por

Nelia Jiménez Alduán

Marzo 2022

D. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Dña. Isabel Marzo Rubio, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor de proteasoma Ixazomib en células de mieloma. Evaluación de factores de resistencia y análisis de su potenciación por agonistas BH3”** ha sido realizada por **Nelia Jiménez Alduán** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para que su autora pueda optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, Marzo 2022

Javier
Naval

Firmado digitalmente por
Javier Naval
Nombre de
reconocimiento (DN):
cn=Javier Naval, o, ou,
email=jnaval@unizar.es,
c=ES
Fecha: 2022.03.10
17:00:41 +01'00'

MARZO
RUBIO
ISABEL -
DNI
25439479F

Firmado
digitalmente por
MARZO RUBIO
ISABEL - DNI
25439479F
Fecha: 2022.03.13
19:38:25 +01'00'

Fdo: José Javier Naval Iraberri

Fdo: Isabel Marzo Rubio

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a una subvención destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación del Gobierno de Aragón cofinanciadas con el Programa Operativo FSE 2014-2020 (BOA nº 9, 16 de enero 2017).

La frase “el tiempo pasa volando” es cierta hasta el momento en el que te toca recoger en palabras el trabajo de cuatro años. En este momento no solo se ralentiza, sino que es capaz de correr a la velocidad de la luz, siendo la etapa más complicada, pero a la vez la más placentera y aprendizaje personal. Nunca pensé que llegaría este día, pero aquí está. Son muchas las personas que me han soportado, sí soportado has leído bien, porque no se puede decir de otra manera tras la montaña de emociones que se producen durante el desarrollo de una tesis. Los días de frustración, agotamiento mental en los que no ves salida se suman a los días buenos, a las risas, y a la adrenalina de conseguir algo que llevas tiempo intentado. Por ello quiero agradecer a todas y cada una de esas personas más importantes que han sabido soportarme y no matarme.

*En primer lugar, debo agradecer a mis directores de Tesis, **Javier e Isabel**, quienes, sin conocerme, me ofrecieron la oportunidad de trabajar en este grupo en el que he aprendido y conocido gente increíble. No sólo me ayudaron a obtener la beca, sino que han sabido ser pacientes y mostrarme el camino cuando no sabía por dónde seguir. Gracias por vuestro acogimiento, dirección y por saber estar incluso cuando la salud no os lo ha permitido.*

*También quisiera agradecer a **Alberto Anel**, jefe del grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre, junto a Javier e Isabel, por su ayuda y consejos en los “Lab Meetings”, y su interés fuera de ellos. Así como a **Eva Latorre** sus preguntas, anécdotas, ánimos y esas horas de prácticas compartidas donde las risas han sido la clave para aguantar las horas interminables. Tampoco quiero olvidarme de una parte fundamental que hace que la investigación sea posible y son esas técnicas de laboratorio, **Pili, Manoli y Fina**, gracias por tener todo perfecto, por vuestra amabilidad y por vuestra ayuda tanto en las prácticas como en el día a día, sin vosotras haríamos la mitad del trabajo que se realiza. Y la piedra fundamental sobre la que este departamento se asienta, **Marta Fajés**, nuestra secretaria que nos ayuda en todos los papeleos que hay que hacer y tiene una paciencia interminable, gracias por todo.*

Nunca se me ha dado muy bien hablar, soy una persona que aprecia más los pequeños detalles, pero hoy haremos una excepción. No me cansaré de repetir, como en aquella cena de acción de gracias, que he tenido una enorme suerte de haber terminado en este grupo, porque he conocido a grandes personas que no solo han sido compañeros de trabajo, sino amigos. Gracias a todos y cada uno de vosotros por aceptarme y dejarme ser como soy, por las risas, por las cenas, por acogerme como lo hicisteis, y por aguantar los momentos de incertidumbre o mal estar.

***Joaquín**, eres mi aliado en cuanto a música en la sala de cultivos, cocinero experimentado siempre dispuesto a traer nuevas recetas. En algún momento tendrás que hacer premios para los del laboratorio. Tienes las ideas claras y eres un buen punto de referencia cuando se necesita un consejo. **Ana**, mi pelirroja favorita, aunque ya no estés con ese pelo, siempre con una sonrisa y con ganas de hablar o escuchar. Gracias por esas cervezas de desconexión, por las risas, los bailes, por esas notas de ánimo, por amenizar los almuerzos con tus historias. Por ser la primera tía oficial del grupo y abirme el camino para poder avasallaros a fotos de mi sobrino. Eres una mujer con una integridad y valores admirables, y con una fortaleza que no pierdes,*

aunque tengas un mal momento. **Chantal**, mi americana preferida, tu saber estar es envidiable, mejor anfitriona de fiestas siempre con mucho estilo (tus zapatitos de tacón se echarán de menos por el pasillo esté donde esté). Gracias por tu ayuda, por ser nuestra reviewer en todos los artículos y congresos, y sobre todo por ser una amiga y persona increíble, que a pesar de tener luz propia para eclipsar a todo el mundo sabe ser humilde. **Andrea**, la bondad hecha persona, aunque con el carácter de una leona. ¡No pierdas ese carácter jamás! porque da gusto trabajar contigo. Tu tesón, constancia y predisposición a ayudar van a conseguir que llegues lejos en todo lo que te propongamos. Gracias por tener las palabras exactas en los días malos, por sacarme más de una sonrisa cuando lo necesitaba, por saber escuchar y por ser un pilar muy importante dentro de este grupo, porque sin ti todo hubiese sido más caótico de lo que ya ha sido. Eres una guerrera, y tienes una paciencia que ojalá la tuviera yo, no te rindas, pero aprende a parar y descansar por tu salud. **Manu**, entramos a la vez, tú con el TFG y yo en esta aventura caótica, y has sido una de las personas que más me ha ayudado a sacar adelante este trabajo. Gracias por estar ahí, por tus calcetines graciosos que siempre sacan una sonrisa, por tu ayuda prestada los días que no daba abasto, por tu paciencia y por estar siempre informado de todas las becas, por ser el que nos introducía la música que estaba de moda en ese momento y por tus memes. Ha sido un gran compañero y un apoyo para aguantar al señor.... **David** de no haber sido por tu compañía en estos últimos ensayos de ratones creo que me habría vuelto loca definitivamente. Gracias por amenizar las horas muertas del IVIS sabiendo los días que no podía hablar, y por mostrarme una faceta tuya desconocida, pena no haberla sabido antes jajaja. Tienes una cabeza increíble con bastante conocimiento de absolutamente todo. Coincidir contigo, placer ha sido (como buen friki sabrás quien es :P). **Ruth**, la persona con más energía por las mañanas que he podido llegar a conocer, gracias por tus debates y preguntas para hablar de ciencia, por tu espíritu y por ser tan afable con todo el mundo. **Raquel** y **Patricia**, os fuisteis pronto al lado de lípidos, pero gracias por vuestra ayuda cuando la he necesitado. Y, por último, dentro de este equipo **Alfonso**, gracias por la ayuda proporcionada en ocasiones.

No puedo olvidarme de la parte de mitocondrias. **Paula**, con quien coincidí durante la carrera en Lleida, pero que llegué a conocer de verdad en esta aventura. La chica dura del grupo, amable, con una sonrisa enorme y siempre dispuesta a escuchar y salir. Espero que te vaya muy bien en Barcelona. Y **Javi**, hemos coincidido poco, pero siempre has estado ahí para escuchar y contarnos alguna cosa interesante.

A todos y cada uno de vosotros, seguid creciendo y siendo como sois porque vais a llegar lejos.

¿Pensabas que me olvidaba de ti? Se suele decir que lo bueno se hace esperar...Mi lectora beta, mi hermana pequeña postiza, la que menos ha coincidido conmigo dentro de las cuatro paredes del laboratorio, pero quien ha conseguido ser una base importante para sobrevivir. **Alba**, todo lo que pueda decirte se queda corto, gracias por desmontar mi pila de post-it para cambiar el color de las notas sorpresa, por saber contrarrestar mi negativismo, aunque no haya manera de sacarme de él, ni lo conseguirás ¡JAMÁS! Eres una persona con un corazón enorme, más fuerte de lo que se cree, que no sabe dibujar caritas con guiños ni abrazos, pero a la que quiero muchísimo. Gracias por aparecer y quedarte.

Obviamente no solo puedo agradecer a las personas que me han ayudado dentro de este mundo caótico que es la ciencia, sino también, a quienes siempre han estado ahí.

*Esas 8 personitas que han estado en los fracasos y en los éxitos, en las situaciones vergonzosas, en las noches locas, y que son capaces de, aunque esté ausente durante un largo periodo, parezca que el tiempo no ha pasado: **Cristina, Clara, Eva, Flavia** (Mil gracias por la portada, y por ser una de las mejores compañeras de piso que he tenido), **Janire, María, Tamara y Sheila**, gracias. Espero que la vida nos permita seguir compartiendo los éxitos y los fracasos. Somos como un matrimonio multitudinario, en lo bueno y en lo malo, siempre. Tenemos pendiente una gran celebración.*

*Por otro lado, dos personas con las que me embarqué hace 10 años en la loca idea de meternos en ciencia, **María y Belén**, lo conseguí, ¡SOBREVIVÍ! Un poco menos cuerda de lo que estaba, pero ¡terminé! Jajaja, aún me debéis un descapotable rojo y una escapada al pirineo o a la playa.*

*A mis compañeros de piso de este último año, **Laura** (la vida nos volvió a juntar bajo el mismo techo jaja) y **Carlos**, habéis sido quienes más me habéis soportado estos días, con mis miedos, inseguridades, y sobre todo haciendo que cierre el ordenador cuando entraba en bucle y corría peligro su integridad. ¡Sois muy grandes ambos! MIL GRACIAS por no haberme echado a la calle y haberme cuidado con el cariño que lo habéis hecho.*

*¡Ah! no puedo olvidarme de esas personitas que no hace mucho que conozco, pero han conseguido que durante breves momentos pueda evadirme, **Edu y Judit**, sois una pareja admirable con un corazón enorme que se os escapa a ambos del pecho, me alegro que la vida os haya puesto en mi camino porque habéis sido como mis hermanos en esta ciudad. Y **Jenny**, gracias por soportar mis chapadas, ejercer de psicóloga y hacer conmigo la cuenta atrás de los ratones que me quedaban, por ser un encanto de niña con mucho que ofrecer a los demás, tienes un gran corazón. Tenemos que celebrar que esto ha llegado a su fin. A los tres nos quedan muchos momentos que pasar juntos.*

Por otro lado, a ti, sabes quién eres soldadito. Fuiste el último en llegar, pero quien me permitió escapar a un trocito de paz de vez en cuando. Gracias por prestarme un trocito de tu isla y aguantar más de un ataque, bajón y malos momentos. ¡GRACIAS por no huir!

*Y finalmente, **a mi familia**. En especial a mis padres **Carmen y Antonio**, y a mi hermana y cuñado, **Virginia y Pably**. Gracias por estar en cada golpe para levantarme, por apoyarme sin importar en que lío me meta, aunque sepáis que es una locura; por dejarme aprender sin límites, por quererme como me queréis. Sin vuestro apoyo, cariño y sacrificio no habría conseguido llegar hasta aquí. Os quiero. Y a **Leo**, la última incorporación y quien ha robado mi corazón.*

Y tú, sí tú, el que está leyendo, gracias por leer este tostón que me ha costado lágrimas, sudores, y muchas cervezas de desconexión. Gracias por perder un pedacito de tu tiempo.

“Qué maravilloso es que nadie tenga que esperar ni un momento antes de empezar a mejorar el mundo”.

(Ana Frank)

“Un científico en su laboratorio no es un simple técnico: también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas”.

(Marie Curie)

ABREVIATURAS.

7-AAD: 7-aminoactinomicina D.

A20: “TNF- α -induced protein 3 (TNFAIP3)” o Proteína 3 inducida por TNF- α (TNFAIP3).

AAA: Familia de ATPasas asociadas a diversas actividades celulares.

ABB: “*Annexin Buffer Binding*” o Buffer de unión a Anexina V.

ACS: “*American Cancer Society*” o Sociedad Americana contra el Cáncer.

ACD: “*Accidental Cell Death*” o Muerte celular accidental

ACSL4: miembro 4 de la familia de la acil-CoA sintetasa.

ADP: Adenosín Difosfato.

AIF: Factor de Inducción Apoptosis.

AIFM1: Factor 1 Inductor de Apoptosis Mitocondrial.

ALOX: Araquidonato lipoxigenasa.

AMBRA 1: “*Autophagy And Beclin 1 Regulator 1*” o regulador 1 de autofagia y Beclina1.

AMC: 7-Amino-4-metilcumarina.

AML: Leucemia mieloide aguda.

ANT: “*Adenine Nucleotide Translocase*” o Translocasa de nucleótidos de adenina.

AP-1: “*Activator Protein 1*” o Proteína activadora 1.

APAF-1: del inglés “Apoptosis protease-activating factor-1”.

APC: Aloficocianina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ASCT: “*Autologous Stem Cell Transplantation*” o Trasplante autólogo de células madre.

ATG: “*Autophagy- related*” o genes relacionados con la autofagia.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BCA: “*Bicinchoninic Acid*” o Ácido bicinconínico.

BCL-2: “*B-cell lymphoma-2*”.

BECN1: Beclina 1.

BFL1/ A1: “*The Bcl-2-related protein A1*” o Proteína A1 relacionada con Bcl-2.

BH: Dominio de homología a BCL-2.

BID: “*BH3 Interacting Domain Death Agonist*” o Agonista de la muerte del dominio interactivo BH3

BIR: “*Baculoviral Inhibitory Repeat*” o Dominio de repetición de inhibición para el *Baculovirus*.

BMSC: “*Bone Marrow stromal cells*” o Células estromales de la médula ósea.

BSA: “*Bovine Serum Albumin*” o Albúmina de suero bovino.

CAD: DNAsa activada por caspasa.

CARD: “*Caspase Activation Recruitment Domain*” o Dominio de reclutamiento y activación caspasas.

CCDN1: Ciclina 1.

CCDN3: Ciclina 3.

CDKs: Ciclinas.

c-FLIP: “*FLICE-like Inhibitory Protein*”.

cGAS-STING: “*Cyclic GMP–AMP Synthase–Stimulator of Interferon Genes*” o GMP cíclico-AMP sintasa-estimulador de genes de interferón.

CHOP: “*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*” o Proteína homóloga de la proteína de unión al potenciador de CCAAT.

cIAP: “*Cellular Inhibitor of Apoptosis*” o Inhibidor celular de apoptosis.

CLQ: Cloroquina.

CrmA: modificador de la respuesta de citoquinas A.

CRISPR/Cas9: “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated protein-9*” o Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas: proteína asociada a CRISPR-9.

CRT: Calreticulina.

CYLD: del inglés “*Lys63-deubiquitylating enzyme Cyldromatosis*”.

CypD: Ciclofilina D.

DAI: “*DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors*” o Activador dependiente de DNA de factores reguladores de IFN.

DAMPs: “*Damage-associated molecular patterns*” o Patrones moleculares asociados a daño.

DAPK1: quinasa 1 asociada a muerte.

DED: “*Death Effector Domain*” o Dominio efector de muerte.

DISC: “*Death-Inducing Signaling Complex*” o Complejo de señalización inductor de muerte.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

ECH: Epoxiciclohexenona.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ERK1: quinasa 1 regulada extracelular.

FAAD: “*Fas-associated death domain protein*” o proteína de dominio de muerte asociada a Fas.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FLC: “*Free light chain*” o cadena ligera libre.

GABARAP: “*GABA Type A Receptor-Associated Protein*” o Proteína asociada al receptor ácido gamma-aminobutírico.

GLUL: Glutamato-amonio ligasa.

GLUD1: Glutamato deshidrogenasa 1.

GSK-3: Quinasa glucógeno sintasa-3.

HECT: “*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*” o Homólogo al E6-AP Carboxilo Terminal.

HIF-1: “*Hypoxia Inducible Factor*” o Factor inducible por hipoxia 1.

HMGB1: “*High Mobility Group Box 1*” o proteína del grupo de alta movilidad de caja 1 de unión a cromatina y no a histona.

IAP: “*Inhibitor of Apoptosis Protein*” o proteínas inhibidoras de apoptosis.

iCAD: inhibidor de la DNAsa activada por caspasa.

ICE: Enzima convertidora de interleucina 1 β .

iHDACs: “*Histone Deacetylase Inhibitors*” o Inhibidores de histona deacetilasa.

IGF1R: Factor de crecimiento 1 similar a la insulina.

Ig: Inmunoglobulina.

IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas.

IL-1: Interleucina 1.

IL-1 β : Interleucina 1 β eta.

IL-6: Interleucina 6.

IMiDs: Inmunomoduladores.

IMS: “*Intermembrane Space*” o espacio intermembrana.

IP: Inhibidor de proteasoma.

ISEN: Inhibidores selectivos de exportación nuclear.

JNK: “Jun N-Terminal Kinase” o quinasa de c-Jun N-terminal.

KEAP1: Proteína 1 Asociada a ECH similar a Kelch.

LB: Luria Bertani.

LC3: “Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3”.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LMP: Permeabilización membrana lisosómica.

LPCAT3: Lisofosfatidilcolina Aciltransferasa.

LUBAC: “*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*” o Complejo de ensamblaje de cadena de ubiquitina lineal.

mAbs: “*Monoclonal antibodies*” o Anticuerpos monoclonales.

MAP1LC3: “*Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*” o proteína 1 de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos.

MGUS: “*Monoclonal gammopathy of undetermined significance*” o Gammopatía monoclonal de significado incierto.

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad II.

ML-IAP: “*Melanoma IAP*” o Inhibidor de apoptosis del melanoma.

MLKL: “*Mixed-Lineage Kinase domain-Like protein*”.

MM: Mieloma Múltiple.

MOMP: “*Mitochondrial outer membrane permeabilization*” o Permeabilización membrana externa mitocondrial.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico

NAIP: “*NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein*” o Proteína inhibidora de la apoptosis de la familia NLR.

NBR1: “*NBR1 Autophagy Cargo Receptor*” o Receptor de carga de autofagia NBR1.

NCCD: “*Nomenclature Committee on Cell Death*” o Comité de nomenclatura de muerte celular.

NEMO: “*NF-kappa-B essential modulator*” Modulador esencial NF-kappa-B.

NET: Trampa extracelular de Neutrófilos.

NF-κB: Factor nuclear kappa-B o factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NHEJ: “*Non-Homologous End Joint*”.

NK: Célula *Natural- Killer*.

NLR: Receptores tipo NOD.

NOD: Proteína que contiene el dominio de oligomerización de nucleótidos.

NSA: Necrosulfonamida.

PAR: poli-ADP-ribosa.

PARP1: polimerasa 1 poli-ADP-ribosa.

PAM: “*Protospacer Adjacent Motif*”.

PAMPs: “*Pathogen-associated molecular patterns*” o Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: “*Phosphate Buffered Saline*” o Tampón de fosfato salino.

PC: “*Plasmatic cells*” o Células plasmáticas.

PCD: “*Programmed cell death*” o Muerte celular programada.

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*” o Reacción en cadena de la polimerasa.

PE: Fosfatidiletanolamina.

PEI: Polieterimida.

PEST: Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T).

PFS: “*Progression-free survival*” o Supervivencia libre de progresión.

PINK1: “*PTEN-induced kinase 1*” o Quinasa 1 inducida por PTEN.

PKA: Quinasa A.

PP2A: proteína fosfatasa 2A.

PRR: “*Pattern recognition receptor*” o Receptor de reconocimiento de patrones.

PS: Fosfatidilserina.

PYGL: “*Glycogen Phosphorylase*” o Glucógeno fosforilasa.

PUMA: “*p53 upregulated modulator of apoptosis*” o p53 modulador de apoptosis regulado al alza.

RE: “*Reticulum endoplasmic*” o retículo endoplasmático.

RING: “*Really Interesting New Gene*” o Nuevo gen realmente interesante.

RIPK1: “Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1” o Proteína serin-treonin quinasa 1.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RHO: Factor rho.

RIPK1: “*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*” o Receptor que interactúa con serina/treonina quinasa 1.

ROCK1: Proteína serina / treonina quinasa también conocida como proteína quinasa 1 que contiene bobinas en espiral asociadas a rho.

ROS: radicales libres de oxígeno.

SAD: “*Succinate semialdehyde dehydrogenase NADP⁺*” o Succinato semialdehído deshidrogenasa NADP⁺.

SCLC: “*Small Cells Lung Cancer*” o Cáncer de pulmón de células pequeñas.

SD: Desviación estándar.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SEM: Error estándar de la media.

SFB: Suero fetal bovino.

Smac/ DIABLO: Segundo activador derivado de mitocondrias de caspasas.

SMM: “*Smoldering Multiple Myeloma*” o Mieloma Múltiple Latente.

SQTM1: “*Sequestosome-1*”.

TAB: “*TAK1- Binding protein*” o Proteína de unión a TAK1.

TAFs: Factores asociados al receptor TNF.

TAK1: “*Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1*”.

tBID: BID truncado.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

TIMM8a/DDP: Translocasa de la membrana mitocondrial interna 8a.

TLR: Receptor tipo Toll.

TLS: Síndrome de Lisis Tumoral.

TM: Transmembrana.

TMRE: “*Tetramethylrhodamine, Ethyl ester, Perchlorate*” o Tetrametilrodamina, éster etílico, perclorato.

TNFR: “*Tumor Necrosis Factor Receptor*” o Receptor del factor de necrosis tumoral.

TNF α : “*Tumor Necrosis Factor Alpha*” o Factor de necrosis tumoral alfa.

TRADD: “*TNFR-Associated Death Domain*” o Dominio de muerte asociado a TNFR.

TRAF: “*TNFR-Associated Factor*” o Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral.

TRAIL: “*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*” o Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.

TRAIL-R: Receptor de TRAIL.

TRIF: “*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ” o Proteína adaptadora que contiene dominio TIR que induce interferón beta.

Ts-IAP: “*Testis-specific IAP*” o Inhibidor de apoptosis específico de testículos.

UBA: Dominio asociado a ubiquitina.

UPS: “*Ubiquitin-Proteasome System*”.

USP21: “*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 21*” o Ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa 21.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

WIPI: “*WD repeat domain phosphoinositide-interacting*”.

XIAP: “*X-linked Inhibitor of Apoptosis*” o Inhibidor ligado al cromosoma X de la proteína de apoptosis.

XKR8: Proteína 8 relacionada con XK.

XPO1: Exportina nuclear 1.

Z-DEVD-fmk: N-benziloxycarbonil-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluorometilcetona.

Z-IETD-fmk: N-benziloxycarbonil-Ile-Thr-Asp-fluorometilcetona.

Z-VAD-fmk: N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona.

Z-YVAD-fmk: N-benziloxycarbonil-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona A.

El mieloma múltiple constituye el 10% de las neoplasias hematológicas y se caracteriza por la proliferación descontrolada y acumulación en la médula ósea de células B plasmáticas. A pesar de todos los tratamientos aprobados recientemente contra esta enfermedad, el mieloma múltiple sigue siendo incurable.

El tratamiento con mejor resultado hasta la fecha es el uso de inhibidores de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma 26S. El primer inhibidor del proteasoma introducido en la clínica fue bortezomib, un inhibidor reversible de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, pero con efectos secundarios y resistencias. Para salvar las resistencias generadas por bortezomib se introdujo en la clínica el inhibidor irreversible del proteasoma, denominado carfilzomib. Ese último, al igual que bortezomib, también genera resistencias, por lo que se aprobó un tercer inhibidor de proteasoma, denominado ixazomib. Ixazomib es un inhibidor reversible de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, como bortezomib, pero con características muy similares a carfilzomib. Se ha descrito con anterioridad su capacidad de generar apoptosis en células de mieloma, pero se desconoce precisamente el mecanismo por el cuál actúa.

Paralelamente al uso en la clínica de los inhibidores de proteasoma, se están desarrollando pequeños compuestos similares a las proteínas BH3-*only* implicadas en la apoptosis. Se desconoce si su empleo junto a los inhibidores de proteasoma potencia la apoptosis y si dicha combinación sería capaz de contrarrestar las resistencias generadas por los inhibidores de proteasoma solos.

En este trabajo hemos analizado el mecanismo de apoptosis inducida por ixazomib en células de mieloma y el posible papel de la autofagia en el tratamiento con ixazomib. También la apoptosis inducida por la combinación de ixazomib y los miméticos BH3 tanto *in vitro* como *in vivo* en células de mieloma. Hemos descubierto que la apoptosis en las células de mieloma múltiple inducida por ixazomib se realiza no solo por la vía intrínseca sino también por la vía extrínseca, y su efecto tóxico se ve potenciado al combinar el IP con miméticos BH3 *in vitro*, mientras que en muestras *ex vivo* de pacientes con MM produce un efecto aditivo. Aunque todavía falta realizar más estudios sobre los resultados obtenidos, los datos sugieren que sería útil introducir estas combinaciones de fármacos en la clínica.



ÍNDICE

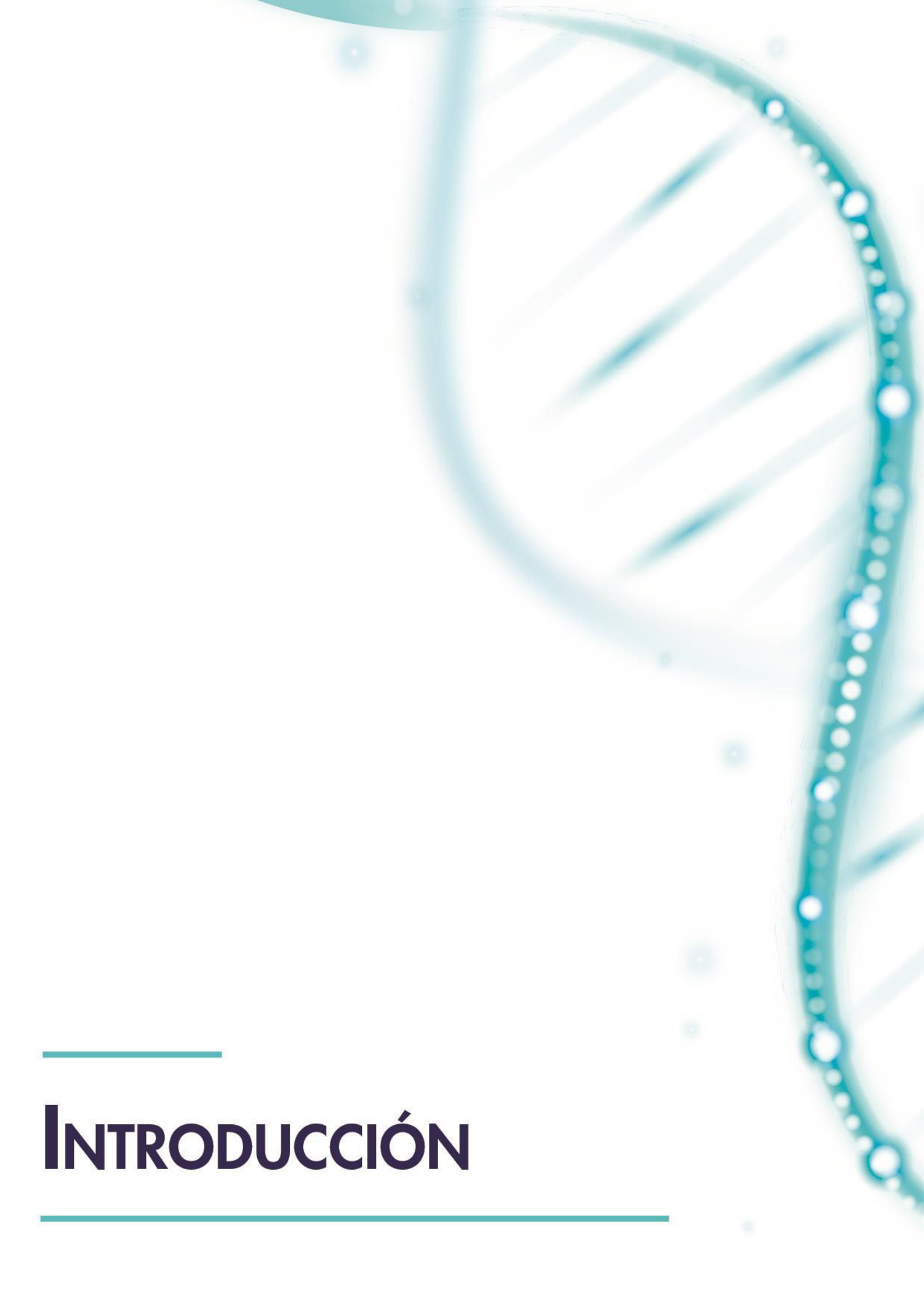
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MUERTE CELULAR.....	3
1.1.1 Apoptosis.....	7
1.1.2 Necrosis.....	9
1.2 APOPTOSIS: PRINCIPIOS Y APLICACIÓN.	13
1.2.1 Caspasas.	13
1.2.2 Proteínas Familia BCL-2.....	16
1.2.3 Vía intrínseca.....	25
1.2.4 Vía extrínseca.	27
1.2.5 Inhibidores de Apoptosis.....	28
1.2.6 Apoptosis y cáncer.	29
1.3 AUTOFAGIA: POSIBLE MECANISMO DE MUERTE CELULAR.	30
1.3.1 Mecanismos moleculares de regulación de la autofagia.	31
1.3.2 Autofagia y Cáncer.....	34
1.3.3 Relación Autofagia y Apoptosis.	35
1.4 MIELOMA MÚLTIPLE.....	37
1.4.1 Estadios del desarrollo del Mieloma Múltiple.	38
1.4.2 Síntomas del Mieloma Múltiple.....	40
1.4.3 Alteraciones Genéticas en Mieloma Múltiple.....	41
1.4.4 Microambiente médula ósea y Mieloma Múltiple.	43
1.4.5 Tratamiento de Mieloma Múltiple.	45
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	65
2.1 ANTECEDENTES.	67
2.1.1 Mieloma múltiple e inhibidores de proteasoma (IPs).	67
2.1.2 Enfermedades hematológicas y miméticos BH3.....	68
2.2 OBJETIVOS.....	70
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73

3.1 CULTIVOS CELULARES.....	75
3.1.1. Líneas celulares.....	75
3.1.2. Materiales y medios de cultivo celular.....	77
3.1.3. Mantenimiento cultivos celulares y detección micoplasmas.	79
3.1.4. Determinación de la viabilidad y densidad celular en los cultivos celulares.	79
3.1.5 Congelación y descongelación de cultivos celulares.	80
3.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN, CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS CELULAR.	80
3.2.1 Determinación de la proliferación celular.	80
3.2.2 Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V y 7-AAD.	81
3.2.3 Análisis del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo mediante marcaje con DiOC6(3).....	82
3.2.4 Análisis de la actividad del proteasoma.	83
3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.	83
3.3.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	83
3.3.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo.....	88
3.4. TÉCNICAS BIOLOGÍA MOLECULAR.....	90
3.4.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	90
3.4.2 Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.....	91
3.4.3 Expansión bacteriana de vectores clonales y posterior purificación.....	92
3.4.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	92
3.4.5 Purificación bandas de DNA de gel de agarosa.	93
3.4.6 Digestión plásmidos.	93
3.4.7 Ligación de DNA.	93
3.4.8 Secuenciación DNA.	94
3.5. OBTENCIÓN LÍNEAS ESTABLES DE MM DEFICIENTES EN BIM.....	94

3.5.1 Técnica CRISPR/Cas9:	94
3.5.2 Síntesis plásmido plentiCRISPR.v2 modificado para escindir BIM.....	95
3.5.3 Generación lentivirus: transfección células HEK293T.....	96
3.5.4 Infección de células eucariotas con lentivirus.....	97
3.5.5 Obtención de líneas estables mediante clonaje por dilución límite.	98
3.6. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE CÉLULAS OBTENIDAS A PARTIR DE MUESTRAS <i>EX VIVO</i> DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON MM.....	98
3.6.1 Aislamiento células plasmáticas.	98
3.6.2 Análisis mediante citometría de flujo de la sensibilidad de células plasmáticas a fármacos.	99
3.7. MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE MIELOMA MÚLTIPLE.....	100
3.7.1 Combinación miméticos BH3 con el inhibidor de proteasoma ixazomib....	100
3.7.2 Experimentos de inmunogenicidad.	101
3.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LOS DATOS.	105
3.8.1 Análisis de los datos de citometría de flujo.....	105
3.8.2 Análisis estadístico de los datos.	105
3.8.3 Análisis del efecto combinatorio de drogas.	106
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	107
4.1 ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DEL PROTEASOMA IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE.....	109
4.1.1 Ixazomib induce inhibición de la proliferación en líneas celulares de mieloma múltiple.....	109
4.1.2 Ixazomib a bajas dosis aumenta la actividad del proteasoma.	111
4.1.3 Ixazomib induce la traslocación de fosfatidilserina.	113
4.1.4 Ixazomib como posible tratamiento alternativo a células resistentes a bortezomib.....	115
4.1.5 Ixazomib induce apoptosis dependiente de caspasas.	116

4.1.6. Efecto del tratamiento con ixazomib sobre las proteínas de la familia BCL-2 en líneas de mieloma múltiple.....	121
4.1.7. Efecto de ixazomib en líneas deficientes en proteínas pro-apoptóticas o con sobreexpresión de anti-apoptóticas.	130
4.1.8. Muerte independiente de BAX/BAK inducida por ixazomib en líneas de mieloma múltiple.....	142
4.2 AUTOFAGIA OCASIONADA POR IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE.....	144
4.2.1. Efecto de ixazomib en combinación con diferentes inhibidores de autofagia en líneas celulares establecidas de mieloma múltiple.	145
4.2.2. Papel de Atg5 en la sinergia entre cloroquina e ixazomib en líneas de mieloma múltiple.....	149
4.2.3. Estado flujo autofágico en células de MM deficientes en ATG5 tratadas con cloroquina.....	151
4.2.4. Efecto de la cloroquina combinado con ixazomib en líneas resistentes a bortezomib.....	153
4.3 COMBINACIÓN DE MIMÉTICOS BH3 E IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA.	154
4.3.1. Estudio de la sinergia de las combinaciones de miméticos BH3 con ixazomib en líneas de mieloma múltiple establecidas.	155
4.3.2. Efecto de las combinaciones entre miméticos BH3 e ixazomib sobre los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL-2.	163
4.3.3. Combinaciones de dos miméticos BH3 e ixazomib.....	166
4.3.4. Combinación de miméticos BH3 con el fármaco ixazomib en líneas de mieloma múltiple deficientes en BIM.....	178
4.3.5. Expresión de ecto-calreticulina en combinación de miméticos BH3 con el fármaco ixazomib en líneas de mieloma múltiple.....	184
4.3.6. Inducción de inmunogenicidad por la combinación de cloroquina e ixazomib en células BAX/BAK KO.	187

4.4 EFECTO EN MUESTRAS EX VIVO DE LA COMBINACIÓN DE MIMÉTICOS BH3 E IXAZOMIB.	189
4.5 FUTURA EXTRAPOLACIÓN DE LA BÁSICA A LA CLÍNICA. PRUEBAS PREVIAS Y MODELOS ORTOTÓPICO.	212
4.5.1. Efecto de ixazomib y miméticos BH3 en líneas celulares establecidas de mieloma múltiple de ratón.....	212
4.5.2. Combinación de miméticos BH3 con el inhibidor de proteasoma ixazomib como tratamiento en modelo ortotópico de mieloma.....	215
4.5.3. Vacunación con células de ratón pretratadas con inhibidores de proteasoma en modelo ortotópico.....	217
5. DISCUSIÓN GENERAL.	221
6. CONCLUSIONES.....	233
7. BIBLIOGRAFÍA.....	237



INTRODUCCIÓN

1.1 MUERTE CELULAR.

La muerte celular es un proceso fisiológico primordial en el ciclo vital de todas las células eucariotas. Más concretamente, es necesaria para mantener un adecuado equilibrio celular entre proliferación y muerte en organismos pluricelulares y evitar el desencadenamiento de enfermedades. Esta muerte celular puede ser ocasionada de manera accidental (ACD, del inglés “*Accidental Cell Death*”) o estar programada (PCD del inglés “*Programmed Cell Death*”). Sea cual sea la causa, tanto el inicio como la ejecución y las fases finales, están guiados por procesos bioquímicos complejos (Galluzzi et al., 2018). La ACD se produce como consecuencia de daños severos, hipoxia, agentes altamente tóxicos y lisis celular mediada por complemento, y se observa una hinchazón descontrolada de las células (Galluzzi et al., 2018). En la PCD la muerte se produce como consecuencia de un estímulo específico y con el fin de mantener la homeostasis tisular de un organismo (Fuchs & Steller, 2011).

Años atrás, se establecieron pautas generales para determinar el estado vital en una célula. Según la definición del NCCD (*Nomenclature Committe on Cell Death*) una célula se considera muerta cuando presenta uno o varios de los siguientes criterios moleculares o morfológicos (Kroemer et al., 2009):

- Pérdida de la integridad de la membrana plasmática.
- Fragmentación total de la célula, incluyendo el núcleo, mostrando los llamados cuerpos apoptóticos.
- Absorción de los cuerpos apoptóticos celulares por las células adyacentes *in vivo*.

El concepto de muerte celular engloba distintos tipos de muerte clasificados en función de las características morfológicas, criterios enzimológicos, características inmunológicas o aspectos funcionales (**Tabla 1.1**). Los principales mecanismos de muerte celular son: apoptosis, autofagia y necrosis. Respecto a la autofagia existe cierta controversia sobre si enmarcarla dentro de muerte celular o no. Generalmente se considera como un mecanismo de protección o supervivencia; sin embargo, también ha sido reconocido como una vía de muerte celular (Bedoui et al., 2020; Galluzzi et al., 2018; Jung et al., 2020; Mizushima & Komatsu, 2011; Noguchi et al., 2020).

Tabla 1.1. Clasificación funcional de tipos de muerte celular. Adaptado de Galluzzi *et al.* 2012; Galluzzi *et al.* 2018.

Muerte celular	Características Bioquímicas y Morfológicas.	Inhibidores	Funcionalidad celular
Anoikis	Producida por la pérdida de adhesión celular a la matriz. Disminución de EGFR. Inhibición de ERK1 Ausencia de integrina B1. Sobreexpresión de BIM. Activación de caspasas- 3, 6 y 7.	Z-VAD-fmk Sobreexpresión BCL-2	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Apoptosis Extrínseca por receptores de dependencia	Señalización por receptores de dependencia. Activación de PP2A y DAPK1. Activación de caspasas-3, 6, 7 y 9.	Inhibición de caspasas-3 y 9 y PP2A. Z-VAD-fmk.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Apoptosis Extrínseca por receptores mortales	Señalización por receptores mortales. Activación caspasas-3, 6, 7, 8 y 10. Procesamiento de BID. Generación MOMP	Expresión CrmA. Inhibición de caspasas-3 y 8. Z-VAD-fmk.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Apoptosis Intrínseca dependiente de caspasas	Generación MOMP. Caída irreversible del potencial mitocondrial. Activación de caspasas.	Z-VAD-fmk Sobreexpresión BCL-2	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Apoptosis Intrínseca independiente de caspasas	Liberación de proteínas IMS. Inhibición cadena respiratoria.	Sobreexpresión BCL-2	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Autofagia	Formación autofagosoma. Lipidación MAP1LC3. Degradación SQSTM1. Inhibición mTOR.	Inhibidores VPS34 Silenciamiento génico de AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 o BECN1.	Mecanismo de respuesta a estrés celular

Abreviaturas: AMBRA 1 (del inglés “*Autophagy And Beclin 1 Regulator 1*”, regulador 1 de autofagia y Beclina 1); BECN1 (Beclina 1); CrmA (modificador de la respuesta de citoquinas A); DAPK1 (quinasa 1 asociada a muerte); EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); ERK1 (quinasa 1 regulada extracelular); IMS (espacio intermembrana); MAP1LC3 (del inglés Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3, proteína 1 de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos); MOMP (permeabilidad membrana externa mitocondrial); PP2A (proteína fosfatasa 2A); SQTM1 (del inglés, *Sequestosome-1*); Z-VAD-fmk (N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona).

Tabla 1.1. Clasificación funcional de tipos de muerte celular. Adaptado de *Galluzzi et al. 2012; Galluzzi et al. 2018*.

Muerte celular	Características Bioquímicas y Morfológicas.	Inhibidores	Funcionalidad celular
Catástrofe mitótica	Durante o después de mitosis fallida. Existencia de poliploidía. Células con varios núcleos. Activación de caspasa-2. Activación de TP53 o TP73. Arresto mitótico.	Silenciamiento génico de TP53. Inhibición farmacológica o génica de caspasa 2.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Cornificación	Se produce en la epidermis. Formación de corneocitos (queratinocitos muertos mezclados con proteínas y lípidos importantes para la funcionalidad de la epidermis) Activación transglutaminasas. Activación caspasa-14	Inhibición génica de TG1, TG3 o TG5 y caspasa 14	Mecanismo de regulación funcional
Excitotoxicidad	Se produce en células neuronales. Apertura del canal de calcio por el glutamato. Aumento citosólico del calcio citosólico.		Mecanismo de regulación funcional
Entosis	Pacientes con enfermedad de Huntington. Descrita en linfoblastos. Fagocitosis de células vecinas y destrucción en el fagosoma. Activación RHO y ROCK-1 (Zeng et al., 2020).	Inhibidores lisosomales. Silenciamiento génico de Metalotioneína.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Ferroptosis	Mitocondrias pequeñas con cresta pequeña y membranas dañadas. Toxicidad lipídica mediada por ACSL4, LPCAT3 y ALOX (Chen et al., 2020). Generación radicales ROS.	Disminución glutatión. Inhibidores de peroxidasas.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Metuosis	Acumulación de grandes vacuolas llenas de líquido y marcadas con LAMP1 y Rab7 originadas a partir de macropinosomas (Maltese & Overmeyer, 2014). Hiperactivación de RAS. Semejante a necrosis.		Mecanismo de respuesta a estrés celular

Abreviaturas: ACSL4 (miembro 4 de la familia de la acil-CoA sintetasa), ALOX (araquidonato lipoxigenasa), LPCAT3 (Lisofosfatidilcolina Aciltransferasa), RHO (factor rho); ROCK1 (Proteína serina / treonina quinasa también conocida como proteína quinasa 1 que contiene bobinas en espiral asociadas a rho); ROS (radicales libres de oxígeno).

Tabla 1.1. Clasificación funcional de tipos de muerte celular. Adaptado de Galluzzi et al. 2012; Galluzzi et al. 2018.

Muerte celular	Características Bioquímicas y Morfológicas.	Inhibidores	Funcionalidad celular
Mitoptosis o suicidio mitocondrial	Interrupción de la producción de ATP. Formación cuerpos mitoptóticos (mitocondrias degradadas) (Yan, Elbadawi, & Efferth, 2020). Liberación del complejo TIMM8a/DDP. Reclutamiento de DRP1 y fisión mitocondrial. Induce apoptosis o autofagia.		Mecanismo de respuesta a estrés celular
Muerte celular dependiente de Lisosomas (LCD)	Translocación de hierro. Existencia de LMP. Liberación de catepsinas e hidrolasas. Activación proteolítica de BID (Boya & Kroemer, 2008). Amplifica o inicia apoptosis, autofagia y ferroptosis (F. Wang et al., 2018).	Inhibidores de catepsinas. Inhibidores de proteasas. Antioxidantes. Cloroquina. Bafilomicina.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Muerte celular Inmunogénica (ICD)	Activación respuesta inmune adaptativa. Liberación de ATP, HMGB1, IFN1 y Anexina A1 (Galluzzi et al., 2018). Translocación de calreticulina a la superficie celular. Activación del inflamasoma.	Caspasas-3 y 8. Prostaglandina E2.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Necroptosis	Intermedio a la apoptosis y necrosis. Inducida por la quinasa RIP1 o RIP3. Señalización por receptores mortales. Inhibición de caspasas.	Necrostatina. Silenciamiento génico de RIP1/RIP3.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Necrosis	Desencadenamiento respuesta inmune innata. Inflamación. Inhibición de apoptosis. Activación de las quinasas RIP1, MAP quinasa y JNK. Generación radicales ROS. Depleción de ATP.	Necrostatina. Silenciamiento génico de RIP1.	Mecanismo de respuesta a estrés celular

Abreviaturas: HMGB1 (del inglés *High Mobility Group Box 1*, proteína del grupo de alta movilidad de caja 1 de unión a cromatina y no a histona); LMP (permeabilización membrana lisosómica); TIMM8a/DDP (translocasa de la membrana mitocondrial interna 8a).

Tabla 1.1. Clasificación funcional de tipos de muerte celular. Adaptado de Galluzzi *et al.* 2012; Galluzzi *et al.* 2018.

Muerte celular	Características Bioquímicas y Morfológicas.	Inhibidores	Funcionalidad celular
Netosis	Inhibición de caspasas. Activación de NAPDH oxidasa. Liberación de NET.	Inhibición de autofagia. Inhibidor de NAPDH oxidasa. Silenciamiento génico de PAD4.	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Oxeiptosis	Independiente de caspasas. Inducida por radicales ROS. Mediada por KEAP1, PGAM5 y AIFM1 (Chen <i>et al.</i> , 2020).		Mecanismo de respuesta a estrés celular
Paraptosis	Expresión del receptor I del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF1) Formación de burbujas celulares. Aumento de las mitocondrias.		Mecanismo de respuesta a estrés celular
Partanatos	Acumulación de PAR mediada por PARP1. Caída irreversible del potencial mitocondrial. Unión de PAR a AIF y translocación nuclear de AIF. Depleción de NADH.	Inhibición farmacológica o génica de AIF o PARP-1	Mecanismo de respuesta a estrés celular
Piroptosis	Propia de macrófagos infectados por patógenos. Activación de caspasas 1 y 7. Secreción de IL-1 e IL-18	Z-YVAD-fmk Silenciamiento génico caspasa 1.	Mecanismo de respuesta a estrés celular

Abreviaturas: AIF (Factor de Inducción Apoptosis); AIFM1 (Factor 1 Inductor de Apoptosis Mitocondrial); KEAP1 (Proteína 1 Asociada a ECH similar a Kelch); NET (Trampa Extracelular de Neutrófilos); PAR (poli-ADP-ribosa); PARP1 (polimerasa 1poli-ADP-ribosa); Z-YVAD-fmk (N-benziloxycarbonil-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona A)

1.1.1 Apoptosis.

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico por el que las células que han finalizado su función, no son necesarias para el organismo o se encuentran dañadas, se suicidan (Chi *et al.*, 2014). Este proceso está altamente conservado en todos los organismos eucariotas y presenta dos vías de señalización que conducen a la muerte celular (**Figura 1.1**) (Ellis *et al.*, 1991):

- La **vía extrínseca**: también conocida como ruta de receptores mortales, depende de un subgrupo de receptores de membrana del factor de necrosis tumoral (TNFR), que incluye a Fas (conocido también como Apo1/CD95), TNFR1 y TRAIL (Rathore et al., 2017). Esta vía se activa por la unión de ligandos extracelulares (FasL/CD95L, TNF α o TRAIL/Apo2L) (Singh et al., 2019).
- La **vía intrínseca**: también conocida como vía o ruta mitocondrial, depende principalmente de las mitocondrias y de las proteínas de la familia BCL-2 (Valentin et al., 2018). Esta vía se activa como respuesta a daños por estrés intracelular (Singh et al., 2019).

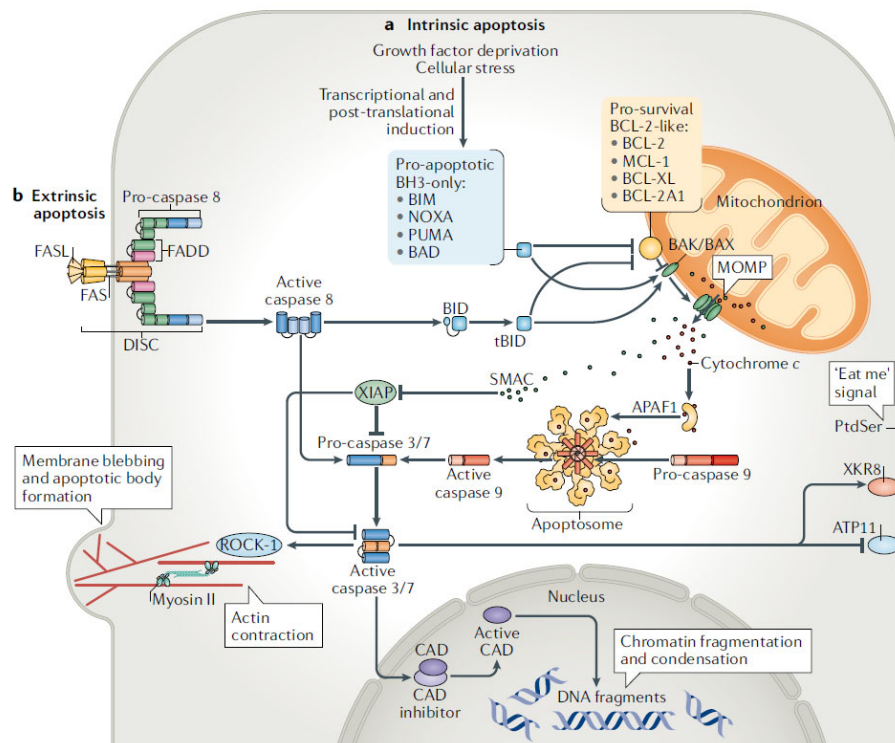


Figura 1.1. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. (A) La vía extrínseca se desencadena por la activación de receptores de muerte como Fas tras la unión de su ligando FASL, presente en las células adyacentes. Cuando se activa el receptor, se recluta a la procaspasa-8 a través de la proteína intermedia FAAD, formando el llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que cataliza la activación de la caspasa-8. Esta induce la muerte celular, bien porque activa a las caspasas-3 y 7 o por la activación proteolítica de BID a tBID, activando así la vía intrínseca. (B) La vía intrínseca se activa por diferentes señales de estrés, ausencia de señales de crecimiento o durante la homeostasis en el desarrollo embrionario. Esto provoca la inducción transcripcional o la activación post-traduccional de proteínas pro-apoptóticas BH3-only de la familia BCL-2 (BIM, PUMA, BAD o NOXA). Estas proteínas se unen a las proteínas anti-apoptóticas como BCL-2, BCL-X_L y MCL-1 liberando a los efectores BAX y BAK, los cuales forman complejo permeabilizando la membrana externa mitocondrial (MOMP) y provocando la liberación de factores como citocromo c y Smac. Algunas proteínas BH3-only también pueden activar a BAX y BAK mediante unión a ellas. La liberación del citocromo c contribuye junto a APAF-1 a la formación del apoptosoma, el cual activa a la caspasa-9 y ésta, a su vez, por escisión proteolítica activa a las caspasas-3 y 7 que inducen la muerte celular. La liberación de Smac inhibe a los inhibidores de caspasas como XIAP. En ambas vías, las caspasas activan de manera directa o indirectamente a la quinasa ROCK-1 que induce

la formación de vesículas o burbujas apoptóticas por la contracción de actina y la activación de CAD (DNAsa activada por caspasa) al escindirse del inhibidor iCAD. Esto provoca la escisión del DNA y la condensación de la cromatina. También las caspasas activan a XKR8 que causa la exposición de la fosfatidilserina (PtdSer o PS) al exterior de la membrana plasmática como señal de fagocitosis para las células vecinas. Imagen tomada de Bedoui *et al.* 2020.

Ambas vías activan la acción de las enzimas proteolíticas denominadas caspasas que median la fragmentación celular para permitir la fagocitosis por las células vecinas (Degterev et al., 2003).

En la **sección** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.se analiza más en profundidad este proceso de muerte celular.

1.1.1.1 Importancia de la evasión de la muerte celular en el organismo.

Un desequilibrio homeostático en el organismo a causa de una apoptosis excedente o insuficiente puede ocasionar daños y desencadenar diferentes enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson, enfermedades autoinmunes y principalmente cáncer (Degterev, Boyce, & Yuan, 2003; Perini et al., 2018; Singh et al., 2019).

La evasión de la apoptosis por parte de las células tumorales es muy variable, incluso dentro del mismo tipo de cáncer dando lugar a una expresión heterogénea (R. Singh et al., 2019). La vía más empleada para la evasión de la apoptosis por las células cancerosas depende de la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 y una alta translocación de dichas proteínas del citosol a la membrana externa de la mitocondria (Perini et al., 2018). En cánceres hematopoyéticos, como en el caso del mieloma múltiple, la evasión de la muerte celular apoptótica es importante ya que el sistema hematopoyético está altamente preparado para realizar apoptosis, por eso frecuentemente presentan alteraciones en la expresión de proteínas de la familia BCL-2 (Perini et al., 2018).

1.1.2 Necrosis.

La muerte celular necrótica o necrosis se define como una catástrofe bioenergética y una muerte celular desordenada (Lee et al., 2018). Se caracteriza principalmente por el aumento de volumen celular (oncosis) y de orgánulos, ruptura de la membrana plasmática, pérdida del contenido intracelular y liberación descontrolada de moléculas HMGB1 y LDH al espacio extracelular estimulando la respuesta inmunitaria o activando la reparación de heridas (Ying & Padanilam, 2016). A diferencia de la apoptosis y la

autofagia, la necrosis se considera la destrucción pasiva de componentes celulares (Lee et al., 2018).

La pérdida de integridad de la membrana plasmática se produce en ausencia de condensación nuclear, a diferencia de la inducción de apoptosis (Zong & Thompson, 2006). Esto permite mediante técnicas de marcaje fluorescente diferenciar entre dichos procesos de muerte.

Hasta hace poco se había considerado como un tipo de muerte accidental, pero gracias a diversos estudios, a día de hoy, se considera que puede estar regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos en determinadas líneas celulares o en presencia de inhibidores de caspasas, acuñando el término de “necroptosis” (Chen et al., 2019; Lee et al., 2018; Liu et al., 2019; Moquin et al., 2013; Pasparakis & Vandenabeele, 2015). También ciertos fármacos pueden provocar necroptosis (Zhu et al., 2019).

En presencia de inhibidores de caspasas, los receptores de muerte (Fas/CD95, TNFR1 y TRAIL-R) y los receptores de reconocimiento de patógenos o PRR (concretamente los receptores tipo Toll TLR3 y TLR4, y los receptores tipo NOD citosólicos NLR) provocan necroptosis dependiente de la quinasa RIPK1. Este mismo tipo de necroptosis es causado también por el reconocimiento de virus intracelulares (Kroemer et al., 2009; Ying & Padanilam, 2016). A nivel bioquímico se desconoce con claridad todos los fenómenos implicados, pero se sabe que se producen alteraciones mitocondriales (ROS, estrés nitroxidativo, permeabilización de la membrana mitocondrial controlada por ciclofilina D, etc.), cambios lisosomales (ROS por reacciones de Fenton y permeabilización de la membrana lisosomal), cambios nucleares (hiperactivación de PARP1 y fragmentación irregular cromosómica), degradación de lípidos y aumento de calcio citosólico provocando la activación de calpaínas y catepsinas (Kroemer et al., 2009; Lee et al., 2018).

1.1.2.1 Necroptosis: mecanismo de acción.

La necroptosis ocurre, generalmente, solo si las vías transcripcionales y/o apoptóticas pro-supervivencia están comprometidas (**Figura 1.2**) (Ying & Padanilam, 2016). De las vías comentadas en la sección anterior, la más caracterizada en necroptosis es la iniciada por TNF α unido a su receptor TNFR1. En condiciones habituales, TNFR1 forma trímeros en la membrana (Chen et al., 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

Al unirse $\text{TNF}\alpha$ sufre un cambio conformacional provocando su activación. Una vez activado, el receptor recluta, en la parte citosólica, varias proteínas TRADD (del inglés “***T**NFR-**A**ssociated **D**eath **D**omain*” o Dominio de muerte asociado a TNFR), RIPK1 (del inglés “***R**eceptor-**I**nteracting **P**rotein **K**inase **1***”), cIAP1 (del inglés “***c**ellular **I**nhibitor of **A**poptosis **1***” o Inhibidor celular 1 de apoptosis), cIAP2, TRAF2 (del inglés “***T**NFR-**A**ssociated **F**actor **2***” o factor 2 asociado a TNFR) y TRAF5 (Chen et al., 2019). Este complejo se conoce como complejo I. TRAF2 recluta los cIAPs, quienes además de inhibir la apoptosis al interactuar con caspasas poseen actividad E3-ubiquitin ligasa (Chen et al., 2019). Los cIAPs modifican a RIPK1 permitiendo la unión de TAK1 (del inglés “***T**ransforming growth factor- β -**A**ctivated **K**inase **1***”), TAB2 (del inglés “***T**AK1-**B**inding protein **2***”), TAB3 y LUBAC. Esta última, se une a las cadenas poliubiquitina añadidas en RIPK1 por cIAPs y crea más cadenas poliubiquitina en RIPK1 y NEMO para permitir el anclaje de más factores necesarios para activar a NF- κ B, y promover la expresión de genes de supervivencia celular (Chen et al., 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

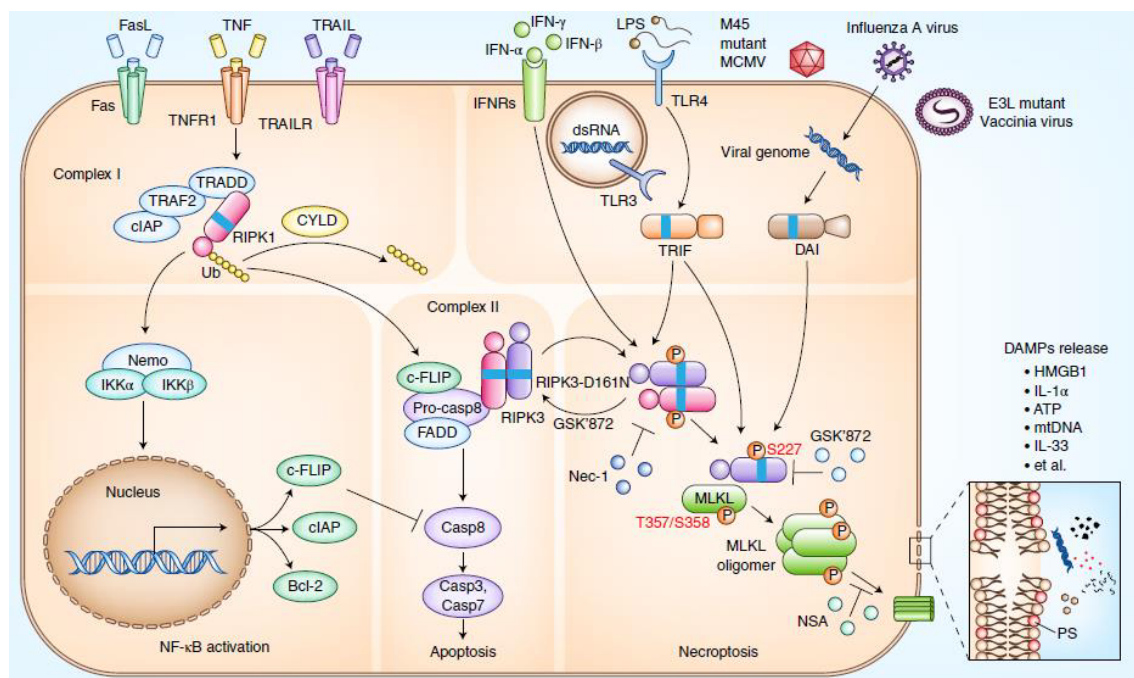


Figura 1.2. Vía de señalización de la necroptosis. La necroptosis puede inducirse mediante la activación de la familia de receptores TNFR y Toll (TLR3 y TLR4) e infección por patógenos. Todas estas señales inductoras convergen en la quinasa RIPK3 la cual se activa por interacción con RIPK1 u otras proteínas como TRIK y DAI. En el caso de TNFR1, la unión de TNF a este receptor conduce a la formación del complejo I junto a TRADD, TRAF2, cIAP y RIPK1. Este complejo promueve la activación de NF- κ B y por tanto la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias y genes de proteínas de supervivencia (c-FLIP, IAP y BCL-2). La desubiquitinación de RIPK1 por parte de Smac deriva en la formación de un complejo citosólico denominado complejo II. El complejo II está compuesto por FADD, procaspasa-8 y RIPK1 e induce apoptosis. Cuando la caspasa-8 está inhibida RIPK1 se une y activa a

RIPK3 quien recluta a MLKL. MLKL una vez activado se transloca a la membrana plasmática y provoca la muerte por necroptosis. En el caso de los receptores Toll se necesita de la molécula TRIF para la activación de RIPK3. Imagen tomada de He & Wang, 2018.

En cambio, cuando se forma el complejo II por desubiquitinación de RIPK1 por CYLD (*Lys63-deubiquitylating enzyme Cylindromatosis*), USP21, A20 o cezanne, se forma complejo con TRADD, FADD y RIPK3 (importante para la ejecución de la necroptosis junto a la caspasa-8). Este complejo se denomina **necrosoma** (de Almagro & Vucic, 2015). Si la caspasa-8 está activa, inhibe a RIPK1 y RIPK3 provocando la muerte por apoptosis. Sin embargo, en ausencia de caspasa-8, bien porque esté inhibida por CrmA, por fármacos o porque no es funcional, el complejo II lleva a cabo la necroptosis (Chen et al., 2019). La asociación de RIPK1 con RIPK3 produce la autoactivación de RIPK3 la cual provoca la fosforilación de MLKL (del inglés “*Mixed-Lineage Kinase domain-Like protein*”) y RPK1 aumentando su actividad. MLKL fosforilada produce la rotura de la membrana plasmática induciendo necroptosis y la liberación de DAMPs (principalmente ROS) (**Figura 1.2**) (Samson et al., 2020). Se ha observado que la necrosulfonamida (NSA), inhibidor de MLKL, inhibe completamente la necroptosis (He & Wang, 2018).

Cabe la posibilidad de que el complejo RIPK1-FADD-caspasa-8-cFLIP se forme en el citoplasma de manera independiente a la activación del receptor TNFR por ligando (Weinlich et al., 2017). Cuando esto sucede se denomina **rioptosoma** para diferenciarlo del **necrosoma** (Bedoui et al., 2020; Y. Liu et al., 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Este complejo se inhibe por cIAPS y XIAP (Chen et al., 2019; de Almagro & Vucic, 2015).

RIPK3 puede interaccionar y activar varias enzimas metabólicas, entre ellas la glucógeno fosforilasa (PYGL), la glutamato-amonio ligasa (GLUL) y la glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD1), aumentando la producción de ROS en las células (Liu et al., 2019). Esta alta producción de ROS desencadena la permeabilidad de la membrana del retículo endoplasmático (RE) y, por tanto, un aumento del nivel de calcio intracelular y liberación de enzimas hidrolíticas al citoplasma (Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

Se ha observado que dos proteínas participantes en la permeabilización de la membrana interna mitocondrial también participan en la necroptosis. Concretamente la ciclofilina D (CypD) y la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT) (Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Ying & Padanilam, 2016). La inhibición o ausencia de CypD

disminuye la muerte por necroptosis. Realmente se desconoce completamente la función de la mitocondria en este proceso de muerte, aunque se cree que no está involucrada (Ying & Padanilam, 2016) ni tampoco se conoce si la aparición de vesículas autofágicas en el proceso de necroptosis está relacionado con la activación de autofagia (Yuan & Kroemer, 2010).

Una mejor comprensión de la necroptosis y concretamente de la inhibición de RIPK1 y RIPK3 puede resultar una estrategia terapéutica potencial, puesto que este mecanismo está implicado en una alta variedad de enfermedades humanas como son leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, aterosclerosis, isquemia miocárdica, hipertrofia cardíaca, hiperglucemia, lesión hepática mediada por acetaminofén, lesión de órgano de donante, entre otras (Liu et al., 2019).

1.2 APOPTOSIS: PRINCIPIOS Y APLICACIÓN.

Como se ha comentado brevemente en el **apartado 1.1.1**, existen dos vías que desencadenan la muerte por apoptosis en la célula: la vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial; y la vía extrínseca, también denominada vía de receptores mortales. En este apartado se va a profundizar en los componentes implicados en ambas líneas y en la generación y transducción de señales de muerte celular en cada una de ellas.

1.2.1 Caspasas.

En el proceso de apoptosis participan proteínas proteolíticas denominadas caspasas (cisteín-proteasa) con especificidad de corte en aspártico (Alnemri et al., 1996). En la actualidad se conocen 18 caspasas en mamíferos conservadas evolutivamente, tanto su estructura como especificidad de sustrato (Chen et al., 2017). La primera en descubrirse fue la denominada caspasa-1, enzima convertidora de interleucina-1- β (ICE) de su forma pro-IL-1 β a su forma proinflamatoria IL-1 β (Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). La posterior clonación y caracterización del gen *ced-3* (gen que codifica para ICE) permitió detectar que ésta estaba involucrada en el proceso de muerte en *C.elegans* (Alnemri et al., 1996; Degterev et al., 2003; Nicholson et al., 1995; Yuan et al., 1993). Estudios posteriores facilitaron el descubrimiento y clasificación de las caspasas (Yuan et al., 1993).

Estructuralmente las caspasas presentan 3 dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande (p20) que contiene el centro activo con un residuo nucleofílico de

cisteína que participa en la ruptura de motivos que contienen aspártico, y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal (**Figura 1.3**) (Chen et al., 2017; Degterev et al., 2003). Las subunidades p20 y p10 están separadas por un lugar de corte con residuo aspártico, lo que permite la autocatálisis por parte de las propias caspasas o la activación de unas a otras como sucede en la reacción en cadena durante la apoptosis (Chen et al., 2017).

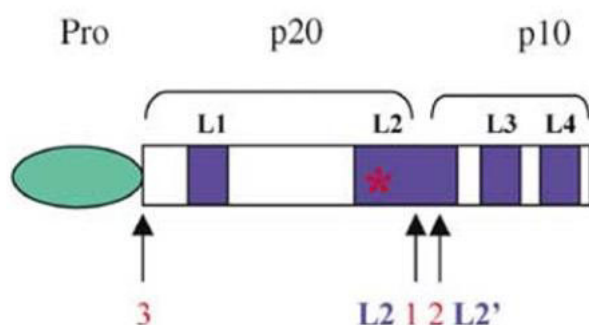






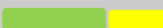






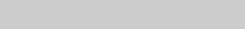



Figura 1.3. Estructura general de las caspasas. En verde se encuentra el prodominio situado en N-terminal, seguido de las subunidades grande (p20) y pequeña (p10). En las subunidades p20 y p10 se aprecian los bucles centrales catalíticos de caspasas (L1-L4) mostrados en morado. El proceso de escisión de activación se muestra mediante flechas y los números representan el orden de las escisiones de activación. El sitio activo Cys se muestra con un asterisco rojo en L2 donde ocurre el procesamiento. Imagen modificada de Degterev *et al.* 2003.

Todas las caspasas presentan características comunes en cuanto a secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad de sustrato, aunque se clasifican en dos grandes grupos filogenéticos: participantes en apoptosis o involucradas en procesos inflamatorios y maduración de citoquinas, aunque alguna puede participar en ambos procesos (**Tabla 1.2**) (Earnshaw, Martins, & Kauffmann, 1999).

Las caspasas se expresan como pro-enzimas o precursores inactivos denominados zimógenos, en el caso de caspasas iniciadoras en forma de monómeros y en el caso de las caspasas ejecutoras en dímeros (Boatright & Salvesen, 2003; Earnshaw et al., 1999). La activación de dichas proteínas difiere en función de la clase a la que pertenecen. Las caspasas iniciadoras se activan por la unión a proteínas adaptadoras a través de los dominios DED (del inglés “Death Effector Domain” o Dominio efector de muerte) o CARD (del inglés “Caspase Activation Recruitment Domain” o Dominio de reclutamiento y activación caspasas); en cambio, las caspasas ejecutoras se activan por la lisis proteolítica del zimógeno por parte de las caspasas iniciadoras (Boatright et al., 2003; Boatright & Salvesen, 2003). Las caspasas ejecutoras, una vez activadas, procesan a su vez otros sustratos proteicos que median en las distintas vías de la apoptosis. La iniciación

de estas reacciones en cascada está regulada por diferentes proteínas, como son inhibidores de caspasa (IAPs, del inglés “***I**nhibitor of **A**poptosis **P**rotein*”), c-FLIP (del inglés “FLICE-like Inhibitory Protein”), p35 o CrmA (***C**ytokine **r**esponse **m**odifier **A***) (Deveraux & Reed, 1999; Irmeler et al., 1997; LaCasse et al., 2008). Dentro de los IAPs se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y survivina (Okushi et al., 2015).

Tabla 1.2 Clasificación caspasas. Clasificación de caspasas según dos grandes grupos: apoptosis o inflamación y maduración de citoquinas. A su vez, las caspasas involucradas en apoptosis han sido divididas en 2 subgrupos en función de su mecanismo de acción: iniciadoras o efectoras. Adaptada de H. Chen, Ning, & Jiang, 2017.

GRUPO	SUBGRUPO	NOMENCLATURA	ESTRUCTURA	SUSTRATO
Apoptosis	Iniciadoras	Caspasa-2		DEHD
		Caspasa-8		LETD
		Caspasa-9		LEHD
		Caspasa-10		LEND
	Efectoras	Caspasa-3		DEVD
		Caspasa-6		VEHD
		Caspasa-7		DEVD
Inflamación y maduración citoquinas		Caspasa-1		WEHD
		Caspasa-4		(WL)EHD
		Caspasa-5		(WL)EHD
		Caspasa-11		WEHD
		Caspasa-12		WEHD
		Caspasa-13		WEHD
		Caspasa-14		WEHD
		Caspasa-16		-

 CARD  SUBUNIDAD LARGA  SUBUNIDAD PEQUEÑA  DED

Abreviaturas: CARD (del inglés “*Caspase Activation Recruitment Domain*” o Dominio de reclutamiento y activación caspasas); DED (del inglés “*Death Effector Domain*” o Dominio efector de muerte).

1.2.2 Proteínas Familia BCL-2.

Dentro de la familia BCL-2 se recoge la propia proteína BCL-2 y proteínas con una estructura tridimensional similar o una estructura secundaria predicha similar a BCL-2 con variedad de bioactividades (Youle & Strasser, 2008). Existen aproximadamente 20 proteínas dentro de la familia BCL-2, cuya estructura hélice α puede estar compuesta de hasta 4 dominios homólogos de BCL-2 conocidos como BH1, BH2, BH3 y BH4 (Warren et al., 2019).

Debido a la diferencia en su función celular, las proteínas pertenecientes a esta familia se dividen en dos grandes grupos (**Figura 1.4**):

- **Anti-apoptóticas:** BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, A1, MCL-1, BCL-RAMBO, BOO, DIVA, BCL-B, BCL2L10 y BCL-G.
- **Pro-apoptóticas:** BAX, BAK, BOK/MTD, BID, BIM/BOD, BAD, BMF, NOXA, HRK, DP5, PUMA, BBC3, BIK, BLK, NBK y MULE. Dentro de las pro-apoptóticas se diferencia un subgrupo denominado **BH3-only** (BID, BIM/BOD, BAD, BMF, NOXA, HRK, DP5, PUMA, BBC3, BIK, BLK, NBK y MULE).

Además de las diferencias funcionales, las proteínas anti-apoptóticas presentan los 4 dominios mientras que las pro-apoptóticas pueden tener de 1 a 3 dominios, aunque recientemente se ha sugerido que estas últimas también contienen el dominio BH4 (Elkholi et al., 2011). Las proteínas BH3-only únicamente poseen el dominio BH3, aunque hay excepciones como la proteína MULE que contiene un dominio asociado a ubiquitina (UBA), el módulo de interacción Trp-Trp-Glu (WWE) y un dominio ligasa de ubiquitina HECT (Youle & Strasser, 2008). Por otro lado, las proteínas BIM (también conocida como BOD), BAD y BMF son proteínas no estructuradas (Youle & Strasser, 2008) (**Figura 1.4**).

Por otra parte, todas las proteínas de la familia BCL-2 presentan una estructura conservada denominada núcleo o *core* BCL-2 (Chipuk et al., 2010). Esta estructura está formada por ocho hélices α anfipáticas en la gran mayoría, aunque otras presentan una estructura desordenada intrínsecamente como las BH3-only. Dichas hélices se colocan de manera que permiten esconder la hélice $\alpha 5$ generando un núcleo hidrofóbico (Kvansakul & Hinds, 2013). En dicho núcleo se produce la coalescencia de los dominios BH1 (hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$), BH2 (hélices $\alpha 7$ - $\alpha 8$), BH3 (hélice $\alpha 2$) y la hélice $\alpha 3$. El surco hidrofóbico es el

que permite la interacción con las proteínas BH3-*only* en el caso de las proteínas anti-apoptóticas (Andreu Fernández, 2015; Kvansakul & Hinds, 2013).

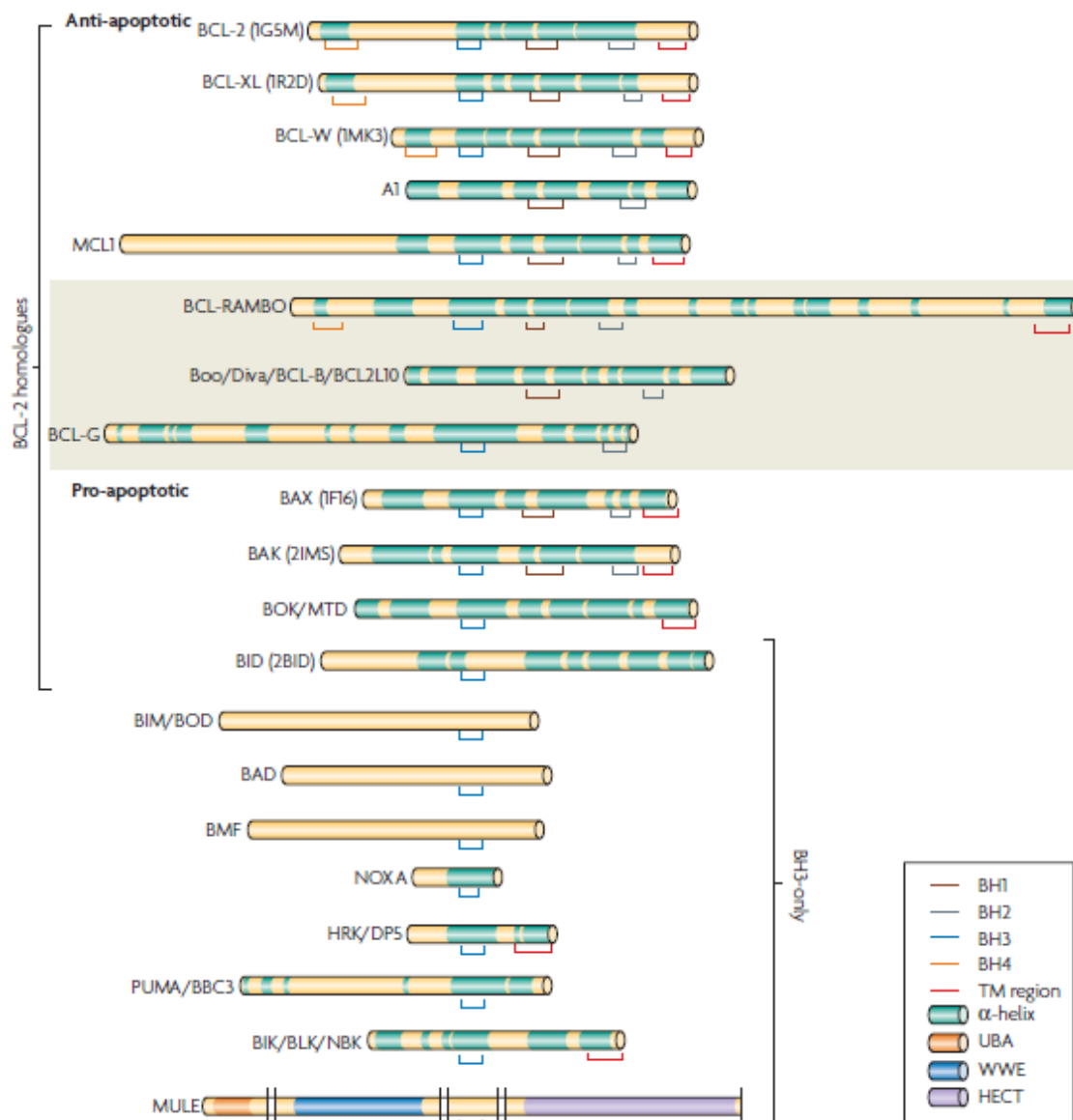


Figura 1.4. Clasificación de las proteínas de la familia BCL-2. Las barras verdes representan segmentos α -helicoidales de las estructuras determinadas. Las líneas rojas marcan regiones de dominios de transmembrana (TM) predichos. Se muestran las homologías de secuencia de las regiones BH1 (líneas marrones), BH2 (líneas grises), BH3 (líneas azules) y BH4 (líneas naranjas). Los dominios BH1, BH2 y BH3 se pliegan para alinear un bolsillo hidrófobo que puede unirse al dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas. El dominio BH3 media la interacción entre las proteínas BH3-*only* y las proteínas centrales de la familia BCL-2 y, por lo tanto, promueve la apoptosis. Las tres proteínas en el área sombreada están menos estudiadas y no se pueden clasificar en este momento. Imagen tomada de Youle & Strasser, 2008.

Las interacciones entre las distintas proteínas de la familia BCL-2 están muy reguladas y determinan la inducción o no de la apoptosis (Figura 7) (Singh et al., 2019). Concretamente, regulan la activación de BAK/BAX para la permeabilización de la

membrana externa mitocondrial, lo cual requiere de la interacción de las proteínas anti-apoptóticas con las BH3-*only* y de la propia interacción de las propias proteínas BAK y BAX con las proteínas BH3-*only* (**Figura 1.5**) (Chipuk et al., 2010).

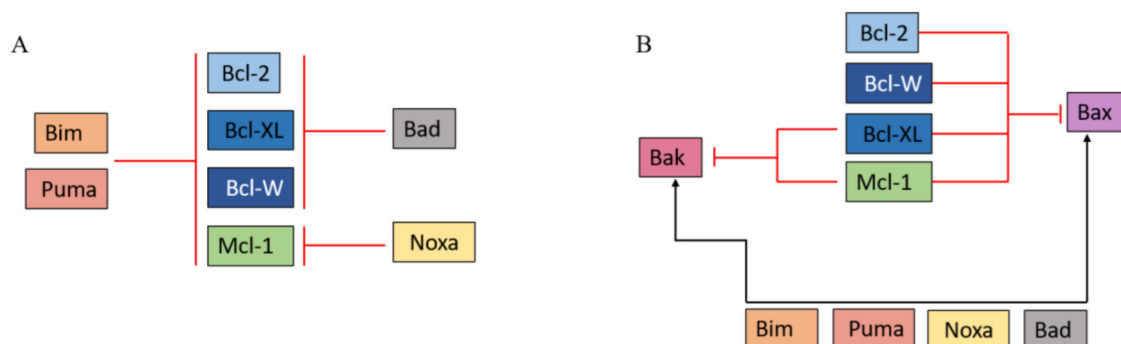


Figura 1.5. Interacción entre las proteínas de la familia BCL-2. (A) Inhibición de las proteínas BH3-*only* sobre las proteínas anti-apoptóticas. BIM y PUMA pueden inhibir a cualquier proteína anti-apoptótica, mientras que BAD sólo a BCL-2, BCL-X_L y BCL-W y NOXA sólo a MCL-1. (B) Inhibición (líneas rojas) de las anti-apoptóticas sobre las proteínas efectoras BAK y BAX. Bax puede ser inhibido por cualquier proteína anti-apoptótica. En cambio, BAK sólo puede ser inhibida por BCL-X_L y MCL-1. Además, se observa la activación (flechas negras) por parte de proteínas BH3-*only* de BAK y BAX indistintamente.

Se han propuesto diferentes modelos de interacción los cuales establecen que **a)** las proteínas anti-apoptóticas bloquean la activación de las proteínas efectoras BAK y BAX, **b)** las proteínas efectoras BAK y BAX están inactivas a niveles basales en las células sanas y su activación desemboca en MOMP y la salida de factores apoptogénicos, y **c)** las proteínas BH3-*only* activan BAK y BAX e inhiben la acción de las proteínas anti-apoptóticas (Shamas-din et al., 2013). Dichos modelos son (**Figura 1.6**):

- **Modelo directo:** este modelo propone que BAK y BAX necesitan ser activadas para llevar a cabo la permeabilización de la membrana mitocondrial. Para ello, las proteínas BH3-*only* activadoras (BIM, BID y PUMA) se unen directamente a BAX y BAK induciendo la activación de estas mediante un cambio conformacional (Letai et al., 2002). Previamente, BAD y NOXA inhiben la acción de las proteínas anti-apoptóticas respecto BIM, BID y PUMA, permitiendo así su unión a BAK y BAX (Ren et al., 2010). Sin embargo, se ha descubierto que se induce apoptosis a través de BAX y BAK en ausencia de BIM y BID, lo cual indica que puede darse por activación de otras proteínas como PUMA o NOXA (Oda et al., 2016).

- **Modelo indirecto, de represión o de desplazamiento:** este modelo se basa en la neutralización de BAX y BAK por acción de las proteínas anti-apoptóticas (sólo MCL-1 y BCL-X_L se unen a BAK, mientras que cualquiera de las proteínas anti-apoptóticas se une a BAX), durante el estado basal ya que postula que están constitutivamente activas (Fletcher & Huang, 2008). Ante un estímulo de inducción de apoptosis, las proteínas BH3-*only* se unen a las proteínas anti-apoptóticas liberando a BAX y BAK permitiendo su oligomerización, y así la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. BID, BIM y PUMA tienen más efecto pro-apoptótico que NOXA y BAD (Chen et al., 2005).
- **Modelo mixto:** trata de unificar los modelos directo e indirecto o de desplazamiento. Según este modelo, BAX y BAK están preactivadas, y son las proteínas anti-apoptóticas quienes se encargan de inhibir esta preactivación al unirse a ellas (Llambi et al., 2012; Shamas-din et al., 2013). Aunque también pueden unirse a proteínas BH3-*only* activadoras (BIM, BID y PUMA) inhibiendo la unión de estas a BAK y BAX. Sólo las proteínas NOXA y BAD pueden unirse a las anti-apoptóticas dejando libres a BAX, BAK y a las proteínas BH3-*only* activadoras (Kale et al., 2018; Shamas-din et al., 2013).
- **Modelo de inserción en membrana (*Embedded Together Model*):** supone que la mayoría de las interacciones se producen cuando las proteínas están insertadas en membranas por su dominio en C-terminal y las interacciones se llevan a cabo en la membrana externa mitocondrial. Postula que la inserción de estas proteínas en la membrana conlleva un cambio conformacional que afecta a las interacciones entre ellas (Leber, Lin, & Andrews, 2007). BAK y BAX una vez activadas se localizan en la membrana externa mitocondrial presentando una conformación que permite la unión de proteínas anti-apoptóticas para evitar la formación del poro mitocondrial (Shamas-din et al., 2013). Por otro lado, se cree que las proteínas BIM, BID y PUMA pueden activar a su vez más moléculas de BAK y BAX (Leber et al., 2010).

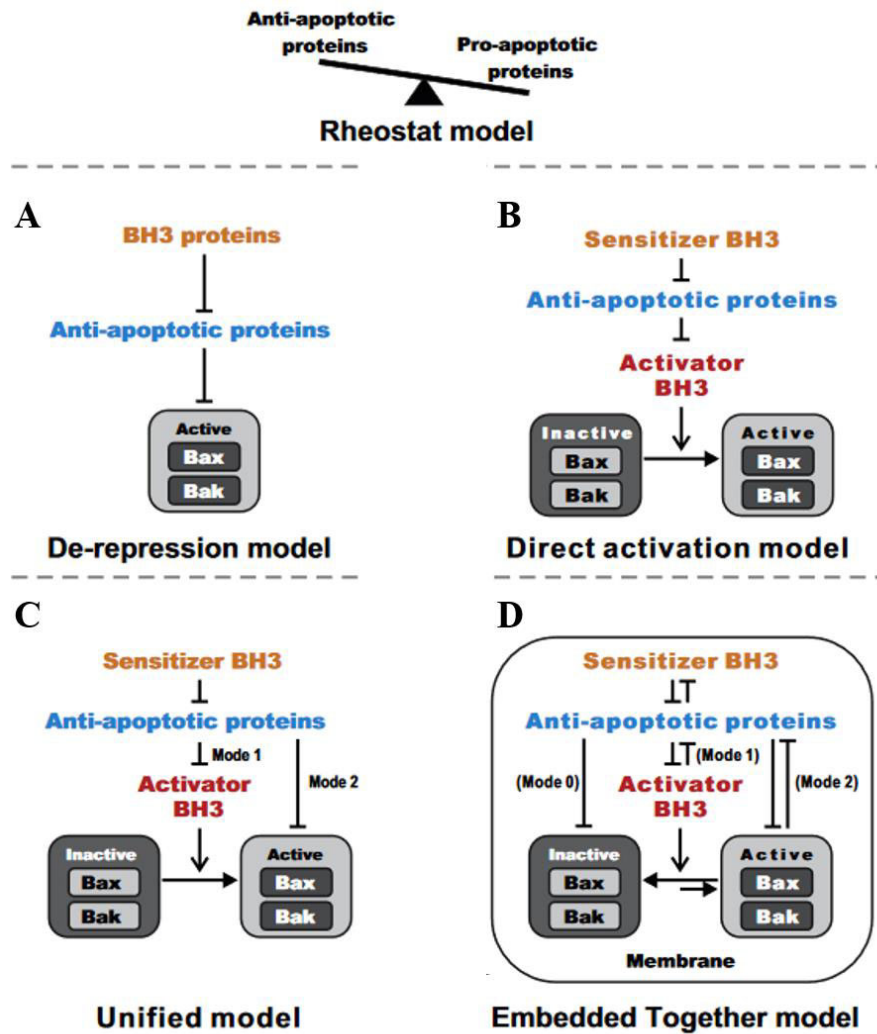


Figura 1.6. Modelos interacción entre proteínas de la familia BCL-2. (A) *Modelo indirecto*. Las proteínas BH3-only se unen a las anti-apoptóticas liberando a BAK y BAX de su represión permitiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). Las proteínas BAK y BAX están activas en condiciones basales. (B) *Modelo directo*. Las proteínas BH3-only sensibilizadoras (BAD y NOXA) inhiben las proteínas anti-apoptóticas liberando a las proteínas BH3-only activadoras (BID, BIM y PUMA) quienes activan BAK y BAX permitiendo que se produzca MOMP. (C) *Modelo mixto*. Las proteínas BAK y BAX pueden encontrarse preactivadas (Modo 2) o inactivadas (Modo 1). En el primer caso son inhibidas por las proteínas anti-apoptóticas (Modo 2). Las proteínas anti-apoptóticas también inhiben a las proteínas BH3-only activadoras impidiendo que activen a BAK y BAX (Modo 1). En esta última situación, las proteínas sensibilizadoras son quienes se unen a las proteínas anti-apoptóticas y liberando las activadoras y con ello activando BAK y BAX para MOMP. (D) *Modelo de inserción en la membrana*. Las proteínas BAK y BAX son inhibidas por las proteínas anti-apoptóticas en estado basal (Modo 0). Las proteínas sensibilizadoras inhiben a las anti-apoptóticas liberando las activadoras BH3-only y permitiendo la activación de la fracción inactiva de BAX y BAK para la formación del poro en la membrana mitocondrial (Modo 1). A su vez puede producirse la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas directamente sobre el poro por el cambio conformacional producido en la oligomerización de BAK y BAX (Modo 2). En este modelo todas las interacciones tienen lugar cuando las proteínas están insertadas en la membrana mitocondrial externa. Imagen modificada de Chi *et al.* 2014.

Los modelos directo, indirecto y mixto se basan en interacciones unilaterales, mientras que el modelo de inserción en membrana se basa en interacciones bidireccionales (Chi et al., 2014).

Es importante destacar que la regulación de las proteínas de la familia BCL-2 garantiza que la apoptosis se produzca sólo cuando sea necesario, de manera que se mantenga la homeostasis del organismo (Rooswinkel et al., 2014). Por ello, cada proteína de esta familia se regula según el contexto fisiológico (Siddiqui et al., 2015).

1.2.2.1 Proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2.

Las proteínas anti-apoptóticas se caracterizan por participar en la inhibición de proteínas pro-apoptóticas para mantener la integridad de la membrana externa mitocondrial (Perini et al., 2018). Dichas proteínas se localizan en la membrana externa de la mitocondria, en la membrana del RE o en el citoplasma (Zhu et al., 1996). Presentan los 4 dominios BH, excepto MCL-1, sobre la que no hay consenso de si presenta el dominio BH4 (Strasser, 2005). El extremo C-terminal mejora el efecto anti-apoptótico de estas proteínas además de poseer un dominio hidrofóbico en dicho terminal que facilita la inserción en la membrana mitocondrial (Krajewski et al., 1997).

Dentro de esta categoría se puede hacer una segunda agrupación según su unión a las proteínas pro-apoptóticas. Por un lado, estarían BCL-2, BCL-X_L y BCL-W, y por otro MCL-1 y A1 (Chen et al., 2005). Durante el desarrollo de esta tesis, se estudia principalmente el estado de las siguientes proteínas anti-apoptóticas:

- **BCL-2:** Contiene los cuatro dominios BH y es esencial para la supervivencia celular, sobre todo de linfocitos B maduros y T (Veis et al., 1993). Se localiza principalmente en la membrana mitocondrial externa en condiciones basales (Kale et al., 2018). Es regulado de manera transcripcional por la vía NF- κ B y por IL-6 (Heckman et al., 2002; Jourdan et al., 2000).
- **BCL-X_L:** Contiene los cuatro dominios BH y es esencial para la supervivencia celular, sobre todo de neuronas y eritrocitos (Afreen et al., 2020). Se localiza tanto en la membrana mitocondrial como en el citosol de la célula (Kale et al., 2018). Interacciona con la proteína pro-apoptótica BAK mediante su dominio BH3 (Warren et al., 2019). Al igual que BCL-2 es regulado de manera transcripcional por NF- κ B e IL-6 y de manera post-trasduccional mediante *splicing* alternativo dando lugar a una isoforma más pequeña (BCL-X_S) con

función pro-apoptótica (Heckman et al., 2002; Jourdan et al., 2000; Warren et al., 2019).

- **MCL-1:** proteína anti-apoptótica, de vida corta, fundamental para la supervivencia celular y el desarrollo embrionario (Kozopas et al., 1993). Se localiza principalmente en la membrana externa mitocondrial, aunque también puede estar presente en otras membranas intracelulares (Kale et al., 2018). Existe controversia sobre si en su estructura carece del dominio BH4, pero sí que se conoce que presenta en su extremo N-terminal dos secuencias PEST ricas en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina, las cuales son las responsables de la degradación de MCL-1 por vía del proteasoma (Mei et al., 2005; Strasser, 2005; Warren et al., 2019). MCL-1 se regula también a nivel transcripcional y post-trasduccional siendo inducido por varios factores de crecimiento y citoquinas (Senichkin et al., 2020). Además, MCL-1 es sustrato de caspasas, por lo que se forman isoformas de las cuales algunas tienen función pro-apoptótica (Senichkin et al., 2020). También puede ser fosforilada por JNK y GSK-3 (quinasa glucógeno sintasa-3) perdiendo la actividad anti-apoptótica (Inoshita et al., 2002; Maurer et al., 2006).

Todas estas proteínas suelen estar sobre-expresadas en muchos tumores, lo cual se relaciona con resistencia a fármacos quimioterapéuticos (Adams & Cory, 2018; Lessene et al., 2008; Radha & Raghavan, 2017; Senichkin et al., 2020). Por tanto, son posibles dianas terapéuticas ante las cuales se han desarrollado fármacos que inhiben su acción anti-apoptótica: ABT-199, A-1155463 y S63845 respectivamente a BCL-2, BCL-X_L y MCL-1 (Adams & Cory, 2018; Letai, 2016; Levenson et al., 2015). Estos fármacos están explicados en el **apartado 1.4.6.2**.

1.2.2.2 Proteínas pro-apoptóticas multidominio de la familia BCL-2.

Las proteínas pro-apoptóticas multidominio presentan los dominios BH1, BH2 y BH3, carecen del dominio BH4 (Wei et al., 2001). A este grupo pertenecen las proteínas BAK, BAX y BOK/MTG, aunque las más estudiadas son **BAK** y **BAX**.

BAK y BAX se encuentran disponibles en monómeros inactivos anclados a la membrana externa mitocondrial o en el citosol, respectivamente (Kale et al., 2018). Cuando se activan, oligomerizan y producen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial permitiendo la liberación del citocromo C y otros factores apoptogénicos al citosol (Rasola & Bernardi, 2007). En el caso de BAX necesita de un sistema de

activación de dos pasos: el primero induce un cambio conformacional y el segundo la oligomerización de BAX para la formación de poros en la membrana mitocondrial (Dengler et al., 2019). Los niveles de BAK y BAX están regulados de manera transcripcional por p53, MYC y p73 (Graupner et al., 2011).

En estudios previos se ha visto que la inhibición simultánea de BAK y BAX inhibe por completo la apoptosis inducida por vía intrínseca, lo que refleja el papel fundamental de ambas proteínas para una correcta realización de la apoptosis (Campbell & Tait, 2018; Niu et al., 2017).

1.2.2.3 Proteínas pro-apoptóticas BH3 *-only* de la familia BCL-2.

Las proteínas denominadas BH3 *-only* contienen únicamente el dominio BH3, necesario y suficiente para inducir apoptosis. Este dominio está formado por 9 a 16 aminoácidos en una estructura de hélice α anfipática con la excepción de BAD, BIM, BMF y MULE (Huang & Strasser, 2000; Shibue & Taniguchi, 2006). Son el objetivo principal de las proteínas anti-apoptóticas. Este grupo engloba las proteínas BID, BIM/BOD, BAD, BMF, NOXA, HRK, DP5, PUMA, BBC3, BIK, BLK, NBK y MULE.

Las más estudiadas son las siguientes:

- **BAD:** presenta un dominio en C-terminal que le permite insertarse en la membrana externa mitocondrial, no homólogo al resto de proteínas de la familia BCL-2. Esta proteína está regulada de manera post-traducciona por fosforilación en los residuos en Ser112, Ser136 y Ser155 mediada por varias quinasas como AKT, quinasas A (PKA) y JNK (Yan et al., 2018) o PP2A quien se encarga de la desfosforilación (Chiang et al., 2003). Cuando no está fosforilado, BAD se transloca a las mitocondrias inhibiendo las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y BCL-X_L facilitando la activación del complejo BAX/BAK; en cambio, ante estímulos de crecimiento y supervivencia las quinasas fosforilan a BAD quien sufre un cambio conformacional y permite la unión a la proteína 14-3-3 quien lo secuestra en el citosol e impide que lleve a cabo su función pro-apoptótica (Adachi & Imai, 2002).
- **BID:** es la proteína pro-apoptótica que une las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Es decir, BID se localiza en el citoplasma de las células, pero puede sufrir la activación por parte de la caspasa-8 provocando la ruptura de BID por su residuo Asp-60 (Luo et al., 1998). Este fraccionamiento da lugar a

tBID (BID truncado) el cual se dirige a la mitocondria e induce la apoptosis por vía intrínseca al conjugarse con BAX o BAK activándolos o inhibiendo a BCL-2 (X. Luo et al., 1998; M. C. Wei et al., 2000). Esta proteína se escinde también por granzima B, calpaínas y catepsinas, y es inducida transcripcionalmente por p53 (Billen, Shamas-Din, & Andrews, 2008; Maas, et al., 2011). BID se regula de manera post-trasduccional mediante la fosforilación de Thr-59 (impide la escisión por parte de la caspasa-8) y Ser-65 (Degli Esposti et al., 2003).

- **BIM:** proteína pro-apoptótica que presenta 3 isoformas principales (BIM_{EL}, BIM_L y BIM_S), debido al *splicing* alternativo, que difieren en tamaño y actividad pro-apoptótica (Hinds et al., 2007). La isoforma BIM_S es quien posee la actividad pro-apoptótica más potente y cuya expresión es menos abundante (Degli Esposti et al., 2003). BIM, al igual que PUMA, se une a todas las proteínas anti-apoptóticas de manera selectiva en función de los residuos de aminoácidos del dominio BH3 anfipático que se unen formando una hélice α con el surco hidrófobo de las proteínas anti-apoptóticas, como por ejemplo la unión BIM/BCL-X_L (Chen et al., 2005; Liu et al., 2003). Además, está regulada de manera transcripcional por varias citoquinas y factores transcripcionales como E2F-1, FOXO3A, CHOP-C/Eb α , NF- κ B o AP1; y de manera post-trasduccional mediante la degradación por vía del proteasoma al ser fosforilada por JNK y perder su función (Lomonosova & Chinnadurai, 2008; Piñon et al., 2008). Es el mayor regulador en la homeostasis hematopoyética y responde al estrés en el RE (Lessene et al., 2008).
- **NOXA:** proteína pro-apoptótica localizada en la membrana externa mitocondrial. Inhibe la acción de MCL-1 y en menor medida BFL1/ A1, aunque también puede unirse a BAK para su oligomerización y posterior activación (Degli Esposti et al., 2003; Pang et al., 2012). En estudios previos se ha demostrado que mutantes de NOXA pueden unirse a BCL-X_L y BCL-W (Lessene et al., 2008). Su inducción está controlada de manera transcripcional por E2F-1, p53, p21, HIF-1 (factor inducible por hipoxia) y c-MYC (Lomonosova & Chinnadurai, 2008; Oda et al., 2000). Los niveles de NOXA están regulados mediante la ubiquitinación y por tanto, por la degradación a través del proteasoma, por lo que es interesante en los tratamientos con

inhibidores de proteasoma, aunque todavía se desconoce el procedimiento exacto de ubiquitinación de esta proteína pro-apoptótica (Craxton et al., 2012).

- **PUMA:** proteína pro-apoptótica que presenta dos isoformas, PUMA_L y PUMA_β. La isoforma más corta es la que presenta mayor actividad pro-apoptótica. Mediante la unión de su dominio BH3 (el cual debe estar intacto) con el dominio BH1 de MCL-1 inhibe la capacidad anti-apoptótica de esta última proteína (Mei et al., 2005). Al igual que NOXA se regula de manera transcripcional por E2F-1, p53 o por fármacos como dexametasona o carencia de calcio, y post-traduccionally mediante fosforilación o acetilación (Lomonosova & C.Hinnadurai, 2008; Ploner et al., 2008). Es capaz de inducir apoptosis en múltiples cánceres y es crucial en la muerte de células hematopoyéticas (Mei et al., 2005).

Estas proteínas también pueden ser diana para uso terapéutico de enfermedades promoviendo su activación, por ello se han generado los denominados miméticos BH3 (**apartado 1.4.6.2**) quienes se unen a las proteínas anti-apoptóticas liberando a las proteínas BH3-*only* permitiéndoles ejercer su función apoptótica (Campbell & Tait, 2018; Gomez-Bougie et al., 2018).

1.2.3 Vía intrínseca.

La vía intrínseca está regulada dinámicamente por proteínas de la familia BCL-2 (**apartado 1.2.2**) y la mitocondria (Singh et al., 2019). Ante cualquier señal de estrés las proteínas BH3-*only* desencadenan la apoptosis al activarse las proteínas pro-apoptóticas BIM, BID, PUMA las cuales a su vez activan a otras proteínas pro-apoptóticas formadoras de poros como son BAX y BAK. La activación de estas últimas en la superficie mitocondrial conlleva un cambio alostérico, de manera que oligomerizan y provocan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial formando un poro y permitiendo la salida de compuestos apoptogénicos (Letai et al., 2002).

Tras la permeabilización mitocondrial se produce la salida de citocromo C, AIF, Smac/DIABLO, OMI/HTR2A y EndoG quienes contribuyen a la ejecución de la apoptosis a través de varias vías (**Figura 1.7**) (Blalock et al., 1999; L. Y. Li, Luo, & Wang, 2001; Maas et al., 2010). El citocromo C es capaz de activar directamente la cascada de caspasas mediante la activación de APAF-1 al provocar un cambio conformacional en dicha proteína la cual recluta la caspasa-9 (Deveraux & Reed, 1999). Este complejo proteico recibe el nombre de **apoptosoma** y permite la activación de la

caspa-9, la cual a su vez activa a las caspasas-3,6 y 7 que provocan la muerte celular (Julien & Wells, 2017). El resto de proteínas apoptogénicas Smac/DIABLO y OMI/HTR2A inhiben a los inhibidores de apoptosis XIAP, cIAP1, cIAP2, Ts-IAP, ML-IAP, NAIP, Survivina y Bruce (Khan et al., 2014; LaCasse et al., 2008).

Las proteínas AIF y Endo G producen la condensación de la cromatina y la degradación de DNA, previa a la DNAsa CAD, lo que muestra un mecanismo independiente de caspasas (Li et al., 2001). La generación de los poros por BAX y BAK pueden causar la movilización del DNA mitocondrial al citoplasma causando una señal proinflamatoria por la activación de cGAS-STING (GMP cíclico-AMP sintasa-estimulador de genes de interferón) (Singh et al., 2019).

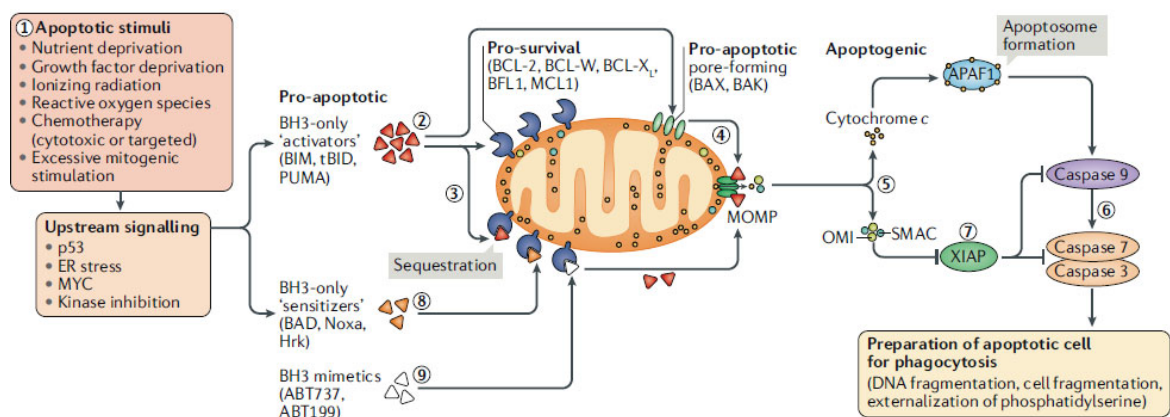


Figura 1.7. Vía intrínseca de la apoptosis. Ante cualquier estímulo de estrés las proteínas pro-apoptóticas BH3-only se unen a las proteínas anti-apoptóticas liberando y permitiendo que BAX y BAK se activen y oligomericen formando poros en la mitocondria. La permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) permite la salida del citocromo C, Smac y OMI. El citocromo C se une a la proteína APAF-1 para formar el apoptosoma y activar a la caspasa-9 quien recluta a las caspasas-3 y 7 para desencadenar el final de la apoptosis. Smac y OMI se encargan de inhibir a las proteínas XIAP liberando a las caspasas-3, 7 y 9. La adición de miméticos BH3 desencadenan también la apoptosis por vía intrínseca al inhibir a las proteínas anti-apoptóticas. Imagen tomada de Singh *et al.* 2019.

En estudios previos se ha visto que el uso de inhibidores de caspasas no es efectivo ya que una célula con mitocondrias permeabilizadas no puede proseguir con una actividad metabólica, por lo que los inhibidores de caspasas sólo retrasan los cambios morfológicos producidos por la apoptosis (Singh et al., 2019). La permeabilización de la membrana externa mitocondrial se considera un punto de no retorno para la célula, y es el evento clave que compromete a la célula a la apoptosis (Tait, & Green, 2013).

1.2.4 Vía extrínseca.

La vía extrínseca se activa por la unión de ligandos de “muerte” a receptores transmembrana desembocando en la transducción de señal de muerte, en la que participan proteínas adaptadoras y caspasas (Khan et al., 2014).

Los ligandos conocidos pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y engloban a TNF α , FasL/CD95/Apo1 y Apo2/TRAIL. Y los receptores principales son Fas/CD95, TNFR1 y TRAIL-R (You et al., 2017).

La transducción de señales desde el receptor transmembrana hasta el desencadenamiento de la apoptosis mediante la vía extrínseca varía según el tipo celular.

En el caso de las células tipo I el ligando FasL (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) se une al receptor Fas-CD95, y el dominio citoplasmático de este último se asocia con la proteína FADD la cual media la unión de la pro-caspasa-8 formando el complejo conocido como complejo de señalización inductora de muerte (DISC) (Khan et al., 2014). El complejo DISC ocasiona la autocatálisis de la pro-caspasa-8 resultando en la activación de la caspasa-8 la cual inicia la cascada de señalización que desemboca en la activación final de las caspasas ejecutoras-3 y 7 generando, por tanto, la señal definitiva de apoptosis (Rathore et al., 2017). Se cree que las proteínas FLASH y SADS ayudan al reclutamiento de la pro-caspasa-8 al complejo DISC promoviendo la apoptosis (Yin et al., 1999). En el caso de las células tipo II se produce una baja expresión del complejo DISC por lo que las caspasas activan proteolíticamente a BID formando tBID, conectando con la vía mitocondrial, ya que la vía extrínseca en este caso por sí sola es incapaz de provocar la apoptosis final (**Figura 1.8**) (Ashkenazi, 2008).

Por otro lado, la unión del ligando TNF α actúa de manera similar a FasL (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Al unirse TNF α a TNFR1 promueve la unión de TRADD al dominio citoplasmático del receptor que se une a los factores asociados al receptor de TNF (TAFs), a la quinasa RIP1 y al inhibidor celular de apoptosis cIAP formando el complejo de membrana inicial de supervivencia denominado complejo I (He & Wang, 2018). El complejo I estimula las vías MAPK/JNK y NF- κ B para facilitar la supervivencia o apoptosis celular. A su vez, a partir del complejo I se pueden formar dos complejos citoplasmáticos (el complejo IIA que depende de TRADD y el complejo IIB que depende de RIP) que se unen a la pro-caspasa-8 y por tanto desencadena la cascada de caspasas y el final de la apoptosis (You et al., 2017).

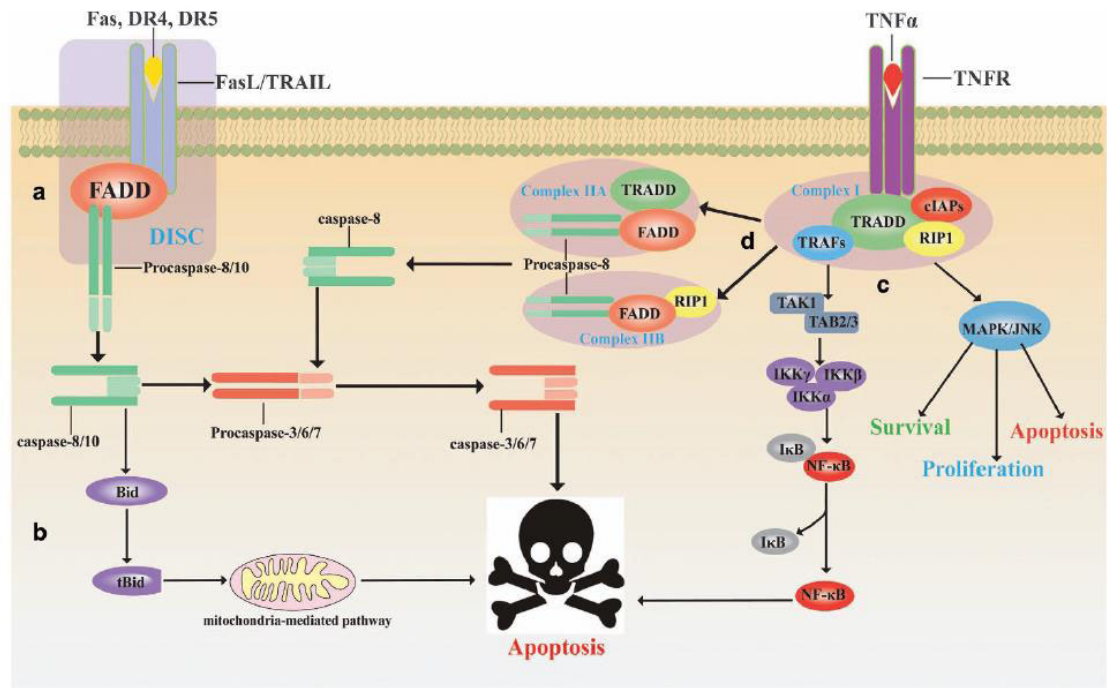


Figura 1.8. Vía extrínseca de la apoptosis. (A) Fas, DR4 y DR5 se activan mediante la unión de sus respectivos ligandos FasL y TRAIL. Esta activación del receptor implica la unión de FADD a través del dominio de muerte (DD). Luego, el dominio efector de muerte (DED) de FADD se une a la procaspasa-8 o a la procaspasa-10, formando el complejo de señalización inductora de muerte (DISC) para facilitar la escisión autoproteolítica de la procaspasa-8 o a la procaspasa-10, que induce la activación de la cascada de caspasas y finalmente resulta en apoptosis. (B) En células tipo II, caspasa-8 activada escinde la proteína pro-apoptótica BID para crear BID truncada (tBID), y esto da como resultado la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. (C) En el caso de TNFR1 recluta TRADD, una proteína adaptadora que se une a los factores asociados al receptor de TNF (TRAF), la proteína quinasa que interactúa con el receptor (RIP1) y el inhibidor celular de la apoptosis (cIAP), formando el complejo inicial de pro-supervivencia de la membrana (complejo I). El complejo I estimula la MAPK / JNK y la vía de NF-κB para facilitar la supervivencia celular o la apoptosis. (D) El complejo I forma dos tipos de complejos apoptóticos citoplasmáticos, el complejo IIA dependiente de TRADD y el complejo IIB dependiente de RIP1, que activan la caspasa-8, iniciando así la apoptosis. Imagen tomada de You *et al.* 2017.

1.2.5 Inhibidores de Apoptosis.

La familia principal de inhibidores de apoptosis son las proteínas IAPs. Está constituida por XIAP, cIAP1, cIAP2, Ts-IAP, ML-IAP, NAIP, Survivina y BRUCE (LaCasse et al., 2008). Esta familia contiene un dominio denominado BIR (del inglés “*B*aculoviral *I*nhibitory *R*epeat”) repetido de una a tres veces (Deveraux & Reed, 1999). Por ejemplo, XIAP tiene tres dominios BIR, un dominio asociado a ubiquitina (UBA) y un dominio RING que dota de actividad ubiquitina ligasa E3 en el extremo C-terminal. Las proteínas cIAP1 y cIAP2 presentan tres dominios BIR, un dominio UBA, un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y un dominio RING (Chaundhary et al., 2016).

Aunque todas las proteínas IAPs tienen una estructura similar, sólo XIAP o ML-IAP son capaces de inhibir las caspasas-3,7 y 9. Las proteínas cIAP1 y cIAP2 inhiben la

apoptosis a través de la regulación de la vía NF- κ B (LaCasse et al., 2008). En cuanto a la Survivina, es la más pequeña de la familia (solo presenta un dominio BIR), y se desconoce su mecanismo de inhibición de la apoptosis (Ambrosini et al., 1997).

Esta familia puede ser objeto de terapia en la leucemia mieloide aguda (AML), carcinoma renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas mediante la generación de fármacos que inhiban su acción y, por tanto, potencien la apoptosis celular (Chaundhary et al., 2016; Khan et al., 2014). En cambio se desaconseja en el mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin o neoplasias de células B y T (LaCasse et al., 2008). Algún ejemplo son LY2181308 que inhibe a la Survivina (Eba et al., 2013), AEG-35156 que inhiben a XIAP (Takakura et al., 2019) o moléculas miméticas de Smac/DIABLO (Zhao et al., 2020).

1.2.6 Apoptosis y cáncer.

El cáncer está asociado a la acumulación de daño en el DNA, señales de crecimiento aberrantes y estrés constante (Tang et al., 2012). La gran mayoría de genes proliferativos están controlados por MYC, el cual se desregula en diferentes cánceres (Whitfield et al., 2017). La desregulación de MYC conlleva una mayor expresión de proteínas pro-apoptóticas y, por tanto, una mayor tasa de apoptosis en las células premalignas (Strasser et al., 1990). Por tanto, la evasión de la apoptosis es importante para la supervivencia por parte de las células malignas (Singh et al., 2019).

La evasión celular de la apoptosis varía mucho entre los diferentes cánceres o incluso dentro del mismo, dando como resultado una dependencia de las proteínas de la familia BCL-2 (Rathore et al., 2017; Reed, 2008; Singh et al., 2019). Un claro ejemplo son los cánceres hematopoyéticos, ya que presentan alteraciones genéticas en genes implicados en la apoptosis para facilitar la evasión de dicha muerte celular (Khan & Kahl, 2018). Los mecanismos más empleados para la evasión apoptótica son la “*up*”-regulación de los genes de proteínas anti-apoptóticas y la “*down*”- regulación de las proteínas pro-apoptóticas, bien a nivel transcripcional o post-trasduccional. Aunque esta evasión apoptótica no implica la generación de células resistentes a la apoptosis, sí disminuye la sensibilidad a determinados tratamientos (Singh et al., 2019). Por tanto, la apoptosis es un proceso con alto potencial para el desarrollo de tratamientos antitumorales, concretamente mediante la modulación de las proteínas de la familia BCL-2.

1.3 AUTOFAGIA: POSIBLE MECANISMO DE MUERTE CELULAR.

El concepto de autofagia se refiere a un conjunto de procesos catabólicos que median la degradación de contenido citoplásmico (sea de forma no específica o de forma selectiva) mediante la acción de los enzimas hidrolíticos lisosomales (Klionsky et al., 2016). Existen diversos tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia o macroautofagia (**Figura 1.9**), siendo esta última denominada simplemente “autofagia” dada su mayor importancia para diversos procesos celulares (Allen & Baehrecke, 2020; Parzych & Klionsky, 2014). Este proceso ha despertado un amplio interés en los últimos años, siendo uno de los campos de investigación en biología celular y molecular que ha atraído mayor atención. Prueba de ello es el gran número de ensayos clínicos en marcha, basados en fármacos que modulan la autofagia con fines terapéuticos en diversos contextos patológicos (Klionsky et al., 2016).

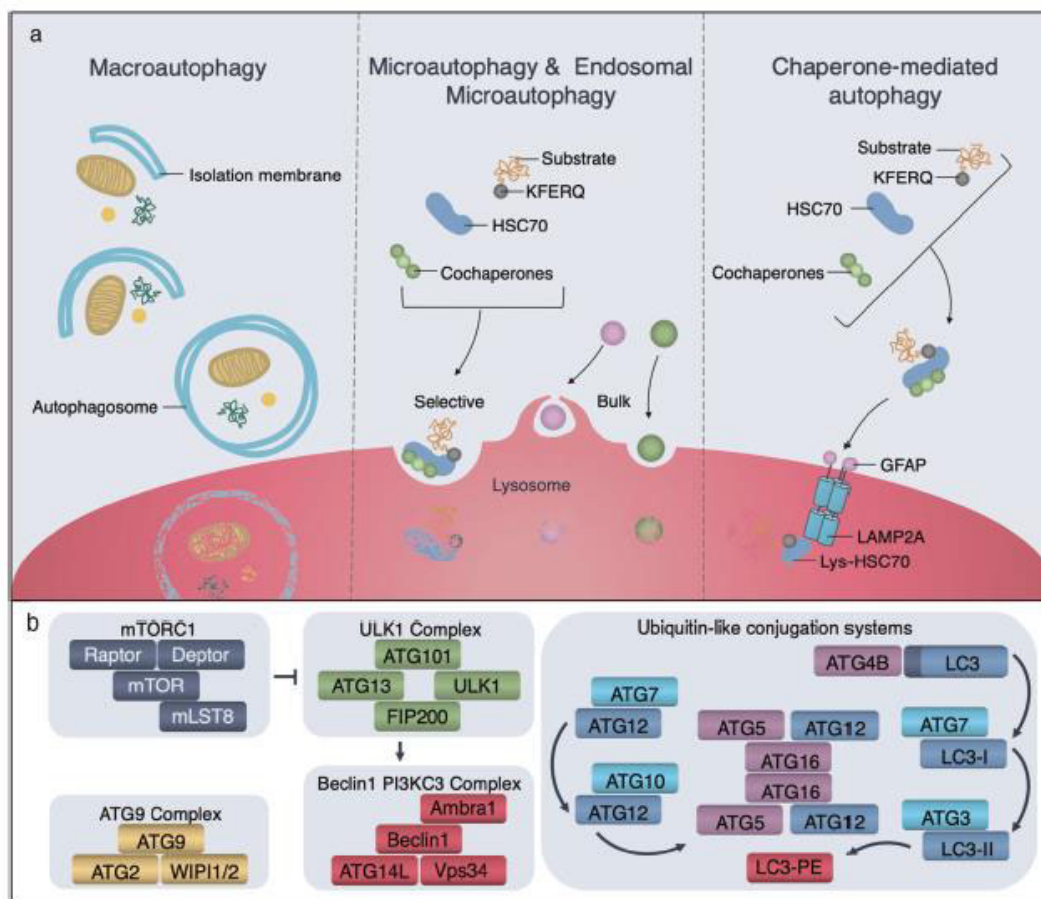


Figura 1.9. Vías y componentes autofágicos. (A) Las tres vías convergen en el lisosoma. En la macroautofagia, una membrana de doble capa engloba el contenido citoplásmico a degradar y se fusiona con el lisosoma para dar lugar al autofosoma. La microautofagia transporta el contenido a degradar directamente al lisosoma con o sin ayuda de chaperonas. Y, por último, la autofagia mediada por chaperonas necesita de la proteína de membrana del lisosoma LAMP2A para introducir el material a degradar

transportado por chaperonas. **(B)** Componentes moleculares conservados en el desarrollo de la macroautofagia. Imagen tomada de Allen & Baehrecke, 2020.

La autofagia constituye un importante mecanismo de protección que permite a las células sobrevivir en respuesta a múltiples factores estresantes y que ayuda a proteger los organismos contra enfermedades degenerativas, inflamatorias, infecciosas o neoplásicas entre otras (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010; Mizushima et al., 2008).

1.3.1 Mecanismos moleculares de regulación de la autofagia.

Existen diversos componentes moleculares que participan en esta ruta, que se regulan según la necesidad de actividad autofágica y la degradación más o menos selectiva de los distintos sustratos de esta ruta. En concreto, más de 30 proteínas están implicadas de forma directa en la regulación y ejecución de la autofagia, y se denominan proteínas ATG (del inglés “*Autophagy-related*”) (Li et al., 2011; Lin & Baehrecke, 2015). Dentro de este grupo, el sistema ATG4-ATG8 juega un papel esencial, siendo absolutamente indispensable para el funcionamiento de dicho proceso catabólico (Li et al., 2011). Una particularidad de este sistema es su complejidad, adquirida a lo largo de la evolución. Si bien en organismos más simples, como en levaduras, este sistema está formado por una proteasa, ATG4, y un sustrato, ATG8, en mamíferos ha adquirido una gran complejidad, encontrándose en humanos 4 ortólogos de la proteasa ATG4 (ATG4A-D) y 6 sustratos ATG8 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAP-L1 o ATG8L y GABARAP-L2 o GATE-16) (Kabeya et al., 2004; Li et al., 2011). En la actualidad, no está claro por qué los mamíferos han desarrollado esta gama de enzimas estrechamente relacionadas, en contraste con otros genes esenciales en este proceso, tales como ATG3, ATG5, o ATG7 para los que sólo existe un ortólogo en mamíferos (Li et al., 2011).

Las proteínas ATG codificadas para la participación en este proceso se clasifican tradicionalmente en distintos grupos bioquímicos y funcionales según su actuación en las etapas específicas de iniciación o formación de autofagosomas (**Tabla 1.3**) (Dikic & Elazar, 2018; Levine & Kroemer, 2019).

Tabla 1.3. Clasificación genes participantes en autofagia. Proteínas que participan en la autofagia con información de su función y si pertenecen a un complejo determinado o no. Adaptada de Dikic & Elazar, 2018.

GEN	COMPLEJO	FUNCIÓN
ULK1	ULK1	Inicio autofagia.
ULK2		
FIP200		
ATG13		
ATG101		
Beclina 1	PI3KC3-C1	Nucleación autofagosoma.
VPS34		
VPS15		
ATG14		
Beclina 1	PI3KC3-C2	Maduración autofagosoma.
VPS34		
VPS15		
UVRAG		
WIPI	WIPI-ATG2	Elongación membrana autofagosoma.
ATG2A		
ATG2B		
ATG9		Proteína de membrana que inicia la membrana del autofagosoma.
ATG4	ATG4-ATG8	Formación autofagosoma
ATG8		
ATG5	ATG5-ATG12	Finalización de la expansión y cierre de autofagosoma.
ATG12		
ATG16L1		Finalización de la expansión y cierre de autofagosoma.
ATG7		Conjugación de ATG8 con PE.
ATG10		Conjugación de ATG8 con PE.
STX17		Fusión autofagosoma con lisosoma para dar lugar al autofagolisosoma.
P62		Proteína de carga autofagosoma / receptor autofagia.

Abreviaturas: PE (fosfatidiletanolamina), ATG4 (engloba ATG4A, ATG4B, ATG4C y ATG4D) y ATG 8 (engloba LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAP-L1 o ATG8L y GABARAP-L2 o GATE-16)

El proceso de autofagia (**Figura 1.10**) comienza con la activación del complejo serin-treonin-quinasa ULK1 (engloba a ULK1 o ULK2, ATG13, FIP200 y ATG101) por la falta de nutrientes o factores de crecimiento (Galluzzi & Green, 2019; Levy et al., 2017; Noguchi et al., 2020; Parzych & Klionsky, 2014).

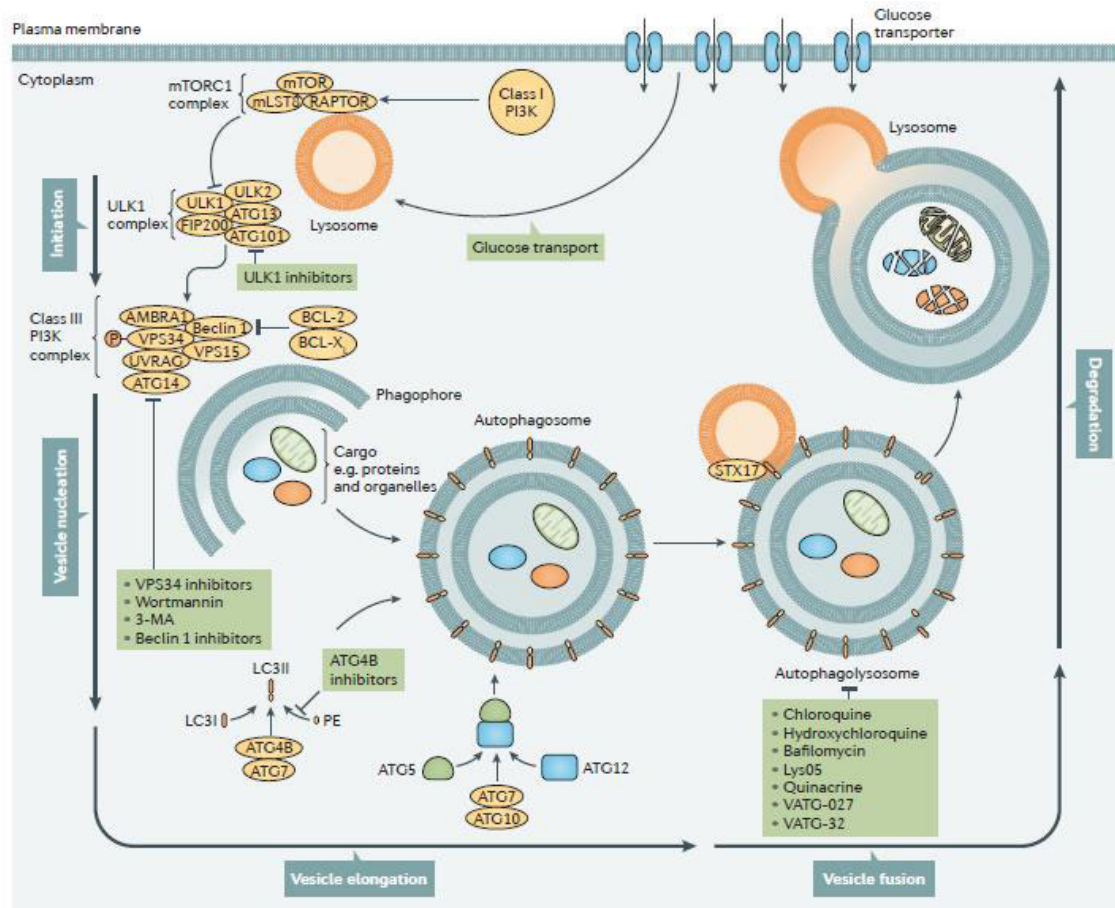


Figura 1.10. Componentes autofágicos e inhibidores. Bajo condiciones de inanición, la disminución del transporte de glucosa libera al complejo ULK1 (compuesto por ULK1, ULK2, FIP200, ATG101 y ATG13) de la inhibición de mTOR. Esta liberación del complejo ULK1 induce la formación de vesículas mediada por el complejo clase II de PI3K. Además, la Beclina 1 (BECN1) es fosforilada por ULK1 para facilitar la formación del complejo PI3K. La interacción con proteínas BH3 como BCL-2 y BCL-X_L por parte de BECN1 provoca una disminución del flujo autofágico al inhibir la formación del complejo BECN1-VSP34 y la interacción con UVRAG. En cambio, la activación de AMBRA1 por BECN1 estabiliza el complejo PI3K. La formación del autofagosoma está mediada por sistemas de conjugación de ubiquitina. Una opción es la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3I citoplasmático y procesado por ATG4B, para que ATG7 incorpore a LC3II en la membrana del autofagosoma. Otra forma es la mediada por el complejo ATG5-ATG12. La proteína syntaxina 17 (STX17) facilita la fusión del autofagosoma con el lisosoma. En verde se indican los diferentes inhibidores que se pueden utilizar para inhibir distintos pasos de este proceso. Imagen tomada de Levy *et al.* 2017.

Este complejo a su vez activa dos complejos distintos de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3KC3) dependientes de Beclina 1 (BECN1). El complejo de clase III PI3KC3-C1 (que involucra a Beclina 1, VPS34, VPS15 y ATG14) actúa en la nucleación del autofagosoma y el complejo de clase II PI3KC3-C2, que involucra BECN1, VPS34, VPS15 y UVRAG (proteína asociada a radicación UV también conocida como p63) para la maduración endolisosomal (Dikic & Elazar, 2018; Levy *et al.*, 2017). Por otra parte, las proteínas WIPI (del inglés “*WD repeat domain phosphoinositide-interacting*”) conjugadas a ATG2A o ATG2B participan en las primeras etapas de elongación de la

membrana del autofagosoma formada por ATG9 (Allen & Baehrecke, 2020; Levy et al., 2017; Parzych & Klionsky, 2014). Mientras tanto ATG4 procesa las proteínas de conjugación similares a ubiquitina conocidas como ATG8 (LC3 y GABARAP). Además, la subfamilia LC3 se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) por el complejo formado por ATG7-ATG10, de manera que pasa de denominarse LC3I a LC3II (también conocido, el más común, como MAP1LC3B) (Levine & Kroemer, 2019). LC3II se ancla a la membrana del pre-autofagosoma hasta la formación del **autofagosoma**. Posteriormente, el complejo ATG5-ATG12 (proteína de conjugación similar a ubiquitina) se une a ATG16L1 para finalizar la expansión y cierre de la membrana del autofagosoma. A diferencia de las levaduras, los sistemas de conjugación de proteínas similares a la ubiquitina no son esenciales para la terminación de la membrana autofagósomica en las células de mamíferos, aunque determinan la eficiencia del proceso (Levine & Kroemer, 2019). En última instancia, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma dando lugar al autofagolisosoma, gracias a la proteína syntaxina 17 (STX17) (Levy et al., 2017). El bajo pH del interior provoca la degradación del contenido del autofagolisosoma y la liberación para el reciclaje de precursores moleculares. En esta última etapa, LC3II se escinde del autofagolisosoma gracias a la actividad de ATG4 de nuevo (Dikic & Elazar, 2018; Levy et al., 2017). La proteína p62 se degrada junto a LC3II, por lo que ambas funcionan como proteínas de medida del flujo autofágico (Allen & Baehrecke, 2020).

Este proceso puede dirigirse de manera farmacológica mediante el uso de inhibidores como cloroquina, hidroxicloroquina y bafilomicina que evitan la formación del autofagolisosoma (Levy et al., 2017). Por ejemplo, la cloroquina impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma, es decir inhibe la acidificación (Russo & Russo, 2018). También se puede inhibir directamente el complejo ULK1, Beclina 1, o ATG4 (**Figura 1.10**) (Allen & Baehrecke, 2020; Denton & Kumar, 2019; Levy et al., 2017).

1.3.2 Autofagia y Cáncer.

Existen procesos biológicos complejos que pueden ayudar o retrasar el crecimiento y desarrollo del cáncer según diversos factores externos como pueden ser la dieta, antecedentes genéticos o predisposición a otras enfermedades entre otros (Russo & Russo, 2018). Uno de estos procesos es la autofagia.

Una autofagia deteriorada pone en entredicho la capacidad de respuesta de la célula ante el estrés metabólico ocasionado durante el desarrollo del cáncer, incluso puede conducir a la muerte celular (Jin et al., 2007).

En cáncer es importante evaluar si las células malignas dependen de la autofagia para superar el estrés metabólico ocasionado durante la carcinogénesis o si, por el contrario, la autofagia es un proceso esencial para bloquear la carcinogénesis (Russo & Russo, 2018). En estudios previos se han descubierto mutaciones en genes esenciales de autofagia que pueden desembocar en cambios de comportamiento funcional de la proteína hacia supresores de tumores u oncogenes. Algunas de estas mutaciones se dan en ATG5, ATG6, ATG7, ATG16L1, BECN1 (Levy et al., 2017; Russo & Russo, 2018). Por ejemplo, la supresión monoalélica de BECN1 en ratones, se traduce en una mayor incidencia de tumores espontáneos como son linfomas, leucemias o carcinomas hepatocelulares e incluso, la delección completa de BECN1 puede ocasionar la muerte durante el desarrollo embrionario (Qu et al., 2003). También afecta a tumores sólidos como son el cáncer de colon o el cáncer de mama haciendo que sean más agresivos o dotando de resistencia a inhibidores HER2 respectivamente (Janku et al., 2011).

Se ha comprobado que la deficiencia de autofagia se ve reflejada en una baja tasa de degradación de p62 provocando la acumulación de dicha proteína, y, por tanto, una alteración del factor NF- κ B o incluso la regulación de algunas queratinas, en células epiteliales (Janku et al., 2011). Una mala degradación de proteínas como consecuencia de una autofagia incompleta puede ocasionar ciertas enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Huntington o Parkinson (Rubinsztein, 2006).

Por tanto, conociendo qué mutaciones son las responsables de las alteraciones de la autofagia o cómo regular el proceso se podrían desarrollar tratamientos basados en la autofagia para algunos tipos de cáncer como el linfoma no Hodgkin, melanoma, sarcomas, glioblastomas, cáncer de mama, entre otros (Levy et al., 2017). Existen diferentes estudios en fases clínicas sobre dichos cánceres, que se basan en el uso de inhibidores de autofagia como potenciadores de apoptosis para su tratamiento (Levy et al., 2017).

1.3.3 Relación Autofagia y Apoptosis.

Existen evidencias acumuladas respecto a la conexión o interacción entre autofagia y apoptosis (Boya et al., 2005; Ghavami et al., 2014; Gump & Thorburn, 2011; Noguchi et al., 2020). En anteriores estudios se ha visto como la inhibición de autofagia aumenta la muerte celular inducida por apoptosis (Boya et al., 2005; Ghavami et al., 2014; Noguchi et al., 2020). Varias de las proteínas implicadas en autofagia pueden cambiar su papel. Por ejemplo, la escisión de ATG5 mediada por calpaína activa la apoptosis al

regular el complejo proteico BECN1-BCL-2 que interactúa en la membrana mitocondrial activando la apoptosis (Noguchi et al., 2020; Yousefi et al., 2006). Por otra parte, ATG12 cuando no se conjuga con ATG5 o ATG3 para llevar a cabo la autofagia, media de manera positiva la apoptosis intrínseca al regular a miembros de la familia BCL-2 por unión directa a proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y MCL-1 (Rubinstein et al., 2011). La imposibilidad de formación del complejo ATG12-ATG3 implica una expansión de la masa mitocondrial y por tanto la inhibición de la muerte celular mediada por estas (Radoshevich et al., 2010). También, p62 puede acabar activando la apoptosis si se bloquea su reclutamiento por el necrosoma (Moscato & Diaz-Meco, 2009).

Por otro lado, en células deficientes en BAX/BAK, se activa la autofagia si se retira el factor de crecimiento como regulación homeostática (Noguchi et al., 2020). Además, la autofagia puede ser inducida por ligandos que activan la vía extrínseca de apoptosis tales como TNF α , TRAIL o proteínas adaptadoras como FADD (Thorburn et al., 2005).

La interacción entre ambos tipos de muerte celular es la base de la patogenia de enfermedades como el cáncer y su metabolismo (Galluzzi & Green, 2019; Kimmelman & White, 2017). La autofagia puede ser la clave para evadir el estrés metabólico y favorecer la supervivencia de los tumores puesto que las células más distantes de los vasos sanguíneos padecen hipoxia y carecen de nutrientes, de esta manera se evita la apoptosis y por tanto la muerte celular (Janku et al., 2011). En estas circunstancias, las mitocondrias pueden sufrir una autofagia selectiva denominada “**mitofagia**” (Band et al., 2009). Este proceso es inducido por el factor de hipoxia HIF1 α quien activa la ubiquitinación de la proteína BNIP3 por parte de PINK1 o PARK2 que permite el reclutamiento de NBR1 la cual marca las mitocondrias para su degradación de manera selectiva (Band et al., 2009; Gao et al., 2015; Janku et al., 2011). PARK2 tiene un papel como supresor de tumores, por lo que este proceso podría resultar de interés como posible terapia contra el cáncer (Gao et al., 2015). Por otra parte la hipoxia induce un estrés en el retículo endoplasmático (RE) por proteínas mal plegadas, en este caso, la autofagia puede resultar beneficiosa para las células cancerígenas al permitir la eliminación de porciones de RE compactado y reducir masa mitocondrial puesto que las mitocondrias no pueden participar en la fosforilación oxidativa, evitando así un consumo excesivo de ATP (Glick et al., 2010). En cambio, la autofagia puede ser un potenciador de muerte celular si se da en exceso como se ha visto anteriormente.

En conclusión, existe una relación entre autofagia y apoptosis en el cáncer que permite la supervivencia del tumor al adaptarse según su entorno. Conociendo como se dan estas interacciones podemos abarcar la posibilidad de combinar diferentes tratamientos dirigidos contra ambos procesos: afianzando y aumentando la apoptosis, inhibiendo la autofagia globalmente o dirigida contra algunos de los participantes en autofagia cuya supresión favorezca el proceso de apoptosis.

1.4 MIELOMA MÚLTIPLE.

El Mieloma Múltiple (MM) es un tipo de cáncer hematológico que se caracteriza por la proliferación descontrolada y acumulación de células B plasmáticas en la médula ósea principalmente, pero pueden migrar a la sangre periférica y por tanto afectar a órganos y tejidos periféricos (Kyle & Rajkumar, 2008). Esta enfermedad representa el 1% de todos los tumores y el 10% de los cánceres hematológicos, antecedido por leucemias y linfomas (Abramson, 2018). Este trastorno se engloba en el grupo denominado gammapatías monoclonales.

El MM es más frecuente en personas mayores con edades en torno a 60 y 70 años de edad. No obstante, en los últimos años se ha detectado un aumento de casos en la población menor de 50 años que han desarrollado esta enfermedad (Pinto et al., 2020). En el año 2017 se estimó que a nivel mundial se diagnosticaron 153.000 nuevos casos de mieloma múltiple (en un ratio 1:1 entre ambos sexos) y que fallecieron aproximadamente 107.000 personas a causa de esta enfermedad (Fitzmaurice et al., 2019). En Estados Unidos, según la Sociedad Americana contra el Cáncer (ACS: *American Cancer Society*) en el año 2021 se han diagnosticado 34.920 nuevos casos con un ratio 1,2:1 entre hombres y mujeres, y han fallecido aproximadamente 12.410 pacientes (American Cancer Society, 2020). España presenta una incidencia de 40 nuevos casos por millón de habitantes al año, con una media de edad de 65 años y una incidencia del 15% en personas menores de 50 años (Fundación Josep Carreras, 1988). Además, en esta enfermedad, se aprecia una incidencia mayor según la raza, teniendo una afección superior en la raza negra respecto a la raza blanca e incluso respecto a la raza asiática (Derman et al., 2020; Landgren et al., 2014).

El MM, como se ha comentado anteriormente, se produce por la proliferación excesiva de las células B plasmáticas ocasionando citopenias, dolor óseo y fracturas, anemia, infecciones recurrentes, insuficiencia renal, hipercalcemia o sangrado anormal

entre otros (American Cancer Society, 2020). No obstante, la característica principal de esta patología es la producción de una proteína monoclonal denominada proteína M o inmunoglobulina de cadena ligera detectable en suero y orina y producida únicamente por las células malignas (Kumar, Rajkumar, et al., 2017).

La etiología de esta enfermedad se desconoce, aunque se han identificado factores tanto genéticos como ambientales que pueden predisponer a padecerla. Por ejemplo, se ha comprobado con anterioridad que la exposición a radiación ionizante o una estimulación antigénica de manera crónica son factores de riesgo para el mieloma múltiple (G. J. Morgan et al., 2002).

1.4.1 Estadios del desarrollo del Mieloma Múltiple.

Las células B plasmáticas se originan y maduran en la médula ósea, y a continuación migran a los nódulos linfáticos secundarios (Dilosa et al., 1991). Cuando las células plasmáticas proliferan anormalmente conllevando consigo una sobreproducción de inmunoglobulinas es cuando se produce el MM (Bianchi & Munshi, 2015; Jackson & Elsawa, 2015). Este trastorno en la diferenciación y crecimiento habitual de las células plasmáticas puede ser causado por una relación entre hipermutaciones o un isotipo atípico, junto a un perfil genético propenso a la aparición de traslocaciones importantes y otras anomalías cromosómicas, como pueden ser las trisomías (Pinto et al., 2020). La ontogenia del mieloma múltiple puede dividirse en diferentes etapas en su desarrollo (**Figura 1.11**):

- **MGUS (*Monoclonal gammopathy of undetermined significance*) o Gammapatía monoclonal de significado incierto:** Se trata del estadio inicial de la enfermedad y consiste en la proliferación de clones de las células plasmáticas. Es un estado premaligno en el que se presenta una baja proliferación de las células plasmáticas, una baja producción de inmunoglobulinas y sin síntomas relacionados (Kuehl & Bergsagel, 2002; Kyle et al., 2018). La mayoría de los casos de MGUS no son diagnosticados y sólo un pequeño porcentaje progresa a mieloma múltiple (sólo el 1%) (Hideshima et al., 2007).

Estudios previos han mostrado que el diagnóstico previo de MGUS en pacientes de mieloma múltiple correlaciona con una mayor supervivencia a los pacientes que no se conoce previamente este estadio (Sigurdardottir et al., 2015). Además, los pacientes con MGUS que presentan un bajo nivel de proteína monoclonal (<0.5 g/dl) se asocian a una supervivencia más corta

(Sigurdardottir et al., 2015).

Es conveniente estratificar a los pacientes de MGUS según el riesgo de progresión a MM evaluando factores de riesgo como isotipo, concentración de proteína M, índice FLC (cadena ligera libre) en suero e inmunoparesia (Rajkumar et al., 2005).

- **SMM (*Smoldering Multiple Myeloma*) o Mieloma Múltiple Latente:** solo algunos pacientes presentan este estadio intermedio que se caracteriza por una alta proliferación de células plasmáticas, una alta carga de producción de inmunoglobulinas y sin síntomas evidentes todavía (Kuehl & Bergsagel, 2002; Rajkumar et al., 2015). Se han identificado posibles predictores de la progresión de SMM a MM para establecer el riesgo de progresión, similares a los establecidos en MGUS (Pinto et al., 2020).
- **MM (*Multiple Myeloma*) o Mieloma Múltiple:** es la etapa en la que se aprecian síntomas. Esta puede ser intramedular o extramedular, siendo esta última relacionada con un mal pronóstico (Pinto et al., 2020). Se produce la producción de citoquinas, se estimula la actividad de los osteoclastos y la inhibición de los osteoblastos, por lo que se destruye el hueso y por tanto la salida de las células plasmáticas al torrente sanguíneo pudiendo proliferar en otros órganos (Kuehl & Bergsagel, 2002). De darse el caso de caracterizarse como extramedular, se le conoce como leucemia de células plasmáticas (Jelinek et al., 2015).

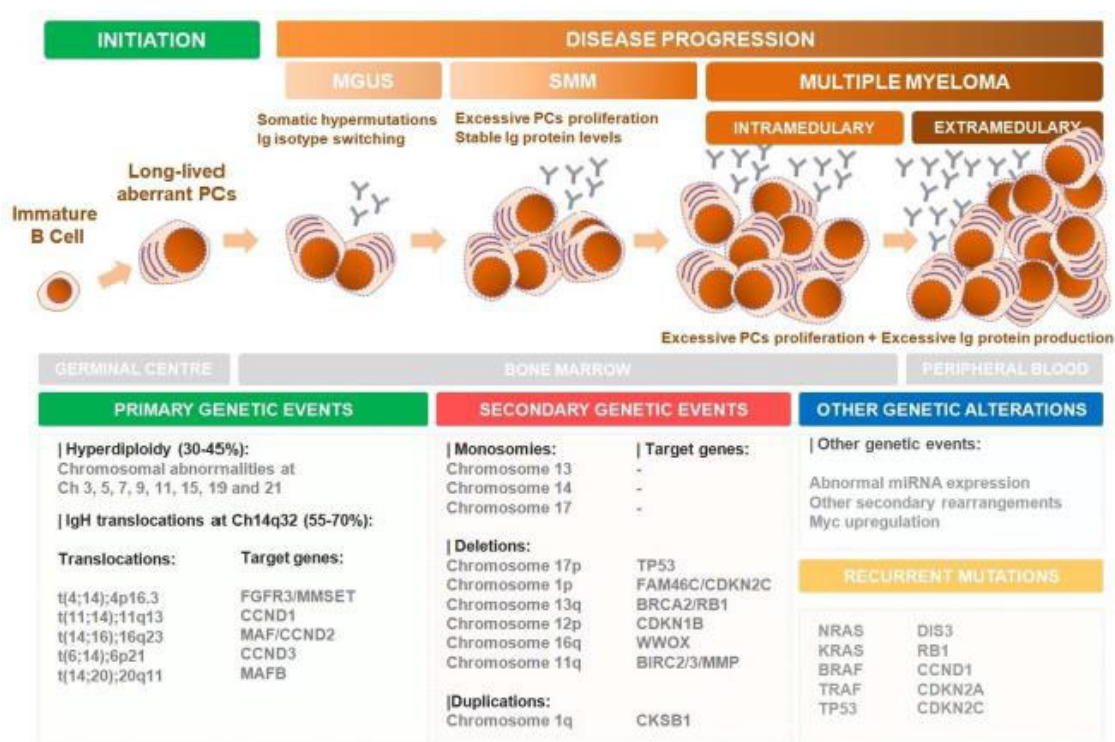


Figura 1.11. Estadios del desarrollo del mieloma múltiple. Desarrollo del mieloma múltiple desde la alteración en la proliferación de las células B plasmáticas en la médula ósea hasta su posible migración extramedular. Normalmente comienza con la gammopatía monoclonal de significancia indeterminada (GMSI o MGUS) debida a hipermutaciones somáticas y traslocaciones producidas en las células plasmáticas (PC) ocasionando un fenotipo aberrante, pero sin provocar síntomas clínicos. Una vez estas células malignas proliferan y comienzan a elevar los niveles de proteína M sin síntomas clínicos se define como mieloma múltiple latente o SMM. Por último, se producen mutaciones secundarias que agravan el fenotipo aberrante de las células plasmáticas ocasionando un aumento de la secreción de los niveles de proteína M a la sangre periférica. En esta instancia el paciente ya presenta síntomas clínicos graves, y por tanto ya está establecido el mieloma múltiple (MM). Imagen tomada de Pinto *et al.* 2020.

1.4.2 Síntomas del Mieloma Múltiple.

Las manifestaciones clínicas se producen por la combinación de distintos factores como la proliferación de células plasmáticas, producción de citoquinas por parte de ellas y el acúmulo de proteína M. Los principales síntomas clínicos ocasionados por las causas anteriores son (Hideshima *et al.*, 2007):

- **Dolor de huesos y fracturas:** La producción de interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), TNF, citoquinas y otros factores por parte de las células tumorales y estromales del microambiente provocan un aumento de la actividad de los osteoclastos desembocando en lesiones líticas y osteoporosis que causan dolor principalmente en columna vertebral, costillas y caderas (Gado *et al.*, 2000; Hideshima, Chauhan, *et al.*, 2001; Yaccoby *et al.*, 1998).

- **Anemia:** Las células tumorales impiden la correcta generación de glóbulos rojos y de eritropoyetina desencadenando una situación de anemia para el paciente y ocasionando un estado de cansancio o fatiga (Rosen & Rosen, 2020).
- **Infecciones recurrentes:** se responde más lentamente a los tratamientos contra infecciones debido a la disminución de la producción de inmunoglobulinas normales por la disminución de glóbulos blancos (leucopenia), por lo que son pacientes más susceptibles de sufrir infecciones bacterianas (Blimark et al., 2015; Bruns et al., 2012).
- **Insuficiencia renal:** La acumulación de proteína M puede dañar los riñones impidiendo que eliminen el exceso de sales, líquidos y productos de desecho (M. Dimopoulos et al., 2008).
- **Hipercalcemia.** El aumento de calcio en sangre debilita los huesos, forma cálculos renales por lo que potencia la insuficiencia renal, e interfiere en el correcto funcionamiento del corazón y cerebro (Oyajobi, 2007).
- **Sangrado anormal o Trombocitopenias:** La producción de plaquetas disminuye por lo que se puede producir un sangrado ante heridas ínfimas por una mala coagulación (Rosen & Rosen, 2020).

1.4.3 Alteraciones Genéticas en Mieloma Múltiple.

Gracias a los nuevos avances en tecnología se ha conseguido comprender mejor la patología y alteraciones genéticas que causan el mieloma múltiple. El MM presenta una alta inestabilidad genética, aunque no se conoce una causa genética en la transición de MGUS y SMM a mieloma múltiple, sí se ha apreciado anteriormente que pacientes que poseen metilaciones del DNA y los microARN aumentan la probabilidad de progresión a MM (Kumar, Rajkumar, et al., 2017; Manier et al., 2017; Pinto et al., 2020).

Las principales alteraciones conocidas en mieloma múltiple y que han sido previamente descritas son las traslocaciones de la cadena pesada (IgH) t (4;14), t (6;14), t (11;14), t (14;16) y t (14;20) y la hiperdiploidía (Manier et al., 2017). Las traslocaciones en IgH desembocan en la sobreexpresión de oncogenes como MMSET o NSD2, FGFR3 (codifica para el receptor 3 del crecimiento de fibroblastos), CCND1 (codifica para la ciclina D1), CCND3 (codifica para la ciclina D3), MAF y MAFB, mientras que la hiperdiploidía ocasiona trisomías de cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 (Hideshima et al., 2007; Kuehl & Bergsagel, 2002; Manier et al., 2017). Existen

diferencias de pronóstico en función de la alteración genética que predomina, ya que se puede producir más de una en muchos casos. Se ha observado que las trisomías más concurrentes son de los cromosomas 3 y 5, las cuales están asociadas a un buen pronóstico, y la trisomía 21 que indica un peor pronóstico (Hideshima et al., 2007). Los pacientes que presentan hiperdiploidía presentan una menor probabilidad de padecer traslocaciones en la cadena pesada de las inmunoglobulinas, aunque no es totalmente excluyente la existencia de hiperdiploidías para padecer traslocaciones (Kumar, Rajkumar, et al., 2017).

Tabla 1.4. Traslocaciones habituales en el mieloma múltiple. Traslocaciones más comunes con su incidencia y relacionados con los genes que alteran. Además, se muestra su relación con diferentes líneas estables empleadas para el estudio del mieloma múltiple según las alteraciones genéticas que presentan. Adaptada de Kumar *et al.*, 2017; Smith, Mann, & Yong, 2016.

TRASLOCACIÓN	INCIDENCIA	GEN ASOCIADO	LÍNEAS ESTABLES
t (4;14)	11%	NSD2 y a veces FGFR3	NCI-H929, JIM3, KMS28, OPM-2
t (6;14)	< 1%	CCND3	-
t (11;14)	15-20%	CCND1	KMS12BM, U266, XG1
t (14;16)	3%	MAF y CCND2	JJN3, MM.1S, RPMI8226
t (14; 20)	1,5%	MAFB	-

Existen otros cambios cromosómicos que facilitan la progresión del mieloma múltiple como son la delección del brazo corto del cromosoma 1 (del (1p)), ganancia del brazo largo en el mismo cromosoma (ganancia (1q)), delección en el cromosoma 13 (del (13q)) o pérdida del brazo corto del cromosoma 17 (del (17p)) (Manier et al., 2017).

Por otra parte, se ha visto en pacientes de mieloma múltiple la presencia de mutaciones en los genes KRAS, NRAS, FAM, DIS, TP53 de manera que alteran vías de señalización celular incrementando la síntesis de proteínas anti-apoptóticas (Alagpulinsa et al., 2020; Hideshima et al., 2007; Walker et al., 2015). En estudios más profundos, se

ha apreciado el hecho de que los genes mutados se expresan en menor medida en dichos pacientes, por lo que podría ser un indicador de la enfermedad (Bianchi et al., 2017).

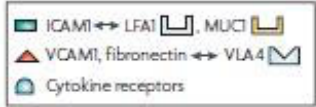
También existen alteraciones epigenéticas (metilación de DNA, la desregulación del miARN o afecciones en la estructura de la cromatina) que pueden provocar el desarrollo de esta enfermedad (Bianchi & Munshi, 2015; Kumar, Rajkumar, et al., 2017). Un hecho comprobado es la presencia de una hipometilación durante el curso de MGUS y el aumento de la metilación en el transcurso del mieloma (Heuck et al., 2015). Estas alteraciones implican un cambio en las cascadas JAK-STAT y, en consecuencia, en la sensibilidad a citoquinas y la supervivencia celular (Hideshima et al., 2007).

Por lo tanto, la característica de gran inestabilidad génica, no sólo facilita el crecimiento y evolución de dicha enfermedad sino que crea puntos de vulnerabilidad para posibles tratamientos, como el uso de fármacos que interfieran en el mecanismo de reparación o la inducción de antígenos específicos dirigidos y posibles indicadores de la enfermedad y estadio (Alagpulinsa et al., 2020).

1.4.4 Microambiente médula ósea y Mieloma Múltiple.

No solo son importantes las alteraciones génicas que puedan existir previamente o suceder en el paciente para el desarrollo del mieloma, sino que otro punto a tener en cuenta es el microambiente que rodea a las células tumorales plasmáticas (Kuehl & Bergsagel, 2002). El mieloma principalmente reside en la médula ósea, aunque en algunas ocasiones migra a la sangre periférica y por ello afecta a órganos y tejidos extramedulares.

El microambiente de la médula ósea está formado por las proteínas de la matriz extracelular, las células hematopoyéticas habituales presentes en la médula ósea, células del sistema inmune (linfocitos T, células *natural-killer* (Nks), células B), osteoclastos y osteoblastos y células estromales (Kumar, Rajkumar, et al., 2017). El vínculo que se crea entre el microambiente y las células tumorales está compuesto de una alta complejidad de interacciones (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. que permiten la proliferación y migración de las células de MM, así como la participación en la resistencia a fármacos (Hideshima et al., 2007; Kuehl & Bergsagel, 2002). Esto último se conoce como “resistencia a fármacos mediada por adhesión celular” (De Raeve & Vanderkerken, 2005).



cadena α (compuesta por la subunidad de la glicoproteína gp80 o receptor de IL-6 α) y la cadena β (elemento transductor gp130), pero las células plasmáticas tumorales secretan al suero el receptor de IL-6 α para aumentar la secreción de IL-6 (Bataille & Harousseau, 1997). La producción de IL-6 activa las vías de señalización JAK-STAT, Ras-MAPK y PI3-AKT que están involucradas en el crecimiento y supervivencia celular (Hideshima, Nakamura, et al., 2001; Pinto et al., 2020). Además, la IL-6 protege contra la apoptosis provocada por el fármaco dexametasona mediante la activación del dominio SH2 de la proteína tirosina quinasa SH-PTP2 que se une y desfosforila a RAFTK (Chauhan et al., 2000).

Por otro lado, este microambiente permite la inhibición del sistema inmunitario ante el MM al impedir la diferenciación de monocitos en células dendríticas y secretando el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por parte de las células estromales (Tessoulin et al., 2018). Este factor permite la angiogénesis y promueve la secreción de IL-6 y activa las vías PI3K-AKT, MEK-ERK y la expresión de proteínas anti-apoptóticas como MCL-1 (Hideshima, Nakamura, et al., 2001). Además, VEGF dificulta la presentación de antígenos de las células dendríticas (Gabrilovich et al., 1996). Las células estromales secretan también el factor de necrosis TNF_α e IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) que activa las vías PI3K-AKT y Ras-MAPK (Hou et al., 2019; Pinto et al., 2020).

En resumen, todos los factores secretados en el microambiente promueven la proliferación y supervivencia de las células plasmáticas malignas.

1.4.5 Tratamiento de Mieloma Múltiple.

El tratamiento del mieloma múltiple ha avanzado en las últimas décadas, pasando de estar basado en quimioterapia, al uso de fármacos dirigidos contra mecanismos específicos de las células tumorales (**Figura 1.13**) (Chen et al., 2011; De Raeve & Vanderkerken, 2005; Jelinek et al., 2015). Actualmente están aprobados para su uso en clínica:

- Agentes Alquilantes.
- Inmunomoduladores.
- Inhibidores de proteasoma.
- Anticuerpos monoclonales.
- Inhibidores de histonas deacetilasas.

- Trasplante autólogo de células hematopoyéticas o ASCT (*Autologous Stem Cell Transplantation*)
- Inhibidores selectivos de exportación nuclear (ISEN): Selinexor.

Además, se encuentran en estudios clínicos el empleo de miméticos BH3 o cloroquina como posible tratamiento de esta enfermedad.

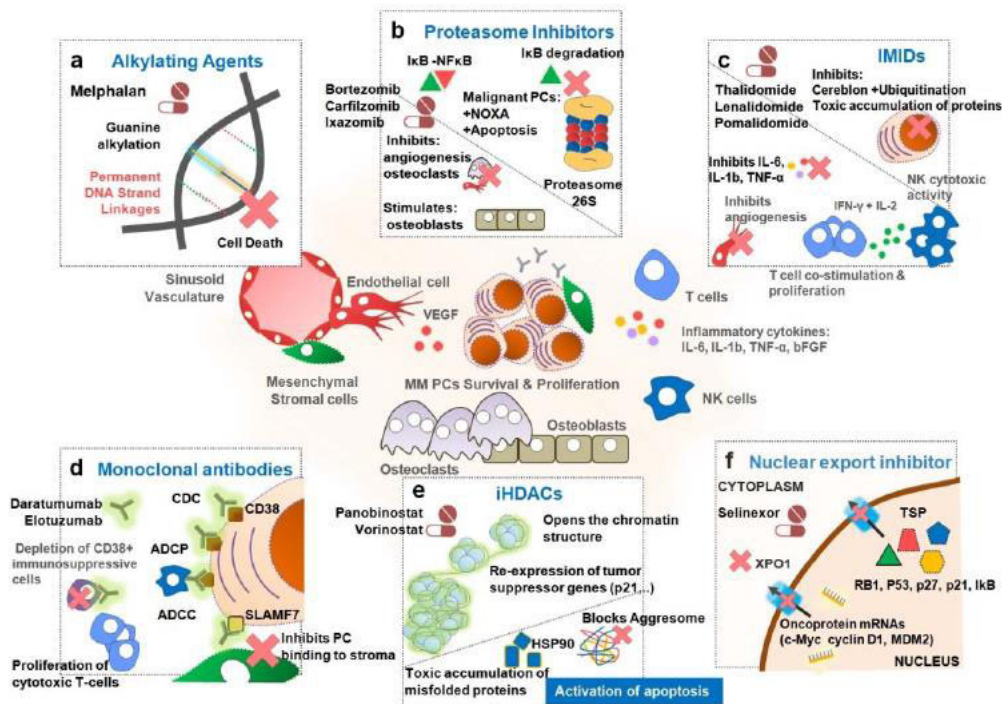


Figura 1.13. Tratamientos disponibles para mieloma múltiple. Los tratamientos que se conocen para el tratamiento de MM comprenden el uso de agentes alquilantes, inmunomoduladores (IMiDs), inhibidores de proteasoma, anticuerpos monoclonales, inhibidores de histonas deacetilasas (iHDACs) e inhibidores de la exportación nuclear. Cada uno de los grupos se dirige contra una finalidad concreta, por ejemplo el melfalán (alquilante) va dirigido contra las células altamente proliferantes; el uso de inhibidores de proteasoma como bortezomib, carfilzomib o ixazomib bloquean la degradación de proteínas y de IκB; los IMiDs modulan la inflamación ocasionada y los anticuerpos monoclonales se dirigen contra antígenos específicos de superficie para activar la ADCC (citotoxicidad mediada por células depende de anticuerpos), CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) y ADCP (fagocitosis dependiente de anticuerpos). Imagen tomada de Pinto *et al.* 2020.

1.4.5.1 Agentes Alquilantes.

Principalmente, y durante un tiempo prolongado, el tratamiento de primera línea ha sido el uso de alquilantes como el melfalán en combinación con esteroides (Abramson, 2018). El melfalán es uno de los fármacos llamados alquilantes los cuales tienen la propiedad de convertirse en electrófilos a través de la formación de intermediarios del ion carbono o complejos de transición relacionados. Para ello, se generan enlaces covalentes por la alquilación de diferentes moléculas nucleofílicas como grupos fosfato, amino,

hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo e imidazol (Brunton et al., 2005). Estos fármacos actúan en los diferentes niveles del ciclo celular, directamente a nivel del DNA de la célula generando roturas en este y dando lugar a un emparejamiento anormal de bases, la inhibición de la división celular y por tanto la muerte celular (Ralhan & Kaur, 2007). Este fármaco puede ocasionar efectos secundarios en el paciente como un aumento del riesgo de infecciones, anemia, sensación de cansancio, diarreas y náuseas e incluso desembocar en el Síndrome de Lisis Tumoral (TLS) (Ralhan & Kaur, 2007; Singh, Gupta, Yim, & Thekkekkara, 2017). El TLS es un síndrome que se produce por una rápida eliminación de las células tumorales, de manera que se libera una alta cantidad de ácido úrico a la sangre lo cual puede causar daños en los riñones y el corazón (Abu-Alfa & Younes, 2009; Singh et al., 2017).

Otros agentes alquilantes que se proporcionan como tratamiento del MM son la ciclofosfamida y bendamustina. La ciclofosfamida pertenece al grupo de fármacos antineoplásicos e inmunodepresores que se puede usar como quimioterapia única o en combinación con otros agentes farmacológicos (Brunton et al., 2005; Mirkes, 1985). Presenta varios efectos secundarios como un aumento de padecer cáncer de próstata y de las vías renales, hemorragia en la vejiga, aumento de la hormona antidiurética o vasopresina, neutropenia, etc (Bhatia et al., 2006; Mirkes, 1985).

Por otro lado, bendamustina es una mostaza nitrogenada con actividad bifuncional que actúa en los enlaces cruzados entre bases de DNA, incorpora un anillo benzimidazólico y tiene propiedades análogas a las purinas (Tageja & Nagi, 2010). Es decir, induce la apoptosis dependiente de p53 con efecto de daño en el DNA, promueve la alteración de la división celular mediante una “*down*” regulación de los puntos de control mitóticos (Leoni et al., 2008).

1.4.5.2 Inmunomoduladores (IMiDs).

Entre los esteroides suministrados destaca la dexametasona y los inmunomoduladores como la talidomida y la lenalidomida, los cuales se combinan o no con agentes alquilantes o con nuevos fármacos, que se emplean en la actualidad en el tratamiento del MM, como son los inhibidores de proteasoma (Al-Salama et al., 2017; Bianchi et al., 2017; Laubach et al., 2010; Muz et al., 2016; Perini et al., 2018). La dexametasona pertenece al grupo de glucocorticoides sintéticos que actúan con efecto antiinflamatorio e inmunosupresor (Obrist et al., 2015). Su uso en el mieloma múltiple

está justificado ya que suprime efectos secundarios del tratamiento en pacientes que están sometidos a quimioterapia (M. Dimopoulos et al., 2008; Twycross, 1994).

La talidomida es el primer fármaco aceptado como tratamiento de mantenimiento ya que genera un aumento de la supervivencia libre de progresión (PFS: *Progression-Free Survival*) pero presenta un cuadro clínico en el que se observan neuropatías periféricas (van de Donk & Yong, 2019).

Respecto a la lenalidomida, se trata de un fármaco derivado de la talidomida y se suministra junto a dexametasona en aquellos pacientes de MM a los que está contraindicado un trasplante de médula ósea y no tienen respuesta a otros fármacos (Al-Salama et al., 2017). Lenalidomida actúa inhibiendo el crecimiento y proliferación de las células tumorales ya que posee acción antiangiogénica (Lu et al., 2009). Además, potencia los mecanismos de respuesta inmune del paciente (Görgün et al., 2015). Los esteroides como todos los fármacos pueden causar efectos secundarios como neutropenias y trombopenias, anemia, diarrea incluso efectos más complejos como embolia pulmonar, o Síndrome de Stevens-Johnson (Al-Salama et al., 2017).

Conforme han avanzado las investigaciones, se han ido desarrollando nuevos fármacos como inhibidores de proteasoma, anticuerpos monoclonales, inhibidores de ciclinas o inhibidores de vías de señalización entre otros.

1.4.5.3 Inhibidores de Proteasoma.

El UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) se refiere a una maquinaria multienzimática que media la degradación de proteínas de vida corta, la eliminación de proteínas mal plegadas, mutadas o dañadas que resultan tóxicas para la célula (Obrist et al., 2015). Este proceso se inicia con la modificación post-traducciona l e irreversible conocida como poli-ubiquitinación. Es decir, se une de manera covalente varias moléculas de ubiquitina (proteína altamente conservada en todas las células eucariotas) señalando de esta forma la proteína para su degradación proteolítica por parte del proteasoma 26S (Wilkinson, 2005).

La unión de ubiquitina a la proteína se realiza mediante un proceso de tres pasos (Liu et al., 2020). Primero, la enzima activadora de ubiquitina E1 activa la ubiquitina mediante la generación de un intermedio éster de tiol de alta energía por un proceso dependiente de ATP (Obrist et al., 2015). Después, se transfiere dicha ubiquitina activada a una enzima de conjugación denominada E2 formando otro éster de tiol de alta energía

(Obrist et al., 2015). Y por último, se une la ubiquitina a la proteína diana mediante una ligasa denominada E3, específica de diana (Tundo et al., 2020). Una vez marcada la proteína a degradar es dirigida al proteasoma 26S para ser eliminada.

El proteasoma 26S está formado por dos subunidades regulatorias o tapas denominadas 19S y por una subunidad central conocida como 20S (**Figura 1.14**) (Gandolfi et al., 2017; Obrist et al., 2015). Las subunidades 19S presentan forma de anillo y se encargan del reconocimiento de las proteínas poliubiquitinadas produciendo su desplegamiento mediante el paso de ATP a ADP y la eliminación de poliubiquitinas gracias a la acción de enzimas deubiquitinadas (Tundo et al., 2020). La subunidad 20S es un poro cilíndrico compuesto por 4 anillos (2 α y 2 β) compuestos cada uno de 7 subunidades. Las subunidades β 1, β 2 y β 5 tienen actividad enzimática similar a caspasa, tripsina y quimiotripsina respectivamente (Gandolfi et al., 2017). La unidad 20S es la responsable de mediar la escisión catalítica de las proteínas marcadas con poliubiquitina, que han sido desplegadas por las subunidades 19S (Gandolfi et al., 2017; Tundo et al., 2020).

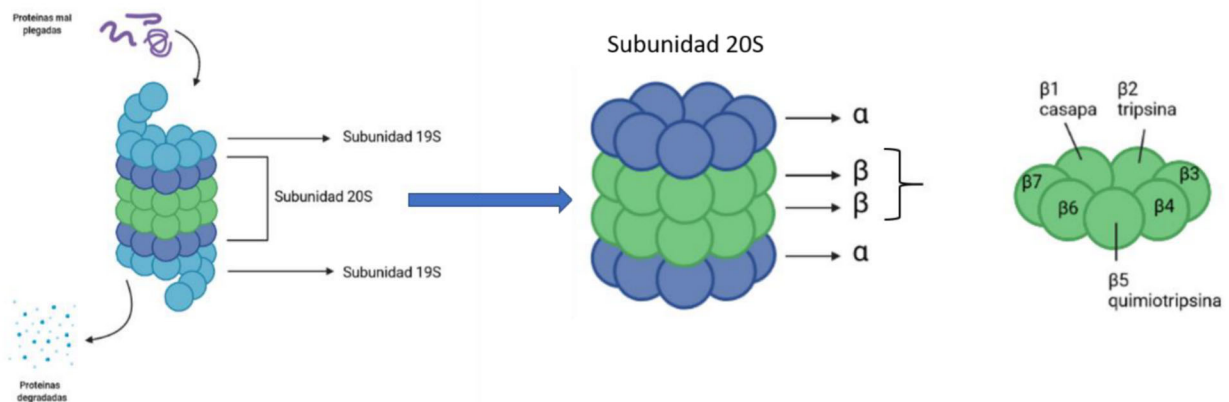


Figura 1.14. Estructura proteasoma 26S. El proteasoma 26S está formado por 2 subunidades 19S en forma de anillo y una subunidad 20S cilíndrica. A su vez, la subunidad 20S está compuesta por 2 subunidades α y 2 β siendo estas últimas las que poseen las actividades de caspasa (β 1), tripsina (β 2) y quimiotripsina (β 5).

Recientemente, ha surgido la posibilidad de considerar como “*Hallmark*” del cáncer la resistencia al desequilibrio de la proteostasis por la probabilidad de que está característica adquirida coopere con otros mecanismos alterados para promover la supervivencia, proliferación y migración de las células tumorales (Deshaies, 2014). Algunas de las alteraciones genéticas que se producen en el mieloma múltiple pueden suprimir o sobreactivar la actividad del proteasoma, y por tanto conducir a una

Hasta la fecha de hoy se han aprobado 3 inhibidores de proteasoma para la clínica en el tratamiento de pacientes de mieloma múltiple. El primero fue bortezomib, seguido

de carfilzomib y, por último, y solo en los casos de trasplante con mieloma refractario, ixazomib (**Figura 1.16**) (Teicher & Tomaszewski, 2015).

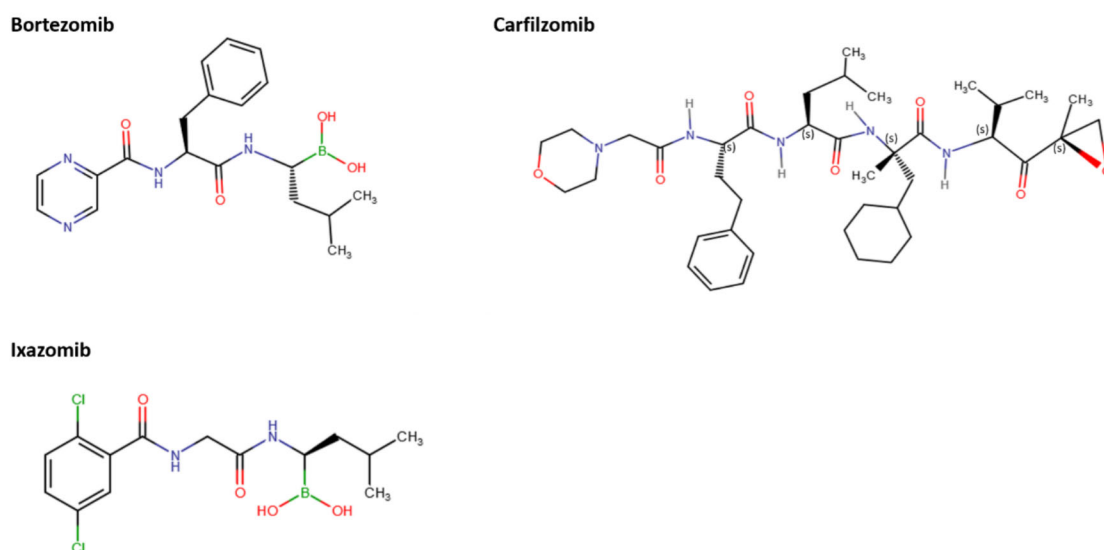


Figura 1.16. Estructura química de los inhibidores de proteasoma utilizados en el tratamiento de mieloma múltiple. Podemos observar las diferencias estructurales de los inhibidores del proteasomas (IPs) que se emplean. Bortezomib fue el primero que se aprobó por la FDA; está formado por un dipéptido que contiene fenilalanina y leucina con un ácido bórico en lugar de un ácido carboxílico y con una fracción de ácido pirazinoico para proteger el extremo N-terminal y se une de manera reversible al proteasoma. Después, se generó carfilzomib, este IP se une de manera irreversible y está compuesto por un tetrapéptido con un grupo epoxicetona terminal. Y, por último, el objeto de estudio de esta tesis, ixazomib, es un IP aprobado en 2015 administrado como profármaco junto al ácido bórico protegido por citrato, en la imagen se muestra la forma activa del compuesto tras la hidrólisis del citrato. Las estructuras han sido realizadas en la página comercial de © Fisher Scientific (Fisher Scientific, 2020).

1.4.5.3.1 Bortezomib.

Bortezomib fue el primer inhibidor de proteasoma aprobado por la FDA para el tratamiento del MM (Chen et al., 2011; Leleu et al., 2019; Muz et al., 2016; Obrist et al., 2015). Se trata de un dipéptido que contiene fenilalanina y leucina con un ácido bórico en lugar de un ácido carboxílico y con una fracción de ácido pirazinoico para proteger el extremo N-Terminal (**Figura 1.16**) (Chen et al., 2011). Este inhibidor de proteasoma de primera generación se une de manera reversible a la subunidad $\beta 5$ de actividad quimiotripsina, aunque también se ha observado que se une a la subunidad $\beta 1$ tipo caspasa y $\beta 2$ con actividad tripsina del proteasoma 26S (Besse et al., 2019; Obrist et al., 2015).

Bortezomib induce toxicidad en las células tumorales a través de diferentes mecanismos como la inhibición de la vía NF- κ B, estabilización de la ruta p53 derivando en la apoptosis por el aumento de los factores BAX y NOXA, y por modulación de los niveles de ciclinas (CDKs) (**Figura 1.15**) (Obrist et al., 2015; Tundo et al., 2020; Yang

et al., 2008). También es capaz de inhibir la angiogénesis tumoral al reducir el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), ya que se ha visto que está relacionado con la inhibición de NF- κ B (Hideshima et al., 2003).

Debido a la plasticidad génica del MM se producen resistencias a bortezomib por lo que no es suficiente como tratamiento único (Muz et al., 2016). Dichas resistencias pueden producirse de manera innata o adquirida mediante la alteración o activación constitutiva de la señalización del receptor NF- κ B o del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), bloqueo de la apoptosis intrínseca, aumentando la expresión de transportadores de fármacos o mutaciones en la subunidad β 5 del proteasoma 20S entre otras situaciones (Obrist et al., 2015). Todo esto impulsó el generar nuevos inhibidores de proteasoma conocidos como segunda generación con diferente perfil farmacológico como epoxiketonas (carfilzomib y oprozomib), péptidos con boro (ixazomib y delazomib) o inhibidores no peptídicos como el marizomib (Tundo et al., 2020).

1.4.5.3.2 Carfilzomib.

Los inhibidores de proteasoma de segunda generación de epoxiketona se caracterizan, en general, por un péptido corto y una ojiva electrofílica dual α,β -epoxiketona terminal, la cual determina su actividad (Concannon et al., 2007; Schrader et al., 2016). El inhibidor de proteasoma más representativo de este grupo es carfilzomib.

Carfilzomib o PR-171 es un inhibidor de proteasoma irreversible de segunda generación compuesto por un tetrapéptido con un grupo epoxiketona terminal, muy específico de la actividad quimiotripsina (subunidad β 5) del proteasoma 26S (**Figura 1.16**) (Besse et al., 2019; Obrist et al., 2015; Parlati et al., 2009). Su capacidad de inhibición del inmunoproteasoma es lo que facilita su uso como monoterapia en pacientes con neoplasias hematológicas como el mieloma múltiple (Zhang et al., 2013). Concretamente está aprobado para el tratamiento de MM en pacientes que han pasado por al menos dos tratamientos previos que incluyan bortezomib y un agente inmunomodulador (Leleu et al., 2019).

Este inhibidor de proteasoma presenta una vida media corta en el organismo y no tiene diferencias significativas en pacientes con insuficiencia renales o sin ellas (Badros et al., 2013), ya que un síntoma derivado del MM es la insuficiencia renal. También está relacionado con una menor incidencia de neuropatías periféricas. Por otra parte, se suministra en combinación con algún inmunomodulador como lenalidomida o

dexametasona lo que produce una respuesta rápida y de duración larga en los pacientes (Obrist et al., 2015).

1.4.5.3.3 Ixazomib.

Ixazomib pertenece a los inhibidores de proteasoma de segunda generación cuya forma inactiva consta de un núcleo dipéptido de alanina-leucina con ácido bórico protegido con citrato (Muz et al., 2016). Se trata del primer inhibidor de proteasoma que se suministra por vía oral su forma inactiva (Gupta et al., 2019). Este IP está aprobado por la FDA en 2015.

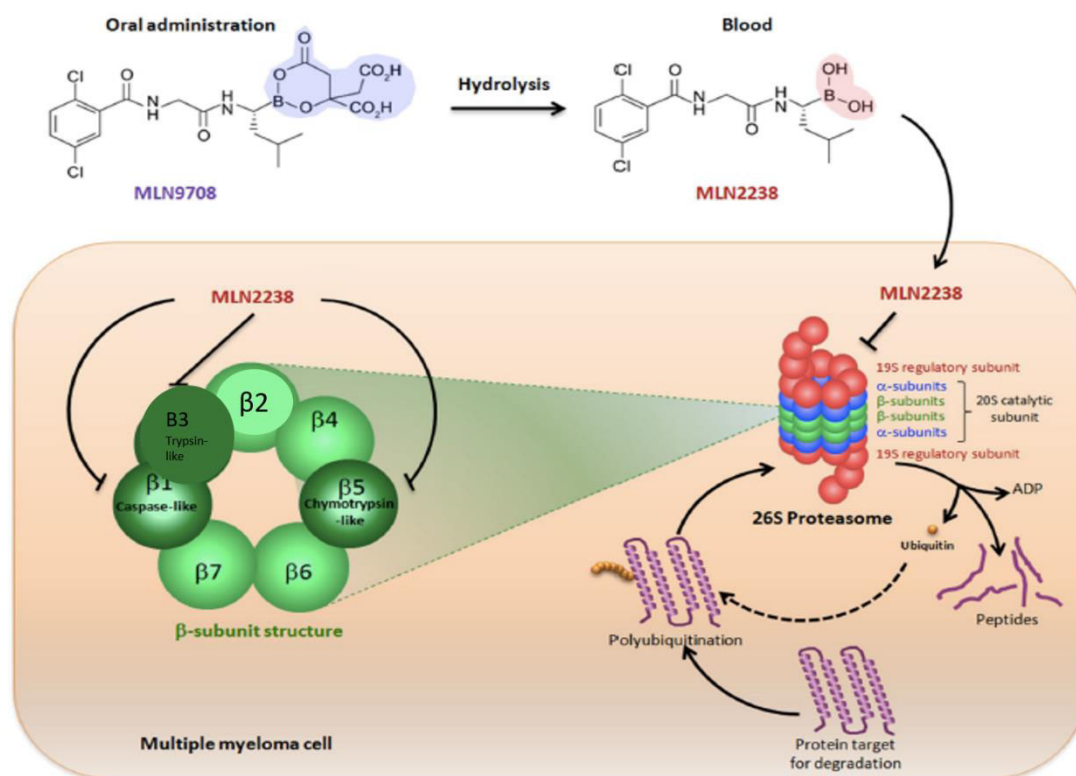


Figura 1.17. Mecanismo de acción de ixazomib. El compuesto suministrado oralmente MLN9708 se hidroliza a su compuesto MLN2238 (ixazomib) el cual se une de manera reversible a la subunidad catalítica 20S del proteasoma e inhibe las subunidades β1, β3 y β5 impidiendo así su actividad caspasa, tripsina y quimiotripsina respectivamente. Por tanto, se inhibe la actividad del proteasoma 26S ocasionando la acumulación de proteínas poliubiquitinadas y activando la muerte celular por estrés oxidativo. Imagen modificada de Muz *et al.* 2016.

La forma citrato de ixazomib se hidroliza a su forma biológica activa ixazomib (Figura 1.17) (Offidani et al., 2014). Este inhibidor selectivo y reversible del proteasoma 20S, inhibe concretamente la subunidad β5 y por lo tanto, la actividad quimiotripsina (Muz et al., 2016). A concentraciones más elevadas las subunidades β1 y β2, con actividad caspasa y tripsina respectivamente, también resultan inhibidas (Besse et al.,

2019; Kupperman et al., 2010). Este inhibidor tiene una selectividad de inhibición similar al inhibidor bortezomib pero presenta una vida media de disociación seis veces más rápida que bortezomib, de manera que se mejora la distribución tisular (Al-Salama et al., 2017).

En estudios previos, ixazomib ha sido capaz de inducir apoptosis en varias líneas de MM humanas *in vitro* demostrando que su citotoxicidad depende de la dosis (Muz et al., 2016). Su efecto citotóxico se ve potenciado cuando se suministra en combinación con lenalidomida y dexametasona para pacientes con MM refractorio o recaída que han recibido previamente de una a tres terapias (Moreau et al., 2019). Como todo fármaco, ixazomib presenta algún efecto secundario como conjuntivitis, visión borrosa, ojos secos, erupción maculopapular y macular y alguna neuropatía periférica (Al-Salama et al., 2017).

Ixazomib es capaz de alterar la interacción de las células tumorales con el microambiente de la médula ósea, lo cual implica una disminución de angiogénesis y de lesiones osteolíticas (Chauhan, Tian, Zou, et al., 2011). Al inhibir la vía NF- κ B de las células estromales del mieloma se reduce la liberación de citoquinas necesarias para el crecimiento y supervivencia de estas, de manera que se alteran los efectos citoprotectores del microambiente inhibiendo la proliferación de las células tumorales (Muz et al., 2016).

En la **Tabla 1.5** se recoge un resumen de los tres inhibidores de proteasoma comentados anteriormente.

Tabla 1.5. Comparación inhibidores de proteasoma aprobados para el uso clínico. En la tabla se recogen las diferencias entre bortezomib, carfilzomib e ixazomib tanto en característica de estructura química, mecanismos de acción, forma de administración y para que estadio de mieloma múltiple, si se debe suministrar un profármaco como en el caso de ixazomib (el compuesto MLN9708 que se hidroliza a MLN2378) como el año en que han sido aprobados por la FDA.

Nombre genérico	Bortezomib	Carfilzomib	Ixazomib
Creador	Millennium Pharmaceuticals	Onyx Pharmaceuticals	Takeda Oncology
Clase estructural	Boronato	Epoxicetona	Boronato
Mecanismo de Inhibición	Inhibe $\beta 1$ (actividad caspasa), $\beta 3$ (actividad tripsina) pero tiene preferencia por $\beta 5$ (actividad quimiotripsina)	Inhibe $\beta 1$ (actividad caspasa), $\beta 3$ (actividad tripsina) pero tiene preferencia por $\beta 5$ (actividad quimiotripsina)	Inhibe $\beta 1$ (actividad caspasa), $\beta 3$ (actividad tripsina) pero tiene preferencia por $\beta 5$ (actividad quimiotripsina)
Disociación del proteasoma	Reversible lentamente (110 min) de la subunidad $\beta 5$	Irreversible	Reversible (18 min) de la subunidad $\beta 5$
Administración	Intravenosa o Subcutánea	Intravenosa	Oral
Tratamiento indicado	Primera línea o en mieloma refractorio o recaída	Mieloma refractorio o recaída	Mieloma refractorio o recaída
Profármaco	No	No	Si
Incidencia de neuropatía periférica	Alta	Moderada	Baja
Año aprobado por FDA	2003	2012	2015

1.4.5.4 Anticuerpos Monoclonales (mAbs).

En el tratamiento del mieloma múltiple destaca el uso de anticuerpos monoclonales, los cuales se unen a antígenos específicos de la superficie celular e inducen la muerte por citotoxicidad dependiente de anticuerpos, del complemento (CDC) y fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP) (Pinto et al., 2020; K. Zhang et al., 2017). La mayoría de mAbs empleados están vinculados a la muerte celular mediada por el receptor Fc gamma (FCyR) de anticuerpos unidos a las células tumorales y la actividad enzimática del antígeno diana (Krejcik et al., 2016).

Los principales mAbs que se han aprobado y se utilizan en la clínica del mieloma múltiple son:

- **Daratumumab:** actúa frente al marcador de superficie celular CD38 expresado en las células de MM, e induce citotoxicidad mediada por diferentes mecanismos produciendo la lisis de las células tumorales (Zhang et al., 2017). La respuesta por parte del paciente a este tratamiento depende de los niveles de expresión de CD38 por parte del tumor (Krejcik et al., 2016).
- **Isatuximab:** se une selectivamente a CD38 e induce apoptosis (Kumar, Rajkumar, et al., 2017). En estudios clínicos se ha observado que su combinación con pomalidomina es eficaz en pacientes refractarios y en recaída, y además si se combina con bortezomib y lenalidomida puede ser un buen tratamiento de primera línea (Pinto et al., 2020).
- **Elotuzumab:** está dirigido contra la glicoproteína número 7 de la familia de moléculas de activación de la señal linfocítica (SLAMF7) (Zhang et al., 2017). Promueve la muerte celular gracias a la acción de las células NK y reduciendo la unión de las células tumorales al estroma (Tai et al., 2016).

1.4.5.5 Inhibidores de Histona Deacetilasas (iHDACs).

En la clínica se conocen dos iHDACs que se emplean actualmente (Cejalvo & Rubia, 2017). En primer lugar, se encuentra panobinostat. Se trata de un fármaco que promueve la activación de genes supresores de tumores que están silenciados por una hiperacetilación de histonas y desencadena la activación de la apoptosis (Tundo et al., 2020). Normalmente se combina con IP e IMiD para el tratamiento de MM refractario y en recaída (Abramson, 2018).

Y, por otro lado, está vorinostat el cual se encuentra todavía en estudio para el tratamiento de pacientes de MM refractario o en recaída, en combinación con IPs e IMiDs (Abramson, 2018).

1.4.5.6 Trasplante autólogo de células hematopoyéticas o ASCT (Autologous Stem Cells Transplantation).

El tratamiento empleado durante décadas ha sido la combinación de melfalán con prednisona, el cual comenzó a administrarse desde 1960, aumentando la media de supervivencia de hasta cuatro años (G. Costa et al., 1973). Años después, se aprobó y comenzó a realizarse el trasplante autólogo de células hematopoyéticas o ASCT, el cual se reserva para pacientes jóvenes y con buen pronóstico (Paquin et al., 2020). En el caso de pacientes mayores de 70 años, el ASCT es una terapia segura, eficaz y duradera pero se debe seleccionar debidamente los pacientes que tienen mayor probabilidad de presentar resultados similares a pacientes más jóvenes (Lemieux et al., 2020; Vaxman et al., 2020).

El ASCT es una estrategia que se asocia con mejores tasas de respuesta, de supervivencia libre de progresión y de supervivencia global comparada con la quimioterapia. La supervivencia global a 5 años es del 71% y la supervivencia libre de progresión a 8 años de un 40% (Jaramillo et al., 2018).

A pesar de que se trata de una buena opción de tratamiento se ha visto que la mayoría de pacientes han recaído, por lo que además de un ASCT se debe proporcionar al paciente una terapia de mantenimiento (Paquin et al., 2020).

1.4.5.7 Inhibidores selectivos de exportación nuclear (ISEN): SELINEXOR.

Las células malignas adquieren la capacidad de exportar proteínas nucleares que favorecen la formación de tumores o la regulación del ciclo celular de manera positiva al citoplasma (Etchin et al., 2013). Una proteína implicada en este transporte es la proteína de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) o exportina 1 (XPO1). Existen diferentes inhibidores de XPO1 como leptomicina B, ratjadona, anguimicina, KOS-2464, CBS910611-17 entre otros, que se unen a un residuo cisteína del surco activo de unión a proteínas (Azmi et al., 2021). El más importante para el tratamiento de mieloma múltiple es el selinexor.

Selinexor es un inhibidor selectivo de XPO1 aprobado en 2019 por la FDA para su uso en mieloma múltiple refractario en combinación con bortezomib y dexametasona y para pacientes adultos que ya hayan recibido al menos un tratamiento (Abramson,

2018). Este fármaco se administra por vía oral y se une de manera reversible al residuo cisteína del surco de exportación de proteínas de XPO1 impidiendo el transporte de oncoproteínas (MYC, BCL-6 y Ciclina D1) del núcleo al citoplasma (Gavriatopoulou et al., 2020).

Se ha demostrado que esta terapia es más tóxica en células cancerígenas que en células normales por lo que es una buena opción de tratamiento ante recidivas (Etchin et al., 2013).

1.4.6 Nuevas perspectivas en el tratamiento del mieloma múltiple.

El mieloma múltiple desarrolla resistencia ante los fármacos empleados para su tratamiento, por lo que se están investigando nuevas vías de acción contra esta enfermedad centradas en la inhibición de la vía autofágica o de las proteínas anti-apoptóticas.

1.4.6.1 Cloroquina.

La cloroquina (**Figura 1.18**) es un fármaco de la familia 4-aminoquinolinas que además de usarse como tratamiento de la malaria y en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide puede afectar al proteasoma a concentraciones elevadas (Janku et al., 2011). Concretamente inhibiendo la acción quimiotripsina de la subunidad 20S del proteasoma de manera independiente al cobre (Mao et al., 2009). También, aunque de manera ocasional, al ser una amina lisosomotrópica puede inhibir el procesamiento y presentación de antígenos del MHC clase II a las células T CD4⁺ (Hsiao et al., 2002).

En general, la cloroquina actúa sobre el lisosoma impidiendo la acidificación de este orgánulo e inhibiendo su fusión con el autofagosoma y, por tanto, impidiendo un correcto funcionamiento de la autofagia (Cufí et al., 2013). Al aumentar el pH del lisosoma y no degradarse el contenido del autofagosoma, se produce un aumento de LC3II cuantificable mediante técnicas de *Western Blot* (Zhang et al., 2016).

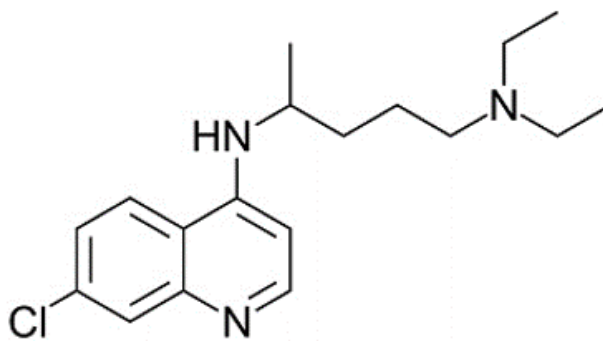


Figura 1.18. Estructura molecular del fármaco cloroquina. La cloroquina es un fármaco perteneciente a la familia 4-aminoquinolinas que se emplea principalmente en la prevención de la malaria.

En estudios previos se ha demostrado que la cloroquina aumenta su eficacia en combinación con otros fármacos anticancerígenos e incluso se propone su combinación con inhibidores de proteasoma (Janku et al., 2011). Hasta la fecha hay diferentes ensayos clínicos en los que se emplea este fármaco como única base terapéutica o en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de algún cáncer como puede ser de mama, vejiga, de pulmón de células pequeñas (SCLC) o páncreas (Cufi et al., 2013; National Library of Medicine, 2019). Además, existe un análogo de la cloroquina, el clioquinol, que es capaz de inducir autofagia de manera citotóxica al modificar la regulación de la vía mTOR en células de mieloma múltiple y en leucemias (Cao et al., 2014; Mao et al., 2009). Por tanto, el uso de cloroquina en el tratamiento del mieloma múltiple podría ser una nueva perspectiva.

1.4.6.2 Miméticos BH3.

La familia de proteínas BCL-2 tienen un papel importante a la hora de desencadenar o frenar la apoptosis celular como hemos visto en la **sección 1.2.2**. Debido a ello, se han desarrollado pequeñas moléculas similares a las proteínas BH3-*only* capaces de unirse a las proteínas anti-apoptóticas e inhibirlas para activar la apoptosis. Dichas moléculas se denominan miméticos BH3, y se caracterizan por poseer un alto peso molecular relativo, ser lipófilas y presentar complejidad química (Merino et al., 2018). Estas moléculas se unen con una alta afinidad a los surcos hidrofóbicos en la interacción con las proteínas de la familia BCL-2 (**Figura 1.19**) (Radha & Raghavan, 2017).

Hasta la fecha, se han desarrollado 5 miméticos BH3 para su posible uso clínico en el tratamiento de enfermedades hematológicas, entre ellas el mieloma múltiple. El

primero en desarrollarse fue ABT-737 dirigido contra las proteínas BCL-2, BCL-X_L y BCL-W, seguido del mimético ABT-263 (navitoclax) cuyo perfil de inhibición es igual al de ABT-737 pero con propiedades farmacológicas mejoradas (Billard, 2013). A continuación, se aprovecharon las diferencias estructurales entre las proteínas BCL-2 y BCL-X_L para el desarrollo de miméticos más específicos como ABT-199 o venetoclax que inhibe sólo a BCL-2 o miméticos BH3 contra BCL-X_L como A-1155463, A-1331852 y WEHI-539 (Tao et al., 2014). En el caso de la inhibición de la proteína MCL-1, el desarrollo de miméticos específicos y viables ha sido más lento, pero en los últimos años ha avanzado hasta conseguir la producción de miméticos que están en ensayos clínicos (Xiang et al., 2018). Entre ellos destaca S63845, seguido de un compuesto relacionado denominado S64315/MIK665, y de los compuestos AMG176 y AZD991 (Adams & Cory, 2018).

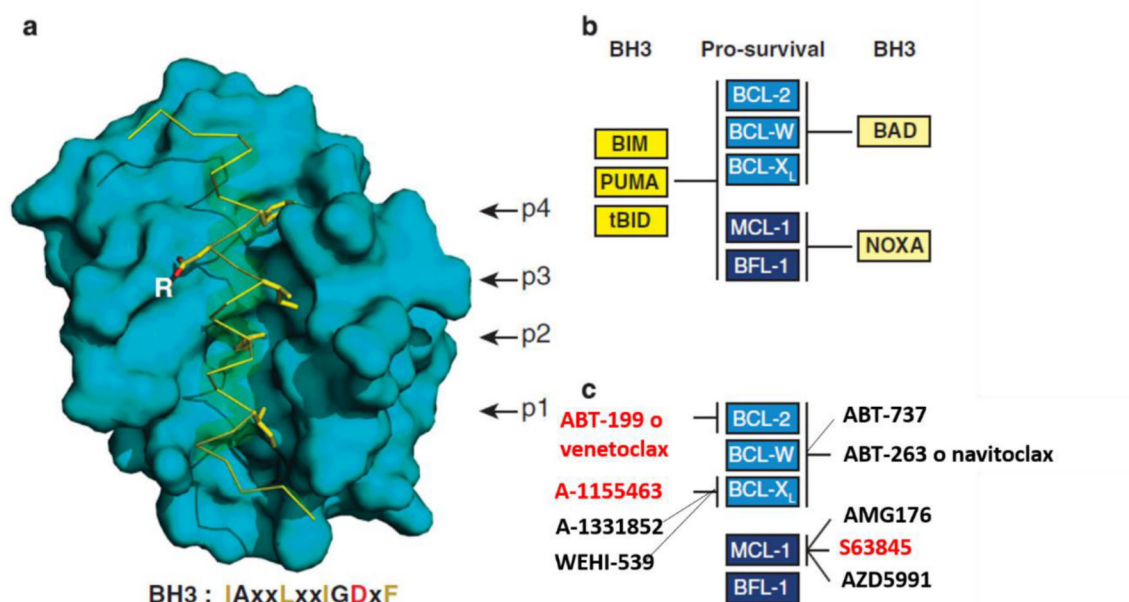


Figura 1.19. Interacción de los miembros de la familia BCL-2. (A) Estructura de BCL-X_L representada en azul interaccionando con el péptido anfipático helicoidal de BIM (estructura en amarillo). Debajo de la proteína está la secuencia consenso del dominio BH3 de las proteínas pro-apoptóticas (x denota los residuos no conservados). Los cuatro aminoácidos hidrofóbicos clave están en amarillo en la secuencia y también está resaltado en rojo el ácido aspártico invariable. (B) Asociación selectiva de proteínas pro-apoptóticas BH3-only con las proteínas anti-apoptóticas. (C) Proteínas anti-apoptóticas diana de los miméticos BH3. Resaltado en rojo los miméticos BH3 empleados en el desarrollo de esta tesis y de los cuales se habla en más profundidad en los siguientes apartados. Imagen modificada de Adams & Cory, 2018.

1.4.6.2.1 Mimético BH3: ABT-199 o venetoclax.

ABT-199 o venetoclax (Figura 1.20) fue el primer mimético BH3 específico de BCL-2 que se desarrolló por AbbVie, Genetech y The Walter and Eliza Hall Institute

(Merino et al., 2018). Tras los efectos secundarios derivados de la inhibición de ambas proteínas BCL-2 y BCL-X_L por parte de ABT-263 provocó que se rediseñara para dar lugar al mimético ABT-199 (Radha & Raghavan, 2017). Concretamente para evitar la trombocitopenia causada al inhibir BCL-X_L cuya función es proteger a las plaquetas de la apoptosis (Billard, 2013; Z. Li et al., 2019).

Este mimético, que se suministra por vía oral, está aprobado desde 2016 e incluido en varios ensayos clínicos como monoterapia para varios cánceres hematológicos, entre ellos el MM (Cang et al., 2015). A diferencia de navitoclax (ABT-263), ABT-199 es capaz de unirse a BCL-2 con una afinidad subnanomolar (Radha & Raghavan, 2017). Este inhibidor presenta actividad citotóxica contra una alta variedad de líneas celulares e inhibe el crecimiento de manera dependiente de la dosis en tumores hematológicos (Cang et al., 2015).

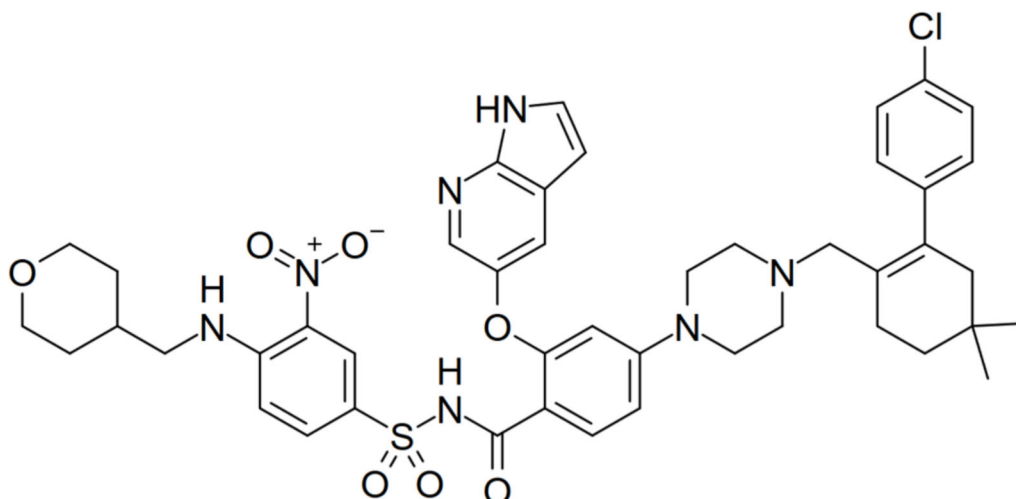


Figura 1.20. Estructura molecular de ABT-199 o venetoclax. El ABT-199 o venetoclax es un mimético BH3 que inhibe la acción de la proteína BCL-2.

En estudios clínicos recientes, se ha visto que aquellos pacientes de MM con t(11;14) que se caracterizan por una baja expresión de BCL-X_L y MCL-1, y una alta expresión de BCL-2, la monoterapia con ABT-199 puede ser clave como tratamiento (Kumar et al., 2019; Touzeau et al., 2018). Además, se cree que es posible que los pacientes que no responden a una monoterapia con ABT-199 pueden beneficiarse de una terapia basada en la combinación de dicho mimético BH3 con otros fármacos para mejorar la intensidad y duración de la respuesta (Perini et al., 2018).

Existen resistencias a venetoclax basadas principalmente en el perfil de expresión de las proteínas de la familia BCL-2. Una mayor expresión de BCL-X_L favorece la resistencia celular a este fármaco, al igual que una alta expresión de MCL-1 (Gomez-Bougie et al., 2018), en cambio la delección 17p no afecta a la sensibilidad de ABT-199 como en el caso de otros fármacos (Cang et al., 2015). También se ha descrito otro mecanismo de resistencia a ABT-199, una mutación adquirida en BAX la cual resulta en una forma truncada de la proteína (Touzeau et al., 2018).

Ante la existencia de resistencias, se han probado combinaciones previas de ABT-199 con bortezomib y dexametasona. Se ha visto que dicha combinación tiene resultados prometedores en pacientes con 1 a 3 tratamientos previos y no refractarios a bortezomib (Touzeau et al., 2018).

Los efectos secundarios más comunes derivados del tratamiento con venetoclax son neutropenia y síntomas gastrointestinales con náuseas y diarreas (Kumar, Kaufman, et al., 2017).

1.4.6.2.2 Mimético BH3: A-1155463.

A-1155463 (**Figura 1.21**) es un inhibidor de BCL-X_L muy selectivo y eficaz, diseñado basándose en la estructura de BCL-X_L y su interacción con fragmentos generados por resonancia magnética nuclear (RMN) (Tao et al., 2014). En estudios previos, este inhibidor muestra como efecto secundario trombocitopenia, pero a diferencia del ocasionado con ABT-737 esta es reversible; y, además reduce los efectos inmunosupresores ocasionados al inhibir dualmente BCL-2 y BCL-X_L con navitoclax (ABT-263) (Tao et al., 2014).

La estructura de A-1155463 carece del enlace hidrazona lábil del compuesto de partida WEHI-539 y presenta un átomo de flúor el cual aumenta la actividad citotóxica. Además, interacciona con las cadenas laterales del bolsillo hidrófobo P4 de BCL-X_L creando fuerzas de Van der Waals y ocasionando una alta afinidad (Tao et al., 2014). Este inhibidor induce apoptosis al provocar la liberación de citocromo C, la activación de caspasas y acumulación de contenido de DNA en la fase G0-G1 en células dependientes de BCL-X_L, pero en ausencia de BAK y BAX no presenta toxicidad (Shoemaker et al., 2008; Souers et al., 2013). Por otra parte, la combinación de A-1155463 con ABT-199 permite separar la acción de navitoclax (ABT-263) además de presentar sinergia

potenciando la toxicidad en las células codependientes de BCL-2/BCL-X_L (Leverson et al., 2015).

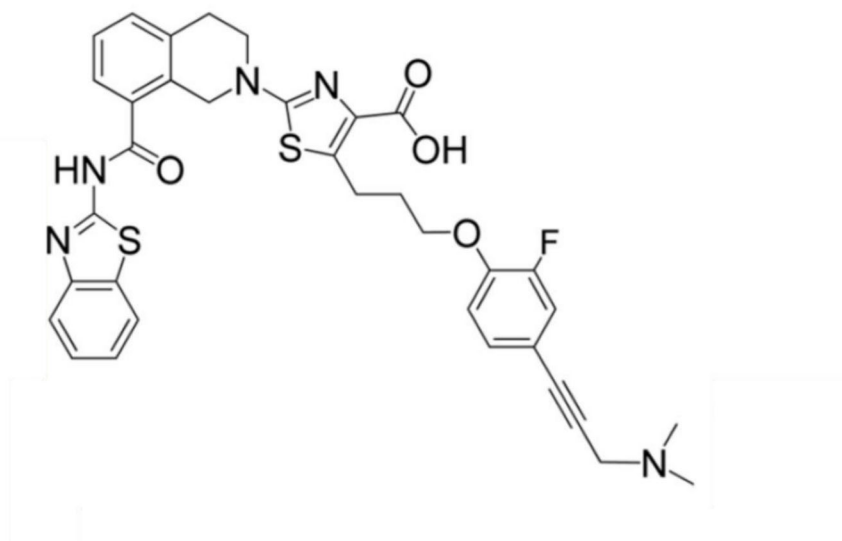


Figura 1.21. Estructura molecular de A-1155463. El A-1155463 es un mimético BH₃ que inhibe la acción de la proteína BCL-X_L. Imagen modificada de Tao *et al.* 2014.

En un estudio anterior, se ha visto que A-1155463 agota las células eritroides, las células madre inmaduras y las células progenitoras después de un tratamiento prolongado (Afreen et al., 2020).

1.4.6.2.3 Mimético BH₃: S63845.

S63845 (**Figura 1.22**) es una molécula pequeña selectiva que se une a MCL-1 con alta afinidad y provoca la muerte celular por activación de BAX-BAK en las células dependientes de MCL-1 de manera *in vitro* e *in vivo* (Letai, 2016). Este mimético induce rápidamente la exposición de fosfatidil-serina dependiente de caspasas, la escisión de la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP) y la liberación de citocromo C de las mitocondrias, todos ellos indicadores de apoptosis, al impedir la unión de MCL-1 con las proteínas pro-apoptóticas BAX-BAK, pero no afecta a las interacciones de BCL-X_L o BCL-2 con dichas proteínas pro-apoptóticas (Xiang et al., 2018). S63845 se une a MCL-1 por el surco del bolsillo hidrofóbico P4 de MCL-1, concretamente interactúa con cuatro residuos hidrofóbicos conservados en la hélice α BH3 de los miembros de la familia BCL-2, es decir, el resto carboxilato interactúa con Arg263 (Kotschy et al., 2016).

En la actualidad se sabe que múltiples líneas de MM dependen principalmente de MCL-1 para la supervivencia celular (Kotschy et al., 2016). Se ha demostrado que el

tratamiento con S63845 es efectivo no sólo en células con la alteración t(11;14) sino que también en las líneas que presentan traslocaciones cromosómicas de mal pronóstico como t(4;14) o mutaciones en p53 (Lazareth et al., 2015).

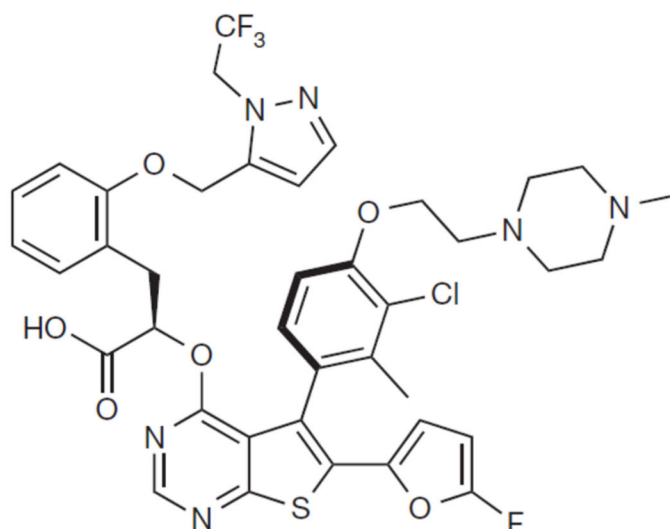


Figura 1.22. Estructura molecular de S63845. El S63845 es un mimético BH3 que inhibe la acción de la proteína MCL-1. Imagen modificada de Kotschy *et al.* 2016.

En modelos de ratones modificados genéticamente para eliminar MCL-1 se observó toxicidad mortal en médula ósea y miocardio, en cambio la inhibición de MCL-1 mediante este mimético no causa una alta toxicidad (Letai, 2016). Este hecho se cree que es ocasionado al eliminar por completo el gen por lo que causa la pérdida del resto de funciones de MCL-1 que van más allá de la apoptosis inducida cuando se trata del uso en monoterapia.

El mimético S63845 tiene actividad antitumoral como monoterapia en diferentes enfermedades hematológicas y tumores sólidos, siempre y cuando sean dependientes de MCL-1 (Xiang et al., 2018). Para aquellos que no es suficiente con la monoterapia, se ha observado que con una combinación con inhibidores de quinasas oncogénicas se potencia su acción (Cragg et al., 2009).



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 ANTECEDENTES.

El mieloma múltiple (MM) comprende el 10% de las neoplasias hematológicas y se caracteriza por la proliferación descontrolada de células B plasmáticas en la médula ósea (Kyle & Rajkumar, 2008). Esta enfermedad posee una alta tasa de inestabilidad génica que facilita la generación de resistencias, complicando encontrar un tratamiento eficaz y manteniendo así esta enfermedad como incurable (Manier et al., 2017).

Durante las últimas décadas se ha avanzado en los tratamientos disponibles empleando fármacos alquilantes, inmunomoduladores (iMIDs), inhibidores de proteasoma (IPs), anticuerpos, trasplante autólogo de células madres (ASCT), entre otros.

2.1.1 Mieloma múltiple e inhibidores de proteasoma (IPs).

El tratamiento principal en tumores hematopoyéticos es la quimioterapia que genera efectos secundarios no deseados, resistencias y recaídas frecuentes en un porcentaje significativo de los pacientes. Hasta hace poco se empleaba como tratamiento de primera línea para el mieloma la combinación del alquilante melfalán con el corticoide prednisona, y en pacientes jóvenes y con buen pronóstico el trasplante de células madre autólogas (ASCT) (G. Costa et al., 1973; Kyle & Rajkumar, 2008). Posteriormente se desarrollaron inhibidores de proteasoma (IP) con la finalidad de frenar el crecimiento, metástasis y angiogénesis tumoral tanto en tumores sólidos como en tumores hematológicos, puesto que las células cancerígenas presentan una mayor actividad del proteasoma (Caravita et al., 2006).

El primer inhibidor del proteasoma que se usó en clínica fue bortezomib. Este inhibidor de proteasoma reversible se aprobó en 2003 para su uso, sólo o en combinación con los agentes anteriores, en el tratamiento de MM de nuevo diagnóstico y de recaída que hayan tenido una o dos líneas de tratamiento previas (Caravita et al., 2006; Chen et al., 2011). Aunque este fármaco ha contribuido de manera significativa en el tratamiento del MM, también ocasiona efectos secundarios tóxicos como neuropatías y resistencias asociadas a mutaciones en la subunidad $\beta 5$ del proteasoma (Ri et al., 2010).

Ante las resistencias generadas se desarrollaron nuevos fármacos inmunomoduladores (iMIDs) e IPs de segunda generación. Entre estos últimos se encuentra el inhibidor de proteasoma denominado carfilzomib. A pesar de que el mecanismo de inhibición es el mismo que bortezomib, carfilzomib se une de manera irreversible a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma (Kuhn et al., 2007). Este inhibidor se aprobó

por la FDA en 2012 como tratamiento único para pacientes de MM refractario que han recibido al menos dos líneas de terapia anterior (Manasanch & Orłowski, 2017). A pesar de ser más efectivo que bortezomib, el uso de este fármaco puede desembocar en efectos secundarios no deseados, aunque en menor medida que bortezomib (Manasanch & Orłowski, 2017). En nuestro grupo se ha estudiado el mecanismo de apoptosis y autofagia inducidos por carfilzomib y se ha propuesto la combinación con cloroquina como posible estrategia para mejorar su eficacia. En modelos de xenoinjerto *in vivo* se vio que la combinación de bajas dosis de carfilzomib con cloroquina inhibe el crecimiento del tumor e incluso lo disminuye, a diferencia del efecto que consiguen los fármacos por individual que solo retrasan el crecimiento tumoral (Jarauta et al., 2016).

Por último, se aprobó en 2015 el uso en la clínica del inhibidor de proteasoma ixazomib en combinación con lenalidomida y dexametasona en pacientes de MM de nuevo diagnóstico y en pacientes que han recibido al menos una terapia anterior (Cottini & Anderson, 2015). Se trata del primer IP que se administra por vía oral, reversible (al igual que bortezomib) y que comparte diana molecular con bortezomib y carfilzomib (Muz et al., 2016). Este fármaco no presenta efectos secundarios neuropáticos, y desencadena apoptosis en diferentes células aunque se desconoce el mecanismo celular exacto, así como si provoca autofagia en las células (Augello et al., 2018; Zhang et al., 2017).

En el desarrollo de esta tesis uno de los objetivos principales ha sido elucidar dicho mecanismo molecular por el que ixazomib provoca la muerte por apoptosis en células de mieloma múltiple.

2.1.2 Enfermedades hematológicas y miméticos BH3.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores importantes de la apoptosis, y sus interacciones entre los miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos pueden determinar el destino celular (Touzeau, Maciag, Amiot, & Moreau, 2018). En diferentes ocasiones se ha hipotetizado que los tumores hematológicos son capaces de resistir a fármacos mediante la alteración de proteínas de la familia BCL-2, dando a entender que dichas proteínas juegan un papel importante para la supervivencia del tumor (Gomez-Bougie et al., 2018; Kale et al., 2018; Perini et al., 2018; Siddiqui et al., 2015). El mieloma múltiple se caracteriza por la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas para favorecer la supervivencia tumoral (Gong et al., 2016; Khan & Kahl, 2018; Touzeau et al., 2018).

Al ser una posible diana para el tratamiento de tumores, se han generado unas pequeñas moléculas que mimetizan la acción de las proteínas BH3-*only* de la familia BCL-2 mediante la unión a las proteínas anti-apoptóticas (Billard, 2013; Elkholi et al., 2011; Kale et al., 2018; Singh et al., 2019). El primer mimético BH3 que se desarrolló fue ABT-737 que está dirigido contra las proteínas BCL-2, BCL-X_L y BCL-W (Cragg et al., 2009). Poco después y con el mismo perfil inhibidor se creó y evaluó en la clínica el fármaco ABT-263 (navitoclax). Este mimético BH3 presenta propiedades farmacológicas mejoradas del ABT-737 pero conlleva la aparición de trombocitopenia grave como efecto secundario al inhibir BCL-X_L (Billard, 2013; Levenson et al., 2015; Souers et al., 2013).

Ante los efectos secundarios generados por navitoclax, se aprovecharon las diferencias estructurales de las proteínas BCL-2 y BCL-X_L para generar miméticos BH3 específicos de cada una de ellas (Tao et al., 2014). Por tanto, se desarrollaron los miméticos ABT-199 (venetoclax), A-1155463, A-1331852 y WEHI-539. ABT-199 inhibe a la proteína BCL-2, y se ha empleado en la clínica ante tumores hematológicos como la leucemia linfocítica crónica de células B (para el que ya está aprobado) y en mieloma múltiple (existen ensayos clínicos en marcha) (Kumar, Kaufman, et al., 2017). En cambio, los miméticos A-1155463, A-1331852 y WEHI-539 son específicos de la proteína BCL-X_L, siendo el más potente A-1155463 (Tao et al., 2014). La inhibición de BCL-X_L con este último mimético ocasiona trombocitopenia, al igual que navitoclax, pero esta es reversible (Tao et al., 2014).

Dentro de la familia BCL-2, la proteína anti-apoptótica MCL-1 tiene un papel importante en varios cánceres, entre ellos los tumores hematológicos (Xiang et al., 2018). El desarrollo de miméticos específicos de esta proteína ha sido lento en comparación con miméticos BH3 de las proteínas BCL-2 o BCL-X_L. En los últimos años se han generado los compuestos S63845, S63845/MIK665, AMG176 y AZD991 (Adams & Cory, 2018). Estos compuestos están en ensayos clínicos, pero el más efectivo hasta la fecha es el inhibidor S63845, el cual se ha usado en MM y leucemias mieloides (Xiang et al., 2018).

Todos los miméticos se han empleado en mieloma múltiple en ensayos *in vitro* llegando a verse que ABT-199 es efectivo sólo en un grupo concreto de mieloma múltiple, aquellos que presentan altos niveles de la proteína anti-apoptótica BCL-2 y bajos niveles de MCL-1 o BCL-X_L y presentan la traslocación t(11;14). (Punnoose et al., 2016; Touzeau et al., 2014). El tratamiento con ABT-199 por tanto no es efectivo en todos los tipos de MM debido a la coexpresión del resto de proteínas anti-apoptóticas, sobretodo

de BCL-X_L (Punnoose et al., 2016). En el caso de A-155463, tiene efecto en aquellos mielomas que dependen sobre BCL-X_L antes que BCL-2 y puede ser beneficioso para aquellos MM sensibles a ABT-263 pero resistentes a ABT-199 (Touzeau et al., 2018). Por otro lado, el tratamiento con S63845 es efectivo en los mielomas que expresan altamente MCL-1 y más sensibles aún si presentan la amplificación cromosómica 1q21 (Kotschy et al., 2016; Slomp et al., 2019) pero también poseen resistencias.

Ante la inestabilidad genética del mieloma múltiple y las resistencias que genera a los distintos fármacos que se emplean en su tratamiento, se ha llegado a probar la combinación del mimético ABT-737 con el inhibidor de proteasoma bortezomib mostrando sinergia en el tratamiento en modelos animales (Cragg et al., 2009) y ABT-199 combinado con bortezomib en pacientes de mieloma múltiple pretratados y con la traslocación t(11:14) (Touzeau et al., 2018). Por tanto, teniendo en cuenta este estudio, en esta tesis se ha estudiado el efecto que presentan los miméticos BH3 específicos ABT-199, A-1155463 y S63845 por separado y en combinación con el inhibidor de proteasoma ixazomib para ver una posible potenciación del perfil citotóxico de dichos fármacos.

2.2 OBJETIVOS.

En consideración de los antecedentes existentes y comentados en los apartados anteriores de esta sección, los objetivos establecidos y desarrollados a lo largo de esta tesis son:

1. Estudio de la apoptosis inducida por ixazomib en diversas líneas de mieloma múltiple humano establecidas representativas de los principales subtipos de MM encontrados en la clínica.
2. Estudio de la activación de la autofagia en líneas de mieloma múltiple por el tratamiento con ixazomib. Evaluar la posible utilidad terapéutica de la combinación de ixazomib con el inhibidor de autofagia cloroquina.
3. Análisis del efecto de los miméticos ABT-199, A-1155463 y S63845 sobre la supervivencia de líneas establecidas de mieloma múltiple humano y su posible efecto potenciador de la apoptosis inducida por ixazomib.
4. Análisis del efecto de la combinación de los diferentes miméticos BH3 con ixazomib en muestras *ex vivo* de pacientes con MM y en un modelo *in vivo*.

5. Posible generación de inmunogenicidad ante mieloma múltiple en modelo animal tras la inyección de células de MM tratadas con inhibidores de proteasoma como carfilzomib e ixazomib.



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES.

3.1.1. Líneas celulares.

Las líneas celulares empleadas para la realización de esta tesis son las siguientes (**Tabla 3.1**):

- Líneas celulares en suspensión:
 - **MM.1S**: línea celular de mieloma múltiple establecida a partir de su antecesor MM.1 la cual proviene de sangre periférica de una paciente de 42 años. Esta línea se caracteriza por la producción de IgA λ , una elevada sensibilidad a glucocorticoides y la capacidad de formar una monocapa sobre el sustrato donde es cultivada. Ha sido cedida por Atanasio Pandiella del Centro de Investigación del Cáncer (Universidad de Salamanca, España).
 - **NCI-H929**: línea celular de mieloma múltiple establecida a partir de un derrame pleural maligno de un paciente de 62 años y que se caracteriza por la producción de IgA κ . Ha sido cedida por el Dr. Antonio Campos del Hospital Puerta del Mar (Cádiz, España).
 - **OPM2**: Línea celular de mieloma múltiple humano establecida a partir de sangre periférica de una paciente de 56 años caracterizada por la expresión de IgG λ y cedida por Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Alemania).
 - **RPMI8226**: línea de mieloma múltiple establecida en 1966 a partir de sangre periférica de un varón de 61 años con MM. Ha sido proporcionada amablemente por la Dra. Martine Amiot del INSERM U463 (Nantes, Francia).
 - **U266**: línea celular de mieloma múltiple establecida a partir de sangre periférica de un paciente varón de 53 años de edad que se caracteriza por una sobreproducción IgE λ . Ha sido cedida por el Dr. Antonio Campos del Hospital Puerta del Mar (Cádiz, España).
 - **MM.1S BimKO, NCI-H929 BimKO, RPMI8226 BimKO y U266 BimKO**: líneas generadas durante el desarrollo de la presente tesis mediante infección lentiviral de las líneas parentales según el procedimiento descrito en el **apartado 3.5**.

- **MM.1S Lentricrispr vacío, NCI-H929 Lentricrispr vacío, RPMI8226 Lentricrispr vacío, y U266 Lentricrispr vacío:** líneas generadas durante el desarrollo de la presente tesis mediante infección lentiviral de las líneas parentales según el procedimiento descrito en el **apartado 3.5**.
- **OPM2 pLVTHM:** línea generada mediante infección lentiviral en nuestro laboratorio mediante el desarrollo de la presente tesis.
- **OPM2 shBim:** línea generada anteriormente en nuestro laboratorio mediante técnicas de transfección con shRNA.
- **MM.1S Bax/Bak KO:** línea generada en nuestro laboratorio por el estudiante predoctoral Manuel Beltrán Visiedo.
- **RPMI8226 pLZR, RPMI8226 Mcl-1 y RPMI8226 Bcl-XL:** líneas generadas previamente en nuestro laboratorio (Galán-Malo et al., 2012; Gómez-Benito, Balsas, et al., 2007).
- **MM.1S shATG5:** línea carente de la proteína ATG5 implicada en el correcto desarrollo del proceso de autofagia. Generada previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Vidal Jarauta Azcona (Jarauta, 2015).
- **MM.1S Vector vacío shATG5:** línea generada durante el desarrollo de esta tesis como control del proceso de infección lentiviral en nuestro laboratorio.
- **RPMI8226 resistentes Bortezomib (8226/7B):** línea generada previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Patricia Balsas se caracteriza por ser resistente a dosis inferiores o iguales a 15 nM del inhibidor de proteasoma Bortezomib (Balsas et al., 2012).
- **MOPC315.BM:** línea establecida a partir del plasmacitoma 315 generado en un ratón BALB/c, cedida amablemente por el Dr. Hofgaard (Universidad de Oslo, Noruega).
- **MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen:** línea generada mediante infección lentiviral a partir de la línea MOPC315.BM. Ha sido obtenida en el laboratorio con anterioridad por el Dr. Alfonso Serrano para el seguimiento del crecimiento tumoral en ensayos con ratones (Serrano del Valle, 2020).

- Líneas celulares adherentes:
 - **HEK 293T**: línea de fibroblastos embrionarios humanos de riñón. También proporcionadas por el Dr. Carrodegua, Departamento de Bioquímica (Universidad de Zaragoza, España). Esta línea ha sido empleada principalmente para la producción de partículas lentivirales.

Tabla 3.1. Líneas celulares empleadas en el desarrollo de esta tesis. Se muestra un resumen de las líneas establecidas empleadas en este trabajo.

LÍNEA CELULAR	ESPECIE	MODIFICACIÓN GENÉTICA
MIELOMAS		
MM.1S	Humano	No
MM.1S BIM KO	Humano	Sí
MM.1S Lenticrispr vacío	Humano	Sí
MM.1S BAX/BAK KO	Humano	Sí
MM.1S shATG5	Humano	Sí
MM.1S Vector vacío de shATG5	Humano	Sí
MOPC315.BM	Ratón	No
MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen	Ratón	Sí
NCI-H929	Humano	No
NCI-H929 BIM KO	Humano	Sí
NCI-H929 Lenticrispr vacío	Humano	Sí
OPM-2	Humano	No
OPM-2 shBIM	Humano	Sí
OPM-2 PLVTHM	Humano	Sí
RPMI8226	Humano	No
RPMI8226 BIM KO	Humano	Sí
RPMI8226 Lenticrispr vacío	Humano	Sí
RPMI8226 PLZR	Humano	Sí
RPMI8226 MCL-1	Humano	Sí
RPMI8226 BCL-X _L	Humano	Sí
RPMI8226 Resistentes bortezomib	Humano	No
U266	Humano	Sí
U266 BIM KO	Humano	Sí
U266 Lenticrispr vacío	Humano	Sí
OTRAS LÍNEAS CELULARES		
HEK 293T	Humano	No

3.1.2. Materiales y medios de cultivo celular.

Las principales líneas celulares empleadas durante el desarrollo de esta tesis son líneas en suspensión, por lo que han sido cultivadas en medio RPMI 1640 GlutaMAX™

(Gibco) suplementado con un 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y un 1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Sigma-Aldrich). En el caso de las líneas MOPC315.BM y MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen, han sido cultivadas en medio RPMI 1640 GlutaMAXTM (Gibco) suplementado con un 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco), un 1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y un 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). Por el contrario, para la línea HEK 293T empleada en la generación de virus, se ha empleado medio DMEM 1640 GlutaMAXTM (Gibco) también suplementado con un 10% en volumen de SFB (Gibco) y un 1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Sigma-Aldrich).

Todo el material de plástico estéril empleado durante el desarrollo de esta tesis (frascos de cultivo, placas de 6, 12, 24 ó 96 pocillos, etc...) procedían de la marca TPP y los tubos criogénicos de NUNC Cell Culture. Los tubos de fondo cónico de 15 y 50 ml, así como las pipetas serológicas empleadas para el mantenimiento de los cultivos celulares procedían de CorningTM, Culti. Además, el material de vidrio empleado, así como las puntas de micropipetas y cualquier otro tipo de material destinado a la manipulación de cultivos ha sido previamente esterilizado en autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta) durante 20-30 minutos a 1,2 atmósferas de presión.

Se utilizó dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma) para reconstituir el fármaco ixazomib (Selleckchem y MedchemExpress), los miméticos BH3 como ABT-199 (MedchemExpress), A-1155463 (MedchemExpress) y S63845 (MedchemExpress), los inhibidores de caspasas Z-DEVD-fmk, Z-IETD-fmk y Z-VAD-fmk (MedchemExpress) y los fármacos inhibidores de autofagia cloroquina (CLQ), DBeQ y CB5083 (Selleckchem). La solución Ficoll-PaqueTM se solicitó a Sigma-Aldrich.

Todas las manipulaciones de células se han realizado en campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P) y los cultivos han sido mantenidos en un incubador de CO₂ termostatzado (Hareus Heracell 150i, Thermo) a 37°C, con un 5% de CO₂ y aire saturado de humedad.

Durante el mantenimiento de los cultivos celulares y a la hora de realizar esta tesis se han empleado las siguientes centrífugas:

- Microfuge 16 (Beckman Coulter).
- Eppendorf Centrifuge 5471R

- Allegra X-15R (Beckman Coulter).

3.1.3. Mantenimiento cultivos celulares y detección micoplasmas.

Las líneas celulares se han mantenido rutinariamente en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² (TPP) realizando subcultivos periódicamente de todas las líneas empleadas. Para estos subcultivos, se ha tenido en cuenta la viabilidad celular y se han establecido a una densidad celular (células/ml) en torno a $1,5 \times 10^5$ - 3×10^5 células/ml en su medio correspondiente según su tipo celular.

Rutinariamente se comprobó el estado morfológico de los cultivos gracias a un microscopio invertido (Nikon) y, se realizaron pruebas de detección de Micoplasmas de manera periódica mediante el kit comercial “*Mycoplasma Gel Detection Kit*” (Biotools) que se basa en la amplificación del DNA de micoplasmas por PCR. En caso de ser necesario, se procedió a la eliminación de los mismos empleando una combinación de antibióticos comercial, BM *Cyclin* (Roche).

3.1.4. Determinación de la viabilidad y densidad celular en los cultivos celulares.

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante conteo con azul trypan (Sigma-Aldrich). Este colorante se introduce únicamente en las células cuya membrana plasmática está dañada, por lo que permite diferenciar las células muertas teñidas de azul, de las células vivas en blanco a través de un microscopio óptico (Nikon). Para el conteo, se mezclaron 50 µl de la suspensión celular con 50 µl de azul trypan. Se colocaron 10 µl de dicha mezcla en una cámara de Neubauer o hemocitómetro y para proceder al conteo mediante un microscopio óptico (Nikon).

La densidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular (Cel.ml}^{-1}\text{)} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} \cdot \text{Factor dilución} \cdot 10^4}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

Siendo 10^4 el factor de corrección del volumen del hemocitómetro.

En cuanto a la viabilidad celular se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas vivas}}{n^{\circ} \text{ de células contadas totales}} \cdot 100$$

Todos los experimentos se han realizado partiendo de una viabilidad celular superior al 85%.

3.1.5 Congelación y descongelación de cultivos celulares.

Para el proceso de congelación se recogieron 6×10^6 células totales del cultivo y se pasaron a un tubo cónico de 15 ml. A continuación, se centrifugaron a 58xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendieron en una mezcla de 250 μ l SFB (Gibco), 200 μ l de medio completo (RPMI 1640 GlutaMAXTM o DMEM1640 GlutaMAXTM (Gibco) con 10% (v/v) de SFB y 1% (v/v) antibiótico) correspondiente según tipo de línea celular, y 50 μ l de DMSO (Sigma). A continuación, se pasó la solución con células a un criotubo, previamente rotulado, que fue almacenado a -80° C durante 48 h y posteriormente introducido en un tanque de nitrógeno líquido para mayor conservación en el tiempo.

Para descongelar las líneas celulares, se añadió lentamente a los criotubos un pequeño volumen de medio completo, correspondiente según el tipo celular, hasta la descongelación de las células. Posteriormente, dicha suspensión se añadió a un tubo cónico de 15 ml que ya contenía previamente 10 ml de medio completo para realizar un lavado. Se centrifugó a 58xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante para resuspender el pellet en un volumen de 5-10 ml de medio completo en función del tamaño de este y se colocaron en un T25 en la estufa a 37°C y 5% de CO₂. Una vez la línea celular se recuperó de la descongelación, se sembraron a la densidad habitual previamente comentada (**apartado 3.1.3**).

3.2. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN, CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS CELULAR.

3.2.1 Determinación de la proliferación celular.

Para determinar la proliferación tras el tratamiento con ixazomib se empleó el método propuesto originalmente por Mosmann y posteriormente modificado por Denizot y Lang (Denizot & Lang, 1986). Este método relaciona el número de células viables con la cantidad generada de cristales de azul formazán, los cuales son insolubles en medio acuoso y son producidos por la oxidación del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT). Esta reacción se lleva a cabo por enzimas deshidrogenasas intracelulares por lo que la cantidad de cristales formados es proporcional a la viabilidad celular. Para diferenciar entre efecto citostático o citotóxico se realizaron paralelamente contajes con azul trypan.

Las células se cultivaron a una densidad de 3×10^5 células/ml en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen final de 100 μ l por pocillo y al menos 4 réplicas por punto experimental, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del fármaco ixazomib (Control; 1,56 nM; 3,12 nM; 6,25 nM; 12,5 nM; 25 nM y 50 nM). La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h o 48 h en función del tiempo estipulado para el experimento. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada pocillo 10 μ l de la solución MTT (5 mg/ml) en PBS mediante una pipeta de repetición y se incubó durante 2-3 h a 37°C y 5% de CO₂ en una estufa. Tras este tiempo, la formación de cristales era visible a simple vista por lo que se procedió a centrifugar la placa a 1455xg durante 30 min para depositar en el fondo las células en suspensión junto a los cristales formados. Posteriormente, se extrajeron 50 μ l de volumen del pocillo para reducir interacciones del disolvente orgánico con el medio de cultivo y facilitar la disolución de los cristales, la cual se llevó a cabo con la adición de 100 μ l por pocillo de una mezcla de isopropanol/HCl 0,05M. A continuación, se colocó la placa en un agitador de placas (Bioblock, Francia) durante unos 15 segundos para disolver por completo los cristales antes de la lectura de la placa en un lector de placas ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) a 550 nm. Por último, se presentaron los resultados como porcentaje de crecimiento celular de cada condición experimental respecto al control.

3.2.2 Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V y 7-AAD.

Durante el proceso de apoptosis se produce la traslocación en la membrana celular del fosfolípido fosfatidilserina (PS) de la hemicapa interna a la hemicapa externa, siendo un mecanismo para facilitar la fagocitosis de la célula muerta. Una manera de evaluar esta traslocación es mediante el marcaje con Anexina V, una molécula que se une con una alta afinidad a este fosfolípido. Dicha molécula puede estar conjugada con diferentes fluoróforos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) ($\lambda_{ex} = 490$ nm; $\lambda_{em} = 525$ nm), DY-634 ($\lambda_{ex} = 635$ nm; $\lambda_{em} = 658$ nm), aloficocianina (APC) ($\lambda_{ex} = 650$ nm; $\lambda_{em} = 660$ nm) o DY-647 ($\lambda_{ex} = 653$ nm; $\lambda_{em} = 672$ nm). Todas las combinaciones de Anexina V-fluoróforo empleadas en el desarrollo de esta tesis se realizaron en el laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Logue (Logue et al., 2009).

Esta técnica se empleó para analizar el nivel de apoptosis inducida por diferentes inhibidores de proteasoma (principalmente ixazomib y en algunos casos carfilzomib o bortezomib) ya sea solos, o en combinación con otros fármacos (DBeq, CB-5083 y

cloroquina, todos ellos de Selleckchem: inhibidores sintéticos de caspasas Z-VAD-fmk, Z-IETD-fmk y Z-DEVD-fmk todos ellos de MedChemExpress) o miméticos BH3 (A-1155463, ABT-199, ABT-737 y S63845, todos ellos de Selleckchem). Todas las líneas analizadas con este método fueron sembradas, por duplicado, a una densidad 3×10^5 células/ml en 500 μ l de medio completo RPMI 1640 GlutaMAXTM, con la concentración correspondiente al experimento de cada fármaco en placas de 24 o 48 pocillos. Una vez transcurrido el tiempo estipulado para cada experimento, se recogieron las células en tubos de citometría previamente rotulados y se centrifugaron a 335xg durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante mediante aspiración por bomba de vacío o decantación y se resuspendieron en 100 μ l de una dilución ABB 1x (*Annexin Binding Buffer*; Hepes/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM) en agua Mili-Q estéril, preparada durante la centrifugación a partir de una dilución ABB 10X. Esta dilución ABB 1X contenía 0,2 μ l de Anexina V-FITC por cada 25 muestras o 0,02 μ l de Anexina V-APC o Anexina V-DY647 por cada 40 muestras. Se incubaron los tubos durante 15 o 20 minutos en oscuridad para evitar el desgaste de los fluoróforos. Además, para una correcta resuspensión del pellet celular en los tubos se utilizó un vórtex antes de colocar el tubo en el citómetro de flujo (FACScaliburTM, BD Biosciences).

También se utilizó 1 μ l por cada muestra de la sonda 7-aminoactinomicina D (7-AAD, Biolegend) (λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 650 nm) en PBS, capaz de unirse al DNA y marcar sólo aquellas células cuya membrana plasmática está dañada. Se utiliza como marcador de necrosis celular y permite completar la información obtenida con la metodología de la Anexina V descrito previamente en esta misma sección.

3.2.3 Análisis del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo mediante marcaje con DiOC6(3).

En las células se produce un potencial mitocondrial ($\Delta\psi$) o de membrana mitocondrial como consecuencia de transporte de electrones en la cadena respiratoria. En el momento que se produce la muerte celular, este potencial se interrumpe y decae. Por ello, existen diferentes sondas (TMRE, DiOC₆(3)) que permiten medir el potencial mitocondrial de las células mediante citometría de flujo. DiOC₆(3) es una sonda lipofílica catiónica, la cual difunde fácilmente por el citosol y se acumula en las mitocondrias cuando estas presentan $\Delta\psi$ activo. Este compuesto emite fluorescencia a 530 nm y 575 nm, disminuyendo su emisión fluorescente cuando hay alteraciones en $\Delta\psi$.

Una vez las células fueron incubadas con los fármacos a 24 h, se procedió al marcaje con DiOC₆(3) y posteriormente con Anexina V-APC o Anexina V-DY647 para cuantificar simultáneamente la muerte apoptótica. Para ello se adicionó la sonda DiOC₆(3) a cada pocillo de la placa con una concentración final de 10 nM diluido en ABB 1X y se incubaron las células durante 30 min en la estufa a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurrido dicho tiempo se marcó con Anexina V-APC o Anexina V-DY647, como se indica en el **aparado 3.2.2** y, por último, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences).

3.2.4 Análisis de la actividad del proteasoma.

Para medir la actividad del proteasoma se empleó el kit *20S Proteasome Activity Assay* (Millipore, Chemicon®), el cual se basa en la detección del fluoróforo 7-Amino-4-metilcumarina (AMC) después de la escisión del sustrato LLVY-AMC. El AMC libre es cuantificable mediante fluorescencia con el filtro 380/460 nm.

Se colocó, en una placa de 96 pocillos de fondo plano, 30 µg de extracto de las líneas cultivadas con ixazomib (25 nM) durante el tiempo estipulado para cada ensayo (1, 4 o 24 h). A continuación, se añadió a cada pocillo los volúmenes indicados por el kit de Assay buffer 10X, sustrato (LLVY-AMC) y agua hasta alcanzar un volumen final de 100 µL. La placa se incubó durante 2 h a 37°C. Posteriormente se midió el AMC libre en un espectrofotómetro-luminómetro (BioTek) con el filtro 380/460 nm. y se cuantificó el porcentaje de actividad del proteasoma respecto a la condición basal (sin tratamiento).

3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

3.3.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante *Western Blot*.

3.3.1.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.

Primero se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3x10⁶ células/pocillo, las líneas celulares en diferentes condiciones según el experimento a realizar, en un volumen total de 10 ml. A continuación, se incubaron los tiempos indicados según en el experimento.

Una vez transcurrido el tiempo estipulado, se recogieron las células en tubos de fondo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 335xg durante 5 min, y se determinó el número total de células y la viabilidad en cada muestra mediante conteo con azul trypan o

mediante la técnica de Anexina V (explicada en el **apartado 3.2.2**). Una vez finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante mediante decantación o succión con bomba de vacío, y se resuspendió en 1 ml de PBS. Después, se traspasó todo el volumen a un eppendorf estéril previamente rotulado, el cual fue centrifugado durante 5 min a 335xg. Posteriormente, mediante micropipeta se eliminó todo el sobrenadante y se adicionó 20 μ l de tampón de lisis (Tritón-X100 al 1%, Sigma; NaCl 150 mM, Merck; Tris/HCl 50 mM, pH 7.6, Sigma; glicerol al 10% v/v, Scharlau; EDTA 1 mM, Sigma; Ortovanadato sódico 1 mM, Sigma; Pirofosfato sódico 10 mM, Sigma; Leupeptina 10 μ g/ml, Sigma; Fluoruro de sodio 10 mM, Sigma; Fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, Sigma) por cada 10^6 células presentes en el pellet recogido. Una vez añadido y resuspendido el pellet, evitando la formación de burbujas, se dejó al menos 30 minutos en hielo. A continuación, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 18000xg. Por último, se traspasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf estéril rotulado y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso o se procedió a la cuantificación de proteína total en la muestra.

3.3.1.2 Preparación de muestras para separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Tras la obtención de los extractos celulares se determinó la cantidad de proteína total presente en ellos. Para ello, se empleó el método BCA (***B**icinchoninic **A**cid*; Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) basado en un ensayo colorimétrico de alta sensibilidad y poca interacción con detergentes iónicos y no iónicos. En este método se produce una reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} proporcional a la cantidad de proteína presente para la formación de un complejo proteína- Cu^{2+} . Dicha reducción es cuantificable debido a la formación de un complejo estable de color azul-morado entre el BCA y el Cu^{+} con una absorbancia a 562 nm. Por tanto, se colocó en una placa de 96 pocillos planos un volumen total de 100 μ l por pocillo de una mezcla de PBS + 2 μ l de muestra. Para la recta patrón se realizó una dilución secuencial a partir de una disolución stock de BSA a 2 mg/ml (Sigma). A continuación, se añadieron 100 μ l de la mezcla de reactivos del kit BCA y se dejó incubar a 58°C durante 15 min. Por último, se realizó la lectura de la placa mediante un lector de placas ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) a 550 nm, y se extrapoló la concentración de proteína mediante el análisis de las absorbancias con el programa Microsoft Excel 2016.

Una vez determinada la concentración de proteína en cada muestra, se preparó un eppendorf estéril con un volumen final de 40 μ l para cada muestra que contenía una

mezcla del volumen necesario para tener 200 µg de proteína, 13 µl de tampón de carga 3x (Tris/HCl 150 mM, pH 7.4; Dodecilsulfato sódico (SDS) al 3%; Molibdato de sodio 0,3 mM; Pirofosfato sódico 30 mM; Fluoruro de sodio 30 mM; Glicerol al 30% v/v; β-mercaptoetanol al 30% v/v; Azul de bromofenol al 0,06% p/v) y un volumen de agua Mili-Q específico para cada muestra hasta alcanzar el volumen final establecido. Posteriormente se calentaron las muestras preparadas a 99°C durante 10 minutos en un bloque térmico (Thermomixer comfort, Eppendorf) sin agitación y se les dio un pulso de centrifuga a 14462xg durante 30 segundos. Por último, se cargaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 15% para su posterior separación mediante electroforesis o se conservaron a -20°C hasta su uso.

3.3.1.3 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF o nitrocelulosa.

Para la separación de proteínas de las muestras previamente preparadas según los apartados 3.3.1.1 y 3.3.1.2, se prepararon en el laboratorio geles de poliacrilamida al 15% a los que se les adicionó SDS según la composición reflejada en la **Tabla 3.2**. Tras la polimerización fueron colocados en una cubeta de electroforesis (Sub Cell GR, Bio-Rad) con *Running Buffer* (Trizma 19 mM, Sigma; Glicina 1.9 mM, Panreac; SDS al 0,01%, Merck) y se cargó en cada pocillo 10 µl de las muestras preparadas anteriormente que contenían 50 µg de proteína o 2 µl de marcador de pesos molecular *BlueStar Plus Prestained Protein Marker*, Genetics (Cultek). La separación de proteínas se llevó a cabo durante 30 minutos a 80V y 20 mA/gel mientras las muestras entraban en el gel concentrador (*Stacking gel*) para una alineación correcta antes de la entrada en el gel separador (*Resolving gel*), donde las condiciones cambiaron a 1 hora y 30 minutos a 180 V y 20 mA/gel.

Posteriormente se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno, GE Healthcare) previamente activada durante 30 segundos en metanol, o a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) la cual no necesita ser activada previamente. La electrotransferencia se realizó en condiciones semisecas colocando una estructura compuesta por 2 capas de papel Whatman (Ge Healthcare) humedecidos en tampón de transferencia o *Transfer Buffer* (Tris/HCl 48 mM pH 8.3, Sigma; Glicina 39 mM, Sigma; SDS al 0,037%, Merck; 20% Metanol grado HPLC, Panreac), la membrana humedecida en dicho tampón, el gel incubado unos segundos en este tampón y, por último, otras 2 capas de papel Whatman también humedecidas. Esta

estructura se formó evitando que quedasen burbujas entre las diferentes capas y se colocó en un equipo de transferencia semiseca (Bio-Rad) durante 1 hora y 15 minutos a 20 V y 400 mA.

Tabla 3.2. Composición de los geles de poliacrilamida con SDS empleados en la separación de proteínas mediante electroforesis.

	Stacking Gel	Resolving gel (15%)
Acrilamida / Bis, Bio-Rad	0,5 ml	1,9 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	1,25 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	-	1,25 ml
SDS al 10%	50 µl	50 µl
Agua Destilada	3 ml	1,7 ml
APS al 10% (p/v), Sigma	150 µl	100 µl
T.E.M.E.D, Sigma	15 µl	10 µl
Total	5 ml	5 ml

Finalizada la electrotransferencia, se comprobó que esta había sido correcta mediante la tinción de la membrana con Rojo Ponceau (Merck) al 0,1% en ácido acético al 0,05% (p/v). Finalmente, se procedió al bloqueo de la membrana en cubetas que contenían una disolución de leche desnatada al 5% (p/v) en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 al 0,1%, Panreac; Timerosal 0,1 g/L) durante 1 h a T^a ambiente y en agitación.

3.3.1.4 Análisis de proteínas por *Western Blotting* y detección de inmunocomplejos.

Tras bloquear la membrana, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con tampón B en agitación. Posteriormente se incubó con una disolución al 5% BSA (con 0,05% azida de sodio) en tampón B y el anticuerpo primario específico de la proteína a detectar como se recogen en la **Tabla 3.3**, a la concentración indicada por el proveedor en condiciones de agitación a 4°C durante toda la noche [*over night* (o/n)].

A continuación, se recogió la disolución que contiene el anticuerpo primario y se lavó la membrana con tampón B tres veces durante 5 minutos en agitación. Después, se incubó la membrana durante 1 h en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa en una dilución del 5% de leche en polvo desnatada en tampón B. Pasado este tiempo se eliminó el anticuerpo secundario y tras

lavar de nuevo 3 veces (15, 10 y 5 minutos) con tampón B, se llevó a cabo la detección de los complejos antígeno-anticuerpo mediante generación de quimio-luminiscencia con un sustrato de peroxidasa comercial (Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific) en un equipo de revelado de *Western Blot* digital (Amersham™ Imager 600, GE *Life Sciences*). Para ello se colocó la membrana en una funda de plástico, se aplicó el sustrato de la peroxidasa durante 1 min y después se expuso durante un tiempo estimado automáticamente por el aparato de revelado. Si el tiempo estimado era insuficiente las membranas se expusieron durante 30 minutos.

Tabla 3.3 Anticuerpos empleados en la detección de proteínas mediante la técnica *Western Blot*.

ANTICUERPO	TIPO, ESPECIE	DILUCIÓN	MARCA COMERCIAL
α -tubulina (clon B-5-1-2)	mc, ratón	1/10000	Cell Signaling, 3873
Atg5 (clon D1G9)	pc, conejo	1/1000	Cell Signaling, 85405
β -actina	mc, ratón	1/10000	Cell signaling, 3700
Bak (clon G-23)	Pc. conejo	1/1000	Santa Cruz, sc-832
Bax (clon B-9)	mc. ratón	1/1000	Santa Cruz, sc-7480
Bcl-2	mc, ratón	1/500	Abcam, ab692
Bcl-2 (clon 100/D5)	mc, ratón	1/250	Santa Cruz, sc-56015
Bcl-X _L (clon 54H6)	pc, conejo	1/1000	Cell Signaling, 2764S
Bim (clon C34C5)	pc, conejo	1/1000	Cell Signaling, 2933S
IgG anti-conejo PO	mc, ratón	1/20000	Sigma, A9169
IgG anti-ratón PO	mc, cabra	1/20000	Sigma, A9044
LC3B	pc, conejo	1/1000	Sigma, L7543
Mcl-1 (clon 22)	mc, ratón	1/250	Santa Cruz, sc-12756
Noxa	pc, conejo	1/250	Abcam, 114C307
Noxa (clon 144c307)	mc, ratón	1/250	Santa Cruz, sc-56169
p62 (SQ STM1)	mc, ratón	1/1000	Santa Cruz, sc-28359
Puma (clon SR42-09)	pc, conejo	1/500	Novus, NBP2-67326

*Abreviaturas: mc (monoclonal) y pc (policlonal)

Como control de carga se empleó la α -tubulina (Sigma) o la β -actina (Sigma) dependiendo de los pesos moleculares de las proteínas anteriormente analizadas. Para ello se utilizó una dilución de dichos anticuerpos monoclonales, ambos obtenidos en ratón, a una dilución 1:10000 en tampón B al 2,5% de leche desnatada en polvo durante 30 minutos en agitación. Transcurrido dicho tiempo, se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos y se incubó con un anticuerpo frente a IgG de ratón (Sigma) obtenido en cabra y conjugado en peroxidasa, a una dilución 1:20000 en tampón B al 2,5% de leche desnatada

en polvo. Por último, se trató la membrana para su detección como se ha comentado en el párrafo anterior.

3.3.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo.

En la siguiente **Tabla 3.4** se recogen todos los anticuerpos utilizados para el marcaje y posterior análisis mediante citometría de flujo. Los tiempos y buffers necesarios se encuentran explicados en los siguientes subapartados de esta sección.

Tabla 3.4. Anticuerpos empleados en detección de proteínas mediante citometría de flujo. En ella se muestran los anticuerpos empleados para la detección de las diferentes proteínas por la técnica de citometría de flujo.

MARCAJE	TIPO, ESPECIE	ESPECIE DIRIGIDA	CASA COMERCIAL y REFERENCIA	LONGITUD EMISION Y EXCITACIÓN
Ms IgG1 Isotype Control-DyLight® 488 (clon MOPC-21)	mc, Ratón	Humano	Invitrogen, MAI-191-D488	$\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$
Anti-Calreticulina-mab DyLight™ 488 (clon (MC75))	mc, Ratón	Humano	Enzo Life Sciences, ADI-SPA-601-488-F	$\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$
Anti-Caspasa 3 Activa-FITC (clon C92-605)	pc, Conejo	Humano	BD Biosciences, 559341	$\lambda_{ex} = 490 \text{ nm};$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$
Anti-IgG (H+L) conejo Alexa Fluor® 488	pc, Cabra	Conejo	Invitrogen, A-11034	$\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$
Anti-IgG (H+L) ratón Alexa Fluor 488	pc, Cabra	Ratón	Invitrogen, A-11029	$\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$
Anti-NOXA (clon 144c307)	mc, Ratón	Humano	Santa Cruz, sc-56169	No tiene
Anti-PUMA	pc, Conejo	Humano	Abcam, ab9643	No tiene

3.3.2.1 Determinación niveles de caspasa-3 activa.

Se analizó la activación de caspasa-3 a diferentes tiempos en células tratadas con ixazomib. También se evaluó la activación de caspasa-3 en presencia y ausencia del inhibidor de caspasas general Z-VAD-fmk (MedChemExpress) a una concentración de 50 μM , concentración optimizada en estudios anteriores realizados en el laboratorio.

Para ello, se sembraron 3×10^5 células por punto, tratado o sin tratar, y se dejaron incubar en una estufa a 5% CO_2 y 37°C durante el tiempo estipulado para cada ensayo. Posteriormente se recogieron en tubos de citómetro que se centrifugaron a $335 \times g$ durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por aspiración mediante bomba de vacío o por decantación y se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a T^a ambiente para fijar las células. Pasado este tiempo se centrifugaron a $335 \times g$ durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en $200 \mu\text{l}$ de PBS con 0.1% (p/v) saponina (Sigma) durante 20 minutos a T^a ambiente para generar poros en las membranas celulares y permitir la entrada del anticuerpo. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron durante 5 minutos a $335 \times g$ y se descartó el sobrenadante para realizar 2 lavados con $200 \mu\text{l}$ de PBS estéril y una posterior resuspensión en $100 \mu\text{l}$ de una disolución de PBS al 5% de SFB que contenía el anticuerpo anti-Caspasa 3 activa unido al fluoróforo FITC (**Tabla 3.4**) en una dilución 1:20. Se dejó incubar durante 30 minutos en condiciones de oscuridad y a T^a ambiente antes de proceder al análisis de cada tubo mediante citometría de flujo.

3.3.2.2 Determinación niveles de expresión de PUMA y NOXA.

Para el estudio de los niveles de expresión de PUMA y NOXA inducidos por el tratamiento con ixazomib, se procedió de manera similar al análisis de la activación de caspasa-3 activa. Estos ensayos se realizaron también en presencia o ausencia de Z-VAD-fmk a $50 \mu\text{M}$.

Se siguieron los mismos pasos descritos en el **apartado 3.3.2.1** hasta los lavados con PBS tras la incubación con PBS al 0.1% saponina (Sigma), donde cada tubo se dividió en 2; uno para analizar los niveles de PUMA y otro para NOXA. A continuación, se resuspendieron en $50 \mu\text{l}$ de una dilución de PBS al 5% de SFB que contenía o bien el anticuerpo anti-NOXA (Santa Cruz Biotech) (**Tabla 3.4**) en una dilución 1:10 o el anticuerpo anti-PUMA (Abcam) (**Tabla 3.4**) a una dilución 1:100. En ambos casos, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugaron a $930 \times g$ durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante para proceder a un lavado con $200 \mu\text{l}$ de PBS estéril. Por último, se resuspendieron en $50 \mu\text{l}$ de una dilución de PBS al 5% de SFB que contenía anticuerpos anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488TM (Invitrogen) (**Tabla 3.4**) a una dilución 1:100 para PUMA, anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488TM (Invitrogen) (**Tabla 3.4**) a una dilución 1:50 en el caso de evaluar la expresión de NOXA. Antes de analizar los tubos por el citómetro de flujo

(FACScalibur™, BD Biosciences) se incubó con la disolución anterior a T^a ambiente durante 30 minutos y se adicionó 200 µl de PBS antes de colocar el tubo en el aparato.

Además, se analizó la viabilidad mediante marcaje con 7-AAD tal y como se explica en el **apartado 3.2.2**.

3.3.2.3 Determinación niveles de calreticulina.

En estudios anteriores realizados en el laboratorio, se observó que algunos inhibidores de proteasoma producen una muerte inmunogénica por lo que se procedió al estudio de dicho proceso en el caso de células tratadas con ixazomib sólo o en combinación con miméticos BH3 (A-1155463, ABT-199 y S63845, MedChemExpress) o con inhibidores de caspasas (Z-VAD-fmk, Z-IETD-fmk y Z-DEVD-fmk, MedChemExpress).

Para ello se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo tratado o control, y se dejó incubando la placa a 37°C durante 24 h en una estufa con 5% de CO₂. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células en tubos de citómetro los cuales se centrifugaron durante 5 minutos a 335xg y se descartó el sobrenadante mediante bomba de vacío o decantación. A continuación, se resuspendieron e incubaron los pellets con 100 µl de una disolución de PBS al 5% de SFB con 0,5 µl del anticuerpo anti-calreticulina-DyLight™ 488 (Enzo Life Sciences) (**Tabla 3.4**) o 1 µl del control Ms IgG1 Isotype Control- DyLight® 488 (Invitrogen) (**Tabla 3.4**) y 1 µl de 7-AAD durante 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, se añadió 200 µl de PBS al 5% de SFB y se analizaron por citometría de flujo.

3.4. TÉCNICAS BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.4.1 Preparación de medios y cultivos bacterianos.

Toda la preparación y manipulación de los medios de cultivo y cultivos bacterianos se realizaron bajo las condiciones de esterilidad creada por la llama de un mechero de alcohol.

En cuanto al medio de cultivo líquido, se preparó medio Luria Bertani (LB) a partir de 10 g de triptona (Scharlau), 5 g de extracto de levadura (Scharlau) y 5 g de NaCl (PanReac AppliChem) diluidos en 1 litro de agua destilada. Una vez preparada la disolución se dividió en dos botellas de vidrio de 500 ml, las cuales se autoclavarón para

garantizar la esterilidad en un autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Tras enfriar las botellas a T^a ambiente fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

Por otra parte, para preparar placas LB-agar, se disolvieron en 200 ml de agua destilada 3,5 g de *Plate Count Agar* (Sigma-Aldrich). Una vez disuelto se vertió en una botella de vidrio de 500 ml y se esterilizó en un autoclave. Tras atemperarse y sin llegar a la gelificación del medio, se añadió en una campana de flujo laminar vertical el antibiótico de selección (Ampicilina a 100 µg/ml, Roche; o Kanamicina a 50 µg/ml) y se agitó suavemente para una correcta homogenización. A continuación, dentro de la misma campana, se vertió el contenido de la botella en placas Petri de 100 mm las cuales se dejaron abiertas hasta la gelificación del medio LB-agar. Finalmente, las placas se cerraron y sellaron con Parafilm® antes de proceder a su almacenamiento a 4°C boca abajo.

3.4.2 Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.

Una vez obtenido el plásmido con el inserto deseado (**apartados 3.4.6, 3.4.7, 3.4.8 y 3.5.2**) procedimos a su expansión en células bacterianas. Para ello empleamos la transformación bacteriana por choque térmico de células competentes producidas en el laboratorio.

La obtención de bacterias competentes se realizó a partir de un pre-cultivo de 10 ml de *E. Coli XL-Blue*, el cuál pasadas al menos 16 horas se vertió en varios matraces que contenían 100 ml de medio LB líquido autoclavados y se dejaron en un agitador orbital a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica A 600 nm= 0,4. Una vez alcanza la densidad adecuada, se recogió el volumen de los matraces en tubos cónicos de 50 ml los cuales fueron centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 2851xg. A continuación, se descartó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el pellet de cada tubo cónico con 3 ml de tampón de trituración (100 mM CaCl₂, Merck; 70 mM MgCl₂, Merck; 40 mM NaCH₃COO, Panreac), se homogeneizó el pellet y se volvió añadir 30 ml de tampón de trituración a cada tubo. Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 4°C y 2851xg, se descartó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el pellet de cada tubo con 4 ml de tampón de conservación (100 mM CaCl₂; 15% glicerol, Panreac). Seguidamente, y una vez homogenizado, se dividió el volumen de cada tubo en eppendorfs estériles con un volumen de 400 µl cada uno del cultivo bacteriano, los cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana con el plásmido deseado, se descongeló una alícuota de células bacterianas competentes en hielo. Se empleó una alícuota para cada transformación. Una vez descongelada, se añadieron entre 50 y 100 ng de DNA y se dejó en hielo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se incubaron 1 minuto y 30 segundos a 42°C en un bloque térmico sin agitación (Thermomixer comfort, Eppendorf) y seguidamente se introdujeron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se adicionó 1 ml de medio LB líquido y se dejó el cultivo bacteriano en agitación a 700 rpm durante 1 hora y 30 minutos a 37°C en el bloque térmico previamente empleado. A continuación, se centrifugó el cultivo a 460xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con el poco volumen que queda tras la decantación. Por último, se añadió a una placa Petri con medio LB-agar y el antibiótico de selección correspondiente (Ampicilina 100 µg/ml, Roche; o Kanamicina 50 µg/ml) el cultivo bacteriano transformado y se sembró con un asa de siembra esterilizada previamente en alcohol, pasada por la llama y enfriada. Una vez sembrada, la placa se dejó en una estufa a 37°C durante 24 h boca abajo para evitar la condensación.

Todas las manipulaciones relacionadas en la obtención de bacterias competentes y su posterior transformación se realizaron bajo condiciones estériles generadas por la llama de un mechero de alcohol.

3.4.3 Expansión bacteriana de vectores clonales y posterior purificación.

Una vez transformadas las bacterias competentes con el plásmido de interés se procedió a la expansión en el número de copias de él. Para ello se seleccionaron diferentes colonias y se crecieron en 20 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, según el plásmido, a 37°C o/n en un incubador con agitación. Posteriormente, se conservó a -80°C, en glicerol, 1 ml del cultivo; y se extrajo y purificó el plásmido del cultivo restante de cada colonia mediante el kit comercial NZYMiniprep® (NZYTech). Por último, se cuantificó mediante el empleo de un Nanovue® (GE Healthcare) la cantidad de plásmido obtenido.

3.4.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

Se realizaron diferentes geles de agarosa para la comprobación de las digestiones de vectores y la fosforilación y anillamiento de oligos empleados en el desarrollo de esta tesis.

Los geles de agarosa se prepararon al 1% fundiendo agarosa (Sigma) en 30 ml de tampón TAE (Tampón Tris-Acetato EDTA, Gibco). Antes de añadir la mezcla sobre el

molde, una vez enfriada ligeramente se le añadió SYBR[®] *Safe DNA gel Stain* (Invitrogen) para teñir el DNA y se agitó suavemente antes de verter la agarosa en el molde. Una vez concluida la gelificación se colocó el gel en una cubeta de electroforesis (BioRad).

Las muestras de DNA se prepararon en un volumen de 10-20 µl añadiendo tampón de carga 6x TriTrack DNA *loading Dye* (Thermo Scientific) o 10x *Loading Buffer* (Takara), 100 ng de DNA y el resto agua Mili-Q. Como marcador de pesos de DNA se empleó λ/Hind III (Invitrogen), 1KB DNA *Marker* (Biomiga) o 100bp DNA *Marker* (Biomiga). La electroforesis se realizó a 90V y 400 mA durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo se visualizaron los geles en un transiluminador Gel Doc 2000 (Biorad) o en una lampara de ultravioleta para realizar el corte de bandas.

3.4.5 Purificación bandas de DNA de gel de agarosa.

Una vez realizada la electroforesis de comprobación tras la digestión, se cortaron los fragmentos de DNA deseados del gel de agarosa al 1% y se colocaron en tubos eppendorf. La purificación fue realizada con el kit comercial NucleoSpin[®] *Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) y posteriormente se cuantificaron con un Nanovue[®] (GE Healthcare).

3.4.6 Digestión plásmidos.

Las digestiones se realizaron en tubos eppendorf en un volumen de 20 µl. En ellos se añadió 1 µl de cada enzima de restricción necesarias, 2 µl del tampón correspondiente (10x), 3 µg de vector y se completó el volumen con agua Mili-Q. Dichas digestiones se incubaron en un bloque térmico (Thermomixer comfort, Eppendorf) sin agitación según la temperatura requerida por la enzima empleada durante al menos 2h.

3.4.7 Ligación de DNA.

A la hora de ligar el vector con el inserto deseado se realizó mediante el uso de la T4 DNA ligasa (ThermoFisher) a temperatura ambiente *o/n*, con un ratio 1:4 de vector/inserto de DNA como mínimo, esta relación varió en función de las concentraciones de partida. La ligación se colocó en un eppendorf y se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo agua Mili-Q, el vector, el inserto de DNA, T4 DNA ligasa y el tampón de la enzima (10x) a la concentración final de 1x.

3.4.8 Secuenciación DNA.

Todas las muestras de DNA modificadas y purificadas se enviaron al Servicio de Secuenciación del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) para verificar la secuencia del inserto deseado.

3.5. OBTENCIÓN LÍNEAS ESTABLES DE MM DEFICIENTES EN BIM.

3.5.1 Técnica CRISPR/Cas9:

Durante el desarrollo de esta tesis se han generado diferentes líneas deficientes en algún gen concreto implicado en el desarrollo de la apoptosis, y para ello se ha empleado la técnica desarrollada por Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna denominada CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated protein-9).

Esta nueva técnica presenta grandes ventajas para la generación de modelos celulares y animales *Knock-out* frente a las técnicas previamente existentes. Brevemente, una corta guía de RNA (sgRNA), reconoce la diana en el DNA y reorienta la nucleasa Cas9 para que produzca un corte en la doble cadena del DNA que codifica la secuencia codificada en la sgRNA. En este proceso se produce la delección de un número aleatorio de bases o incluso la inserción de alguna base más, lo que desemboca en cambios de pauta de lectura, llevando a la pérdida de expresión del gen o a la expresión de proteínas no funcionales (Hsu et al., 2014)

Existen distintos tipos de sistemas similares al CRISPR-Cas9, siendo el más empleado por su interés biotecnológico el de tipo II, que se caracteriza porque el complejo encargado de llevar a cabo la degradación del DNA está compuesto por una sola proteína. Además, requiere de la participación de otra molécula de RNA pequeña, no codificante y que presenta complementariedad con el pre-crRNA y que se expresa desde un lugar cercano al locus CRISPR-Cas9.

En bacterias, el funcionamiento de este sistema de inmunidad innata puede dividirse en 3 fases. En la primera fase, cuando un virus patógeno infecta una bacteria, una parte del DNA foráneo es procesado por diferentes componentes de este sistema inmunitario en pequeños fragmentos (unas 20bps). Dichos fragmentos se incorporan a una zona del genoma de la bacteria conocida como locus CRISPR, de forma que la

infección queda memorizada para posibles futuros ataques recibiendo el nombre de *Protospacer* (Gasiunas et al., 2013). Durante la segunda fase se produce la transcripción de dichos fragmentos, además de otros componentes del sistema, generándose finalmente un precursor CRISPR-RNA o pre-crRNA, que contiene la(s) secuencia(s) de pequeño tamaño complementarias a la secuencia de DNA foráneo previamente incorporada. Dicho pre-crRNA formará una estructura tipo dúplex junto con otra molécula de RNA conocida como tracrRNA (*Trans-activating* crRNA). Esta estructura servirá para reconocer los fragmentos de DNA foráneos que presenten la secuencia complementaria a la codificada por el pre-RNA.

Por último, en la tercera fase, la nucleasa Cas9 será reclutada a la zona del DNA con secuencia complementaria a la presente en los crRNAs y producirá un corte de doble hebra en la misma (Chylinski et al., 2013). La maquinaria celular reparará la zona cortada, introduciendo frecuentemente deleciones e inserciones, debido a que el tipo de corte efectuado por Cas9 (de doble hebra) favorece la reparación por el sistema NHEJ (Non-Homologous End Joint) (Hsu et al., 2014).

3.5.2 Síntesis plásmido plentiCRISPR.v2 modificado para escindir BIM.

El principal requerimiento para que este sistema funcione en bacterias y arqueas es la presencia de una pequeña secuencia (2-5 nts) conocida como PAM (Protospacer Adjacent Motif) que se encuentra adyacente al crRNA en posición 3' la cual es esencial para que la proteína Cas9 presente especificidad (Ran et al., 2013). De hecho, incluso las secuencias totalmente complementarias son ignoradas por Cas9 en ausencia de una secuencia PAM (Sternberg et al., 2014). Se ha observado que la carencia de dichos PAM dentro de la secuencia de repeticiones directas de CRISPR es un mecanismo de defensa contra sí mismo.

En esta tesis se diseñó el crRNA para la delección de la proteína BIM. Para ello se escogió la siguiente guía complementaria (DNA) dirigida contra el centro activo del exón 3:

- 5'- CACCGCCCAAGAGTTGCGGCGTAT - 3'
- 3'- CGGGTTCTCAACGCCGCATACAAA - 5'

Dicha guía se insertó en el plásmido plentiCRISPR.v2 (**Figura 3.1**) siguiendo los pasos descritos por Shalem en su artículo de 2014 (Shalem et al., 2014).

Para el clonaje del plásmido y la guía crRNA se emplearon las enzimas BsmBI (New England Biolabs, Werfen), T4 PNK (3' phosphatase minus) (New England Biolabs, Werfen) y T4 DNA ligasa (ThermoFisher).

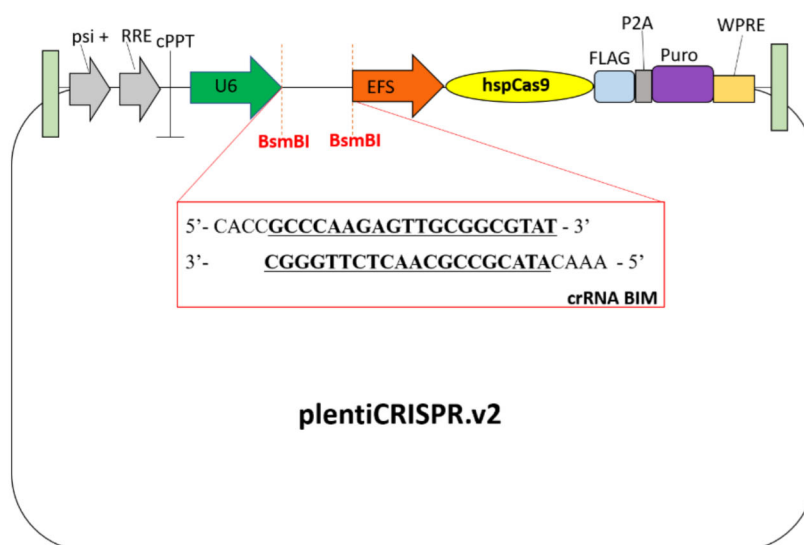


Figura 3.1. Clonaje plentiCRISPR.v2. Este plásmido contiene dos casettes de expresión, hspCas9 (amarillo) y el RNA quimérico (crRNA). Puede ser digerido por BsmBI (líneas discontinuas en rojo) y clonar un par de oligonucleótidos hibridados (cuadro rojo) diseñado para la delección de BIM. Los oligos están diseñados en base al centro activo presente en el exón 3 de BIM y flanqueados en el extremo 3' por una secuencia NGGPAM. Figura inspirada en *Shalem et al. 2014*.

3.5.3 Generación lentivirus: transfección células HEK293T.

Una vez obtenido el plásmido con la secuencia del crRNA se procedió a la generación de lentivirus en células HEK293T.

Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células HEK293T en placas de 100 mm con 10 ml de medio DMEM al 10% SFB y 1% antibiótico y se dejaron incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo se retiró el medio y se adicionó 10 ml de medio Opti-MEM al 10% SFB suplementado con cloroquina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 25 µM para inhibir el transporte autofágico, se agitaron suavemente e incubaron mientras se preparaba la mezcla de transfección.

La mezcla de transfección con PEI (Sigma-Aldrich) se preparó en 2 eppendorf independientes:

- Eppendorf A: 500 µL de **Opti-MEM** + **PEI** (1:4 respecto al DNA)
- Eppendorf B: 500 µL de **Opti-MEM** + 10 µg **DNA** (plentiCRISPR.v2 modificado con la guía crRNA BIM o ZsGreen como control) + 10µg

PAX2 (contiene las secuencias codificantes para las proteínas de la cápside vírica y retrotranscriptasa del virus) + 3 µg **MDG2** (contiene las secuencias que codifican proteínas de la envuelta del virus).

Posteriormente se añadió el contenido del eppendorf A sobre el eppendorf B y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido dicho tiempo, se añadió la mezcla gota a gota en las placas y se mantuvieron en cultivo *o/n*. A la mañana siguiente, se retiró el medio y se adicionó 10 ml de medio Opti-MEM al 10% SFB y se mantuvieron durante 48 h. La eficacia de la transfección se comprobó por microscopía de fluorescencia a través de la expresión de la proteína ZsGreen.

Por último, se recogió el medio de las HEK293T transfectadas, se centrifugó a 500 xg durante 5 min. A continuación, el sobrenadante se filtró mediante filtros de 45 µm (Pall Corporation) a un tubo cónico de 15 ml. Las suspensiones víricas se emplearon seguido o se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.5.4 Infección de células eucariotas con lentivirus.

La infección de células eucariotas, concretamente de líneas estables de MM, se realizó con los lentivirus presentes en el sobrenadante de las células HEK293T transfectadas a 48 h. Para ello, se contaron 5×10^5 células de la línea de MM que se centrifugaron a 335xg durante 5 minutos y se resuspendieron con 3 ml de la suspensión vírica filtrada. Posteriormente, se colocó en una placa de 12 pocillos y se procedió a la infección por *spin*, es decir, se centrifugó la placa a 1400xg durante 2 h 30 minutos. Tras la centrifugación se recogieron las células en un tubo cónico de 15 ml, se centrifugaron a 335xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 3 ml de medio completo. Se volvió a colocar en la placa de 12 pocillos, se añadió Polibreno® (Sigma) a 6 µg/ml y se mantuvieron en cultivo durante 24 h. Se repitió la infección al día siguiente y se dejaron durante 48 h.

Transcurrido ese tiempo, las células se seleccionaron mediante la adición de puromicina a diferentes concentraciones (1 µg/ml, 2 µg/ml y 3 µg/ml) y se dejó actuar durante 72h. A continuación, se seleccionaron las células de la concentración en la que no estaban todas muertas y se cultivaron. Finalmente, se procedió a comprobar la eliminación de la proteína deseada por *Western Blot* (**apartado 3.3.1**).

3.5.5 Obtención de líneas estables mediante clonaje por dilución límite.

Una vez comprobada la disminución de expresión de la proteína deseada a eliminar mediante *Western Blot*, se realizó una dilución límite para obtener líneas estables homogéneas en cuanto al grado de silenciamiento del gen.

Para ello, se prepararon, para 4 placas de 96 pocillos, 60 ml de medio acondicionado (60% (v/v) medio completo; 35% (v/v) medio condicionado (medio procedente de la línea estable de MM previamente centrifugado y filtrado) y un 5% (v/v) de SFB para alcanzar el 15% (v/v) de suero en el medio final). A continuación, se añadieron 200 células en el medio, se homogeneizó la mezcla y se repartieron 150 μ l a cada pocillo de las placas de 96 pocillos de fondo redondo. De este modo se logra que en algunos pocillos haya sido sembrada una única célula que crecerá gracias a las citoquinas y factores de crecimiento presentes en el medio condicionado.

Pasadas 24 h se marcaron los pocillos que contenían una única célula y las placas se mantuvieron en cultivo durante dos o tres semanas. Los clones seleccionados se fueron trasvasando a placas de 48, 24 y 6 pocillos sucesivamente en función de su proliferación y añadiendo más medio completo según la placa. Por último, se analizaron por *Western Blot* (**apartado 3.3.1**) para comprobar el silenciamiento génico. Los clones silenciados y seleccionados se cultivaron en frascos de cultivo con medio y se congeló una parte de ellos según el protocolo indicado en el **apartado 3.1.5**.

3.6. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE CÉLULAS OBTENIDAS A PARTIR DE MUESTRAS *EX VIVO* DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON MM.

3.6.1 Aislamiento células plasmáticas.

Las células plasmáticas se obtuvieron de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Dichas muestras fueron proporcionadas por la Dra. Rosana Díez del Servicio de Hematología del Hospital Miguel Servet (Zaragoza, España) y por la Dra. Gemma Azaceta del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, España).

Las muestras de aspirado de médula ósea se obtuvieron por punción de la cresta ilíaca y pertenecían a pacientes (informados adecuadamente y firmado el consentimiento

para la manipulación de su muestra por parte del grupo) de nuevo diagnóstico no sometidos a tratamiento previo, salvo alguna recaída.

Las muestras que contenían 1-2 ml del aspirado medular, presentaban contaminación con restos de tejido del estroma medular. Por ello, se diluyeron con 2-3 ml de medio RPMI 1640 GlutaMAXTM (Gibco) sin suero ni antibiótico y se añadió la mezcla sobre 4 ml de Ficoll-PaqueTM (Sigma-Aldrich) de manera lenta y con goteo, para favorecer la formación de una interfase. A continuación, se centrifugó durante 20 min a 456xg sin freno. Se recogió el anillo de células mononucleadas o interfase y se traspasó a 10 ml de medio RPMI 1640 GlutaMAXTM (Gibco) sin suero ni antibiótico para realizar un lavado. Se centrifugó a 335xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5-10 ml de medio RPMI 1640 GlutaMAXTM (Gibco) suplementado al 10% con SFB de complementado. Posteriormente se determinó la densidad y viabilidad celular (**apartado 3.1.4**) reservando una parte para realizar el inmunofenotipado (**apartado** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) y el resto se sembró en una placa de 48 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en medio RPMI 1640 GlutaMAXTM (Gibco) suplementado al 10% con SFB de complementado para evaluar su sensibilidad al inhibidor de proteasoma ixazomib (MedChemExpress) sólo o en combinación con miméticos BH3 (A-1155463, ABT-199 y S63845, MedChemExpress) durante 16 h de tratamiento. Para asegurar la viabilidad *in vitro* de las células plasmáticas se añadió IL-6 (Peprotech) a 1000 U/ml.

3.6.2 Análisis mediante citometría de flujo de la sensibilidad de células plasmáticas a fármacos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación del ensayo, las células se procesaron según el **apartado 3.2.2** para analizar la apoptosis inducida por los fármacos mediante marcaje con Anexina V. Para ello, se marcaron con anti-human-CD38-FITC (BD Biosciences), Anexina V-DY647 y 7-AAD (Biolegend), al igual que en el **apartado 3.2.2** se empleó ABB 1x como buffer de resuspensión y marcaje. Posteriormente se analizaron en el citómetro (FACScaliburTM, BD Biosciences) y se determinó el porcentaje de células marcadas con anexina y 7-AAD en la población de CD38 positivas (células plasmáticas mielomatosas).

3.7. MODELO ANIMAL ORTOTÓPICO DE MIELOMA MÚLTIPLE.

3.7.1 Combinación miméticos BH3 con el inhibidor de proteasoma ixazomib.

Tras los resultados obtenidos en los **apartado 4.3** y **4.4**, se decidió probar *in vivo* la combinación de los miméticos A-1155463 y S63845 junto al inhibidor de proteasoma ixazomib en hembras de ratón BALB/c a las cuales se les inoculó previamente 3×10^5 células de mieloma MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen. Los animales, tras la inoculación del tumor, se dividieron en 6 grupos experimentales: un control, un grupo tratado únicamente con ixazomib, un grupo tratado sólo con A-1155463, un grupo tratado con S63845, un grupo tratado con A-1155463 combinado con ixazomib, y un último grupo tratado con S63845 combinado con ixazomib (**Figura 3.2**).

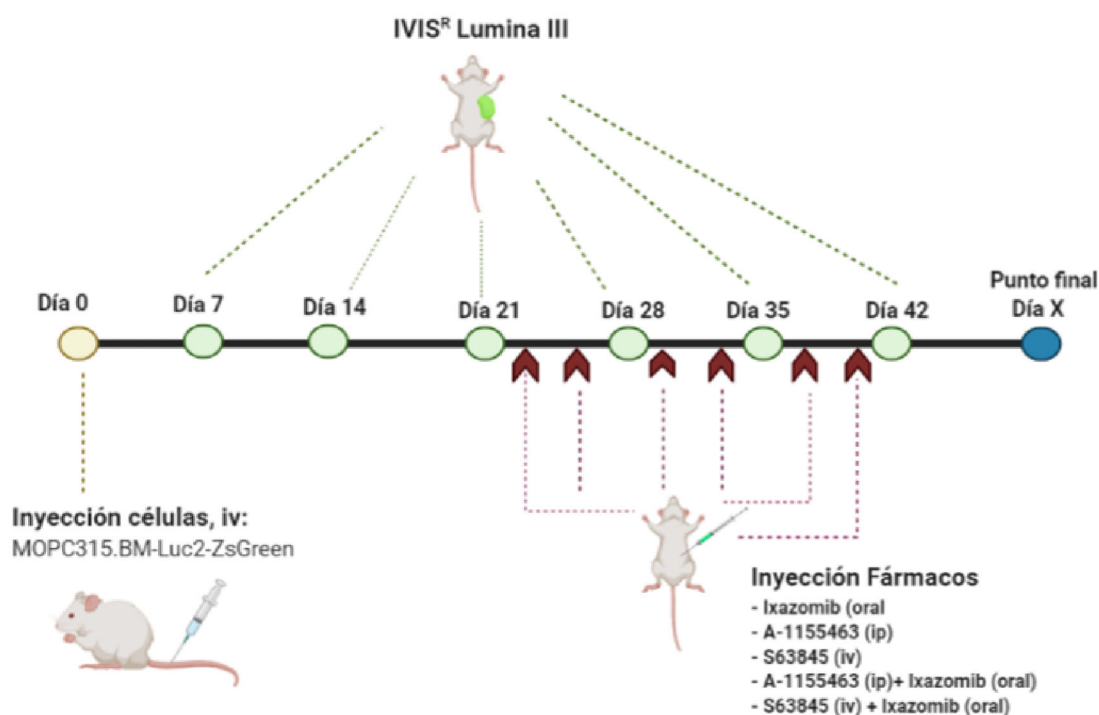


Figura 3.2. Esquema ensayo *in vivo* combinación miméticos BH3 con ixazomib. En ella se aprecia la secuencia de tiempo entre el momento de la inyección de las células tumorales (círculo amarillo) para el desarrollo del modelo de mieloma animal y los días de administración de los fármacos A-1155463 (7 mg/Kg), S63845 (7,5 mg/Kg) e ixazomib (7 mg/Kg) indicados con las flechas rojas. Los puntos verdes indican los días en los que se tomó imagen *in vivo* de la fluorescencia del tumor mediante la utilización del IVIS® Lumina III. El punto final varía entre ratones según el desarrollo de la enfermedad. Imagen realizada en la plataforma BioRender.

Cada fármaco empleado se disolvió de una forma diferente a la vez que se administró por una vía distinta, pero todos los fármacos se administraron dos veces por semana durante 3 semanas después del día 21 del establecimiento del tumor (**Figura 3.2**).

La administración de ixazomib (MedChemExpress) se realizó por vía intragástrica diluido a 1,75 mg/ml en 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (MedChemExpress) de manera que a cada individuo se le suministró 7 mg/Kg en un volumen de 100 μ l.

En cuanto al mimético BH3 A-1155463 (MedChemExpress) se administraron 50 μ l por vía intraperitoneal de una disolución con 5% de A-1155463 en DMSO (70 mg/ml), 10% etanol, 20% Cremophor® RH-40 (MedChemExpress) y 65% de dextrosa al 5% (p/v) siendo la dosis administrada a cada animal de 7 mg/Kg.

Y, por último, el mimético S63845 (MedChemExpress) se administró a cada animal 7,5 mg/Kg por vía intravenosa de una dilución al 10% de S63845 en DMSO (18,75 mg/ml), 40% PEG300 (MedChemExpress), 5% Tween-80 (MedChemExpress) y 45% PBS.

Por cada grupo experimental se incluyeron 6 individuos, acomodados en las instalaciones del animalario presente en el Centro de investigación Biomédica de Aragón (CIBA) bajo las recomendaciones europeas de ética en animales y con el permiso de la Comisión Ética de Experimentación Animal del centro de trabajo para el desarrollo de los protocolos propuestos. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura media de 24°C y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas), libres de patógenos, siendo alimentados con agua y comida *ad libitum* durante todo el estudio.

3.7.1.2 Seguimiento del tumor y punto final.

Para monitorizar el desarrollo de la enfermedad y el efecto ocasionado por la administración de los diferentes fármacos se tomó imagen cada 7 días de la señal luminiscente emitida por las células MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen mediante el empleo del aparato IVIS® Lumina III (**Figura 3.2**). Se suministraron 200 μ l de luciferina a 1mg/ml a cada individuo antes de proceder a la sedación mediante isoflurano y su colocación en el aparato.

Como criterios de punto final se establecieron la aparición de displasia abdominal, paraplejia, pérdida grave de peso o aparición de tumores extramedulares. Ante cualquier indicio nombrado anteriormente se sacrificaron los individuos mediante el empleo de CO₂ o dislocación cervical.

3.7.2 Experimentos de inmunogenicidad.

El objetivo fue vacunar hembras de ratón BALB/c con células de mieloma tratadas previamente con fármacos inhibidores del proteasoma como carfilzomib (MedChemExpress) e ixazomib (MedChemExpress) en combinación con un inhibidor de

caspasas como Z-VAD-fmk (MedChemExpress). Para ello se establecieron 5 grupos experimentales, un control; un control al que además se inyectó anti-PD1 (Bioxcell); un grupo vacunado con células tratadas con carfilzomib y Z-VAD-fmk; otro grupo igual al anterior, pero al que además se inyectó anti-PD1 y un último grupo vacunado con células tratadas previamente con ixazomib y Z-VAD-fmk. Por cada grupo experimental se incluyeron 5 individuos, acomodados en las instalaciones del animalario presente en el Centro de investigación Biomédica de Aragón (CIBA) bajo las recomendaciones europeas de ética en animales y con el permiso de la Comisión Ética de Experimentación Animal del centro de trabajo para el desarrollo de los protocolos propuestos. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura media de 24°C y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas), libres de patógenos, siendo alimentados con agua y comida *ad libitum* durante todo el estudio.

3.7.2.1 Vacunación con células de mieloma muertas.

Para la vacunación se trataron $2,5 \times 10^6$ células MOPC315.BM por condición con los diferentes fármacos como se indica en el apartado anterior durante 48 h, en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) con 10% v/v de SFB (Sigma), 1 % v/v de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y 1% v/v de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). Antes de inyectarlas en los ratones, se analizó una pequeña cantidad de cada condición por citometría de flujo con marcaje conjunto de Anexina V-FITC y 7-AAD (**apartado 3.2.2**). La muerte celular de las células empleadas para la vacunación fue en todos los casos superior al 95% de la población total. A continuación, se lavaron con medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) dos veces para eliminar las trazas de los fármacos y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) para inyectar 100 µl de la suspensión celular o 100 µl de medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) por ratón según el grupo experimental. La inyección se realizó de manera subcutánea en la piel del área dorsal, entre los hombros del animal. A continuación, se repitió la vacunación pasada una semana.

Por último, 7 días después de la vacunación, se inyectaron de manera intravenosa 5×10^5 células MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen por ratón. Para ello, se suministraron 200 µl de la suspensión de células en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) a través de la vena situada en la cola y se esperó el crecimiento tumoral. Posteriormente, a dos de los grupos se suministró 100 µg por ratón de anti-PD1 2 veces por semana durante dos semanas y media.

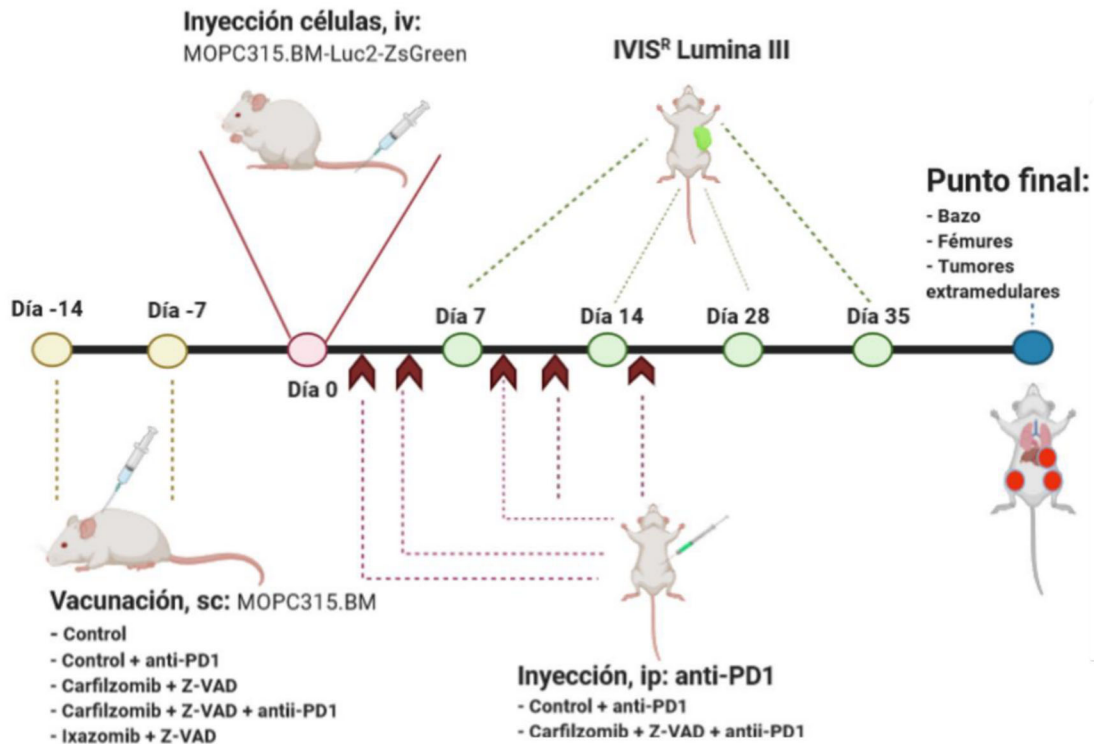


Figura 3.3. Esquema ensayo *in vivo* de vacunación en ratones. En ella se aprecia la secuencia de tiempo entre vacunas (círculos marrones) y el momento de la inyección de las células tumorales (círculo rojo) para el desarrollo del modelo de mieloma animal. Las flechas rojas indican los momentos de inyección de anti-PD1 en 2 de los grupos. Los puntos verdes indican los días en los que se tomó imagen *in vivo* mediante la utilización del IVIS[®] Lumina III. El punto final varía entre ratones según el desarrollo de la enfermedad. Imagen realizada en la plataforma BioRender.

El seguimiento del desarrollo tumoral se realizó mediante imagen *in vivo*, gracias al uso del aparato IVIS[®] Ilumina III. Se les inyectó luciferina a los ratones y se observó la intensidad de la señal y en qué lugar del animal se daba. Esta imagen se tomó durante una vez por semana hasta el punto final de cada animal (**Figura 3.3**).

3.7.2.2 Punto final y sacrificio de ratones.

En este experimento se establecieron como punto final la aparición de displasia abdominal, paraplejía, presencia de tumores extramedulares mayores de 1 cm y pérdida de peso mayor de un 10%. Conforme fueron apareciendo alguno de estos síntomas los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ y se les extrajo bazo, fémures y tibias de ambas extremidades inferiores para extraer médula ósea y tumores extramedulares existentes. Estos se recogieron en un tubo cónico de 50 ml con medio RPMI 1640 GlutaMAX[™] (Gibco) para su posterior análisis.

3.7.2.3 Aislamiento células plasmáticas de tejidos *ex vivo* de ratones.

Para el aislamiento y análisis de las células, se procesaron los tejidos recogidos de los animales. Bajo campana de flujo laminar, se depositaron los diferentes tejidos y

órganos en placas de Petri estériles que contenían medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco). En el caso del bazo y tumores extramedulares, se disgregaron con una jeringuilla estéril y se traspasaron a un tubo cónico de 50 ml a través de un tamiz celular (BD) de 70 µm, además se lavaron las placas de Petri con medio RPMI 1640 y se pasó la solución de nuevo por el filtro. En cuanto a los fémures y tibias, se limpiaron los músculos y tejido conectivo presente alrededor de los huesos intactos y se depositaron en placas Petri con medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco). Se cortaron los huesos por ambos extremos y se pasó a través de ellos, gracias a una jeringuilla de 1 ml y una aguja de 25G, medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) para recolectar las células de la médula ósea. A continuación, se traspasó la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml a través de un tamiz celular (BD) de 70 µm, y se lavaron las placas de Petri con medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) para recoger posibles residuos, y se pasó la solución de nuevo por el filtro.

Tanto los esplenocitos como las células de la médula ósea o de tumores extramedulares, se centrifugaron a 335xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón de lisis de eritrocitos ACK (NH₄Cl 154 mM, KHCO₃, 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) para eliminar los eritrocitos. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron en un volumen apropiado de medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) y se procedió a determinar la densidad y viabilidad celular. Por último, se inmunofenotiparon mediante citometría de flujo.

3.7.2.4 Inmunofenotipado muestras ratones.

Para el inmunofenotipado de las muestras extraídas de ratones se marcaron con los anticuerpos reflejados en la **Tabla 3.6**, agrupados en función de las poblaciones de interés y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences).

Se colocaron 3x10⁵ células por punto de interés de cada uno de los tejidos, se centrifugaron a 335xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se procedió a su marcaje con 100 µl de PBS al 5% de SFB y los anticuerpos correspondientes. Para visualizar la población de linfocitos, se marcó con anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8; para la población de NKs se emplearon anti-NK1.1 y anti-CD45 y, por último, se marcaron con CD138 y se enfrentó a la propia fluorescencia de las células MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen para visualizar el porcentaje de mieloma en cada tejido.

Tabla 3.6. Anticuerpos empleados en inmunofenotipado de poblaciones en muestras de animales. En ella se muestran los anticuerpos empleados para el inmunofenotipado de los tejidos recogidos de los ratones para establecer las poblaciones de linfocitos, NKs y mieloma, presentes en cada uno de ellos.

ANTICUERPO	TIPO, ESPECIE	ESPECIE DIRIGIDA	PROVEEDOR y REFERENCIA	LONGITUD EXCITACIÓN Y EMISIÓN
CD3-APC- CyTM7 (clon 17A2)	mc, Rata	Ratón	BD Biosciences, 560590	$\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 785 \text{ nm}$
CD4-PE (L3T4 H129.9)	mc, Rata	Ratón	BD Biosciences, 553653	$\lambda_{ex} = 496 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$
CD8-PE (clon 53-6.7)	mc, Rata	Ratón	BD Biosciences, 553032	$\lambda_{ex} = 496 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$
NK1.1-PE (clon PK136)	mc, Ratón	Ratón	BD Biosciences, 553165	$\lambda_{ex} = 496 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$
CD45-FITC (clon RA3-6B2)	mc, Rata	Ratón	BD Biosciences, 553088	$\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$
CD138-APC (clon 281-2)	mc, Rata	Ratón	BD Biosciences, 558626	$\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$

3.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LOS DATOS.

3.8.1 Análisis de los datos de citometría de flujo.

Los resultados obtenidos en todas las citometrías de flujo fueron evaluados con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 8.3.0.

3.8.2 Análisis estadístico de los datos.

La interpretación, representación y análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism 8.3.0 (GrandPath Software, Inc., San Diego, CA, USA). Como se indica en cada caso, los datos fueron analizados estadísticamente mediante el uso de las siguientes pruebas estadísticas:

- **t-Student o t-test desapareada de dos colas** para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos.

- **t-Student o t-test pareada de dos colas** para el análisis de dos grupos con emparejamiento o emparejado de muestras.
- **ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Tukey** para la corrección de múltiples comparaciones, cuando se compararon más de 2 grupos.
- **Two-ANOVA con posprueba de Dunnet** para las diferencias entre la media de cada nivel de factor y la media de un grupo de control.
- **Prueba de Mantel-Cox (Log-rank)** para el análisis de supervivencia de las curvas de Kaplan-Meier.

Todas las mediciones se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) y su significancia fue determinada en función de los siguientes valores:

- * si el p-valor $< 0,05$
- ** si el p-valor $< 0,01$
- *** si el p-valor $< 0,001$

3.8.3 Análisis del efecto combinatorio de drogas.

Se empleó el cálculo del índice de Bliss o Bliss Score. Este cálculo se basa en el estudio de Bliss (Bliss, 1939). En él se supone mecanismos de acción independientes de los diferentes fármacos empleados. Las sinergias se detectan comparando los datos obtenidos de una combinación con el efecto aditivo calculado (sumando el efecto de cada fármaco individual). Para ello, se restan los valores calculados de inhibición aditiva a la inhibición medida por la combinación para obtener los valores de diferencia final. El valor de la resta final es el indicativo de sinergia, antagonismo o aditividad. Si los valores son positivos ≥ 10 indican sinergia y si son positivos < 10 muestran aditividad; mientras que los valores negativos indican antagonismo.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DEL PROTEASOMA IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE.

El mieloma múltiple se caracteriza por la sobreproducción y acumulación de inmunoglobulinas por parte de las células mielomatosas. Esta característica puede ocasionar estrés celular y desembocar en la inducción de la apoptosis. Para evitar esta muerte celular, las células poseen un potente mecanismo de eliminación de proteínas mal plegadas, que son degradadas en un complejo denominado proteasoma. Este mecanismo de protección se puede revertir en las células malignas mediante el uso de inhibidores específicos de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, como es el caso de ixazomib, y desencadenar la apoptosis en dichas células.

Ixazomib está aprobado en combinación con dexametasona y lenalidomida en el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple que han recibido como mínimo una terapia previa y, está en estudio como posible tratamiento en nuevos diagnósticos (Shirley, 2016). En tumores sólidos hay estudios que aseguran que este fármaco provoca la apoptosis en células de carcinoma hepatocelular entre otros, además de la parada del ciclo celular en la fase G2/M (Augello et al., 2018). Pero a pesar de estos datos, se desconoce en profundidad el mecanismo por el que se induce apoptosis mediante el tratamiento con ixazomib en células de mieloma, por lo que se analizó este compuesto en diferentes líneas celulares establecidas de mieloma.

4.1.1 Ixazomib induce inhibición de la proliferación en líneas celulares de mieloma múltiple.

En el desarrollo de esta tesis se estudió el efecto de ixazomib en las líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929, MM.1S, OPM-2, RPMI8226 y U266. En primer lugar, se analizó la inhibición de la proliferación mediante el método de Mossman (MTT) a 24 y 48 horas y diferentes dosis de ixazomib (**Figura 4.1**).

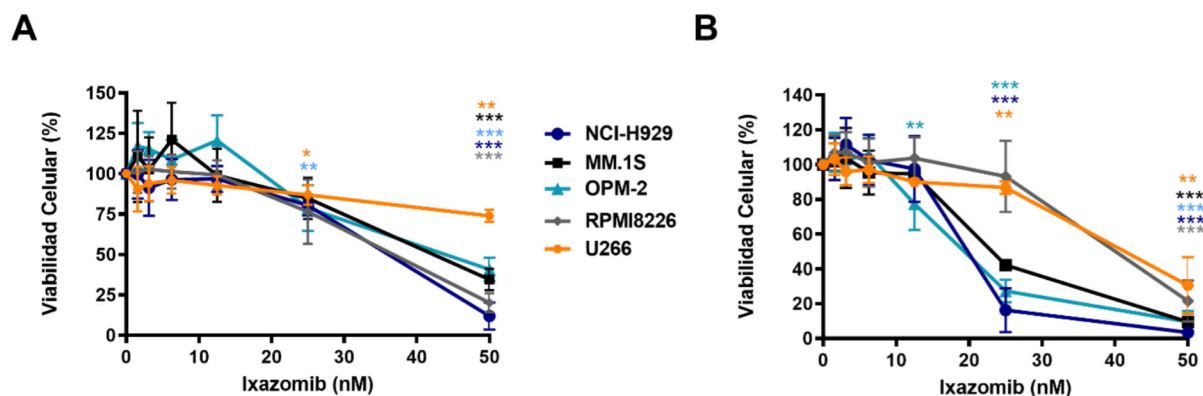


Figura 4.1. Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con ixazomib. Las líneas de mieloma múltiple NCI-H929, MM1.S, OPM-2, RPMI8226 y U266 se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib (0 a 50 nM). **(A)** Resultado de la determinación de la viabilidad mediante el método MTT a las 24h. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto el control. **(B)** Resultado de la determinación de la viabilidad mediante el método MTT a las 48h. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Los resultados obtenidos mostrados en la **Figura 4.1** nos permiten determinar que la sensibilidad a ixazomib varía según la línea celular y el tiempo. A 24h (**Figura 4.1A**) la línea más resistente es U266 con una concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) superior a 50 nM, seguida de MM.1S y OPM-2 con 45 nM como IC₅₀, y, por último, RPMI8226 y NCI-H929 cuya IC₅₀ es 37 nM. Transcurridas 48 h (**Figura 4.1B**), la línea U266 sigue siendo la más resistente (IC₅₀= 45 nM) seguida de las líneas RPMI8226 (IC₅₀= 40 nM), MM.1S (IC₅₀= 23 nM) y posteriormente por OPM-2 y NCI-H929 ambas con un IC₅₀= 20 nM. Estas diferencias en la sensibilidad a ixazomib pueden ser debidas a las alteraciones genéticas que presentan estas líneas celulares como se describió en el trabajo llevado a cabo por Chauhan *et al.* 2011, entre las que destacaría la traslocación t(11;14) de las U266 la cual confiere mayor resistencia, seguida por la traslocación t(14;16) de MM.1S y RPMI8226, y siendo las más vulnerables las líneas que presentan la traslocación t(4;14) como OPM-2 y NCI-H929 (Manier et al., 2017; Smith et al., 2016).

Dentro de la misma clasificación de resistencia respecto a las traslocaciones que poseen, se ve que existen diferencias entre aquellas que tienen la misma traslocación, como puede ser OPM-2 y NCI-H929 o entre MM.1S y RPMI8226. La plasticidad génica del mieloma puede ser el causante de esta disparidad entre traslocaciones y dentro de las mismas, ya que como se ha descrito en diferentes artículos las células de mieloma

múltiple sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 (Gong et al., 2016; Kotschy et al., 2016; Kumar, Kaufman, et al., 2017). Este punto se estudia con mayor profundidad en esta tesis en el **apartado 4.2**.

Por otro lado, este estudio nos permite comparar la efectividad *in vitro* de los diferentes inhibidores de proteasoma que se emplean en la clínica. Observamos que ixazomib necesita de dosis más altas (IC_{50}) que bortezomib ($IC_{50}=4$ nM a 14 nM) (Balsas et al., 2009) y carfilzomib ($IC_{50}=4$ nM, 5 nM o 18 nM) (Jarauta, 2015). Este hecho puede ser consecuencia de las cinéticas de unión de cada uno de los IP y su tiempo de vida media. Aunque su afinidad de unión al proteasoma es mayor al resto de IP, ixazomib presenta un tiempo de vida media de 18 minutos, a diferencia de carfilzomib (30 min) o bortezomib (110 min), por lo que al permanecer menor tiempo unido se necesita más dosis para alcanzar el mismo efecto, como se recoge en trabajos anteriores (Hasinoff, 2018; Teicher & Tomaszewski, 2015).

4.1.2 Ixazomib a bajas dosis aumenta la actividad del proteasoma.

En la **Figura 4.1A** observamos que en las líneas MM.1S y OPM-2 a dosis bajas (5 nM a 15 nM) de ixazomib se produce un aumento de la proliferación. Este efecto puede deberse a la activación de la UPR (*Unfolded Protein Response*, respuesta a proteínas mal plegadas) para evitar el estrés del RE por la acumulación de proteínas mal plegadas debida a la inhibición del proteasoma y evitar la inducción de apoptosis (Obeng et al., 2006). La respuesta UPR, inducida para compensar la cantidad de proteínas mal plegadas, puede implicar un aumento de la actividad de los proteasomas a pesar de que estos estén inhibidos. La activación de la UPR conduce a la detención del ciclo celular e induce apoptosis cuando se tratan de manera prolongada las células con IPs; sin embargo, ante un estímulo reversible o en un periodo corto de tiempo promueve la supervivencia celular (Kubiczkova et al., 2014; Obeng et al., 2006). Aunque las células de mieloma pueden adaptarse a la presencia del inhibidor de proteasoma mediante cambios proteómicos, concretamente en el metabolismo redox y energético, en el plegamiento y destrucción de proteínas o en la apoptosis y transcripción, independientemente de si el proteasoma está activo o no (Soriano et al., 2016). Según el trabajo de Soriano *et al.* 2016, la resistencia a los inhibidores de proteasoma conlleva un cambio complejo de múltiples proteínas que participan en los procesos anteriormente mencionados, entre los que destaca la sobreexpresión de proteínas del proteasoma por el factor nuclear 2 (NRF2) o la expresión de niveles bajos de IRE y XBP1.

Existen trabajos anteriores en los que han demostrado la pérdida y recuperación de la actividad del proteasoma a lo largo del tiempo después del tratamiento con diferentes IPs (Hurchla et al., 2013; Shen et al., 2021). Si nos fijamos en la **Figura 4.2A**, apreciamos un aumento significativo de la actividad del proteasoma a la dosis 10 nM a 24 h en la línea OPM-2. Posteriormente decae dicha actividad, lo cual correlaciona con la hipótesis planteada de supervivencia celular al aumentar la UPR para evitar la apoptosis.

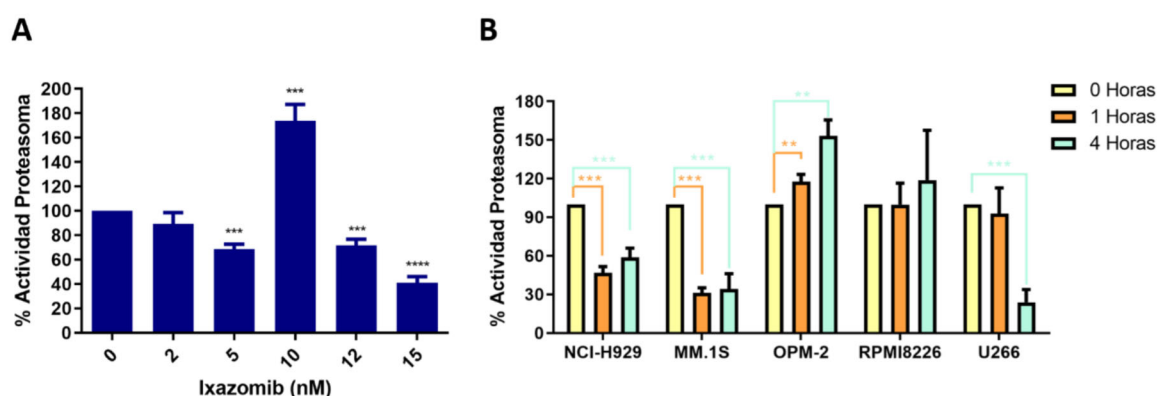


Figura 4.2. Determinación de la actividad del proteasoma en líneas de mieloma múltiple tras el tratamiento con ixazomib. Para determinar la actividad del proteasoma se sembraron 3×10^4 células por condición durante los tiempos indicados. Posteriormente se siguió el protocolo establecido en el kit comercial 20s Proteasome Activity de Chemicon® para medir a una $\lambda=380$ nm de excitación y recoger la emisión a $\lambda=460$ nm. **(A)** Inhibición de la actividad del proteasoma en la línea OPM-2 al tratarla con bajas concentraciones de ixazomib durante 24 h. Los resultados son la media \pm SD de $n=2$ y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto el control *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** Inhibición de la actividad del proteasoma por ixazomib a tiempos cortos en las líneas de mieloma múltiple NCI-H929, MM.1S, OPM-2, RPMI8226 y U266. Las concentraciones de inhibidor de proteasoma empleadas han sido en la línea NCI-H929 15 nM; MM.1S, OPM-2 y RPMI8226 con 25 nM y U266 con 50 nM. Los resultados son la media \pm SD de $n=2$ y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto el control ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

El aumento de la actividad de proteasoma observado en la línea OPM-2 a 24 h no es el único. A tiempos cortos (1 h y 4 h), este aumento de actividad se produce también en la línea RPMI8226 como se muestra en la **Figura 4.2B**. La línea RPMI8226 parece mantener la actividad en la primera hora del tratamiento (25 nM ixazomib) con una ligera subida posterior, pero no significativa, de la actividad a las 4 horas. En cambio, la línea OPM-2 muestra que a dosis más altas (25 nM) en tiempos cortos (1 h y 4 h) se produce un aumento de la actividad del proteasoma que posteriormente decae a tiempos largos (24 h). Por otro lado, las líneas NCI-H929 y MM.1S presentan una disminución de la actividad del proteasoma que se observa ya a tiempos muy cortos tras la adición de

ixazomib. Este hecho descarta que el aumento en la proliferación esté relacionado con un aumento en la actividad del proteasoma ya que en la línea MM.1S se observa un aumento en la proliferación, pero ixazomib inhibe la actividad del proteasoma incluso a tiempos cortos. Los datos obtenidos en la **Figura 4.2B** sobre la línea MM.1S (reducción al 30% de la actividad a 1 h y 4 h) coinciden con los resultados obtenidos en el trabajo de Chauhan *et al.* 2011, donde obtienen una reducción al 25% de la actividad quimiotripsina del proteasoma a las 3 h al tratar las células con 20 nM de ixazomib. Y, por último, U266 mantiene la actividad en la primera hora, pero posteriormente disminuye de manera significativa a pesar de ser la línea más resistente frente a ixazomib.

El aumento de actividad del proteasoma, así como la sensibilidad de las células a ixazomib puede ser debido no solo a la activación de la UPR sino también a la modulación de la subunidad PA28 α del proteasoma 11S el cual tiene una mayor expresión en células plasmáticas malignas. La subunidad PA28 α , sobreexpresada en las líneas de mieloma y en células de pacientes, es importante en la proliferación de dichas células y para la respuesta a los inhibidores de proteasoma, además de asociarse con la evolución de las diferentes etapas y la progresión tumoral (Gu et al., 2020). Si se inhibe PA28 α , se detiene la estimulación de la actividad del proteasoma 20S por parte de esta subunidad y, por tanto, las células de mieloma presentan una mayor sensibilidad a los IPs. Al emplear tiempos cortos o dosis bajas puede darse el caso de que se inhiba principalmente las subunidades 20S del proteasoma 26S y que en el proteasoma 11S no llegue a inhibirse por la estimulación de la subunidad PA28 α que está sobreexpresada en células de mieloma.

Por tanto, ixazomib disminuye la actividad del proteasoma en función de la dosis empleada, el tiempo y según la línea celular, llegando incluso a promover la actividad de este a dosis bajas o tiempos cortos en algunos casos, pero de manera independiente a la sensibilidad que presentan las líneas celulares a dicho fármaco, aunque el mecanismo exacto necesita de una mayor profundización.

4.1.3 Ixazomib induce la traslocación de fosfatidilserina.

Los resultados mostrados en la **Figura 4.1** podrían indicar un efecto citostático o citotóxico de ixazomib sobre las células de mieloma. En un estudio anterior ya se comentó que ixazomib produce un efecto citotóxico en líneas de mieloma y de hepatocarcinoma (Augello et al., 2018). Para comprobar si ixazomib induce muerte celular, concretamente

apoptosis, se midió por citometría de flujo la exposición de fosfatidilserina (PS) con Anexina V en el panel de líneas de mieloma.

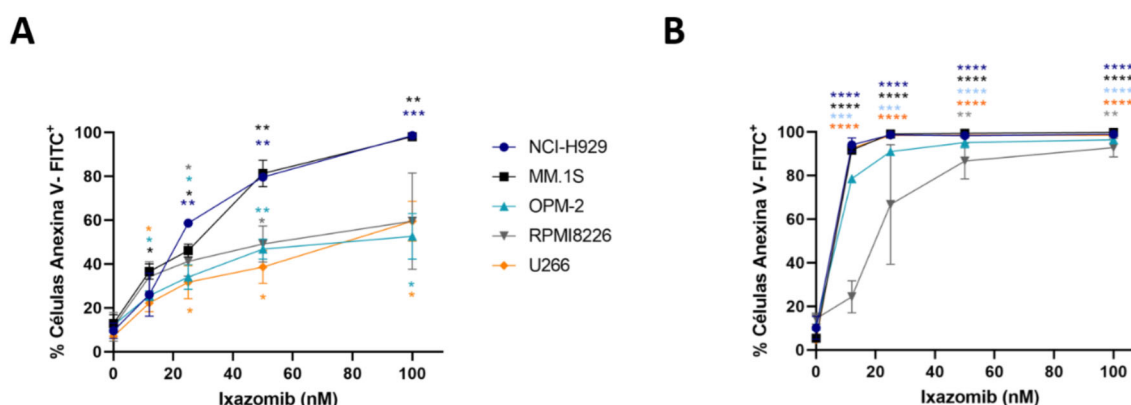


Figura 4.3. Determinación de la exposición de fosfatidilserina en líneas de mieloma tratadas con ixazomib a 24 h (A) y 48 h (B). Las líneas de mieloma múltiple NCI-H929, MM1.S, OPM-2, RPMI8226 y U266 se sembraron a 3×10^5 células por condición y se trataron durante 24 o 48 h con concentraciones crecientes de ixazomib (0 a 100 nM). Posteriormente se marcaron con Anexina V-FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SD de $n=2$ y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto el control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En la **Figura 4.3A** podemos apreciar como ixazomib induce exposición de fosfatidilserina en todas las líneas de mieloma estudiadas. A las 24 h se diferencian dos grupos de líneas celulares según su sensibilidad a ixazomib. Por un lado, las líneas NCI-H929 y MM.1S alcanzan porcentajes de muerte celular en torno al 90% a 100 nM del IP, mientras que las líneas OPM-2, RPMI8226 y U266 no superan el 50% de muerte celular a dosis superiores a 50 nM pareciendo alcanzar un efecto máximo sin incrementar la toxicidad a pesar de aumentar la dosis de ixazomib. Por lo tanto, estos resultados indican que el efecto de reducción de viabilidad observado en el ensayo MTT se debe a un efecto citotóxico puesto que las IC_{50} establecidas anteriormente corresponden con dosis donde ya existe muerte celular como puede observarse en la **Figura 4.3A**.

A las 48 h del tratamiento con el IP (**Figura 4.3B**), la dosis mínima de ixazomib resulta muy tóxica hasta alcanzar niveles superiores del 90% de mortalidad en las líneas NCI-H929, MM.1S y al contrario que pasaba a las 24 h, la línea U266 se vuelve muy sensible. La línea OPM-2 es algo menos sensible que las tres anteriores, pero necesita solo de una dosis de 25 nM para alcanzar más del 90% de muerte. Por otro lado, destaca la línea RPMI8226, la más resistente al tratamiento con ixazomib a largo plazo, necesitando de 50 nM para obtener más de un 80% de muerte.

4.1.4 Ixazomib como posible tratamiento alternativo a células resistentes a bortezomib.

En la clínica se ha observado la existencia de resistencias a los inhibidores de proteasoma, principalmente a bortezomib (Chen et al., 2011; Kuhn et al., 2007; Ri et al., 2010). De ahí la síntesis de IPs de segunda generación como carfilzomib o de tercera como ixazomib.

Cuando tratamos células RPMI8226 resistentes a bortezomib (Balsas et al., 2012) con ixazomib (**Figura 4.4A**) a dosis bajas no produce muerte celular. Pero al ir aumentando la dosis comienza a verse un ligero incremento en esta. Bortezomib e ixazomib pertenecen a la misma clase estructural y actúan a través del mismo mecanismo reversible (Muz et al., 2016). Al tratarse de IPs similares (ácidos bóricos) es comprensible que ixazomib no tenga efecto en células ya resistentes a bortezomib como se observó previamente en el trabajo de Allmeroth *et al.* 2021 donde células de mieloma seleccionadas por resistencia con bortezomib eran resistentes hasta dosis de 50 nM de ixazomib.

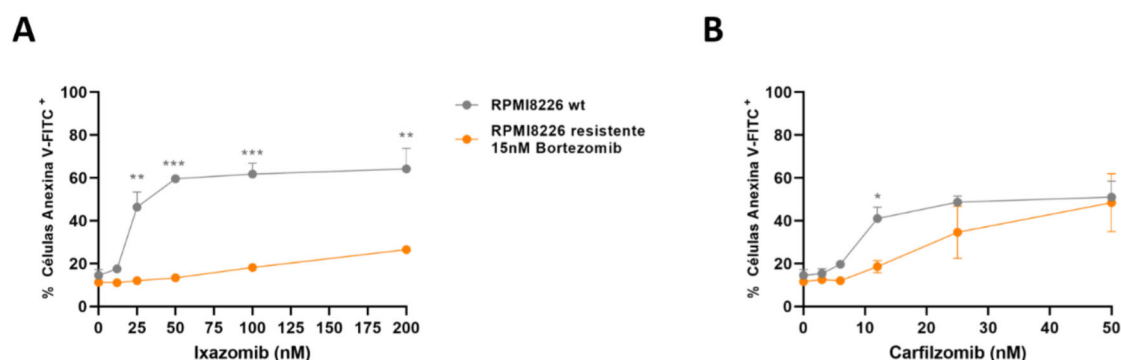


Figura 4.4. Determinación de la resistencia a otros IPs en células de mieloma múltiple resistentes a bortezomib. En este ensayo se sembraron 3×10^5 células y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib (0 a 200 nM) o carfilzomib (0 a 50 nM). Diferencias en el tratamiento con ixazomib (**A**) y carfilzomib (**B**) entre la línea RPMI8226 *wild type* (wt) y la línea RPMI8226 resistente a 15 nM de bortezomib. Los resultados son la media \pm SD (n=3) y su significancia mediante el análisis estadístico de *t-test* de cada concentración de ixazomib respecto a la línea RPMI8226 *wild type* siendo * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

En cambio, cuando las mismas células se tratan con carfilzomib (**Figura 4.4B**), a partir de 10 nM se observa un incremento de la muerte celular, tanto de las células RPMI8226 *wild type* (wt) como de las células resistentes a bortezomib tratadas con las mismas dosis de carfilzomib. Carfilzomib es un IP que se une de manera irreversible al proteasoma, por lo que a altas dosis da igual que las células sean resistentes a un IP previo

(Hurchla et al., 2013; Kuhn et al., 2007). En la actualidad el uso de carfilzomib en pacientes resistentes a un tratamiento previo con bortezomib está aprobado (Berenson et al., 2014).

La diferencia de acción de carfilzomib e ixazomib está principalmente en el mecanismo de unión al proteasoma, ya que se ha determinado con anterioridad que la resistencia a bortezomib se puede superar inhibiendo las subunidades $\beta 5$ y $\beta 2$ del proteasoma simultáneamente y de manera específica (Besse et al., 2019). Carfilzomib e ixazomib tienen mayor afinidad por la subunidad $\beta 5$ y aunque pueden inhibir las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ del proteasoma, la vida media de cada uno es diferente (Hasinoff, 2018; Muz et al., 2016). Ixazomib presenta una vida media muy corta por lo que la inhibición simultánea de las subunidades $\beta 5$ y $\beta 2$ del proteasoma no se prolonga en el tiempo y por tanto no se supera la resistencia a bortezomib. En cambio, carfilzomib se une de manera irreversible y tiene una vida media superior a 30 min facilitando esa inhibición simultánea de las subunidades del proteasoma y por ello superar la resistencia a bortezomib, incluso con dosis más bajas que ixazomib.

4.1.5 Ixazomib induce apoptosis dependiente de caspasas.

Las caspasas son las proteínas ejecutoras de la apoptosis y previamente se ha establecido que bortezomib y carfilzomib ocasionan apoptosis mediada por la activación de caspasa-3, 8 y 9 a través de la estabilización de la vía p53 (Muz et al., 2016; Tundo et al., 2020). Además, en el trabajo de Chauhan *et al.* 2011 se describe que ixazomib induce señales dependientes e independientes de mitocondrias y que la apoptosis se lleva a cabo principalmente por la activación de caspasas. Esta afirmación queda confirmada tras el análisis realizado de la participación de caspasas en la muerte inducida por ixazomib en esta tesis.

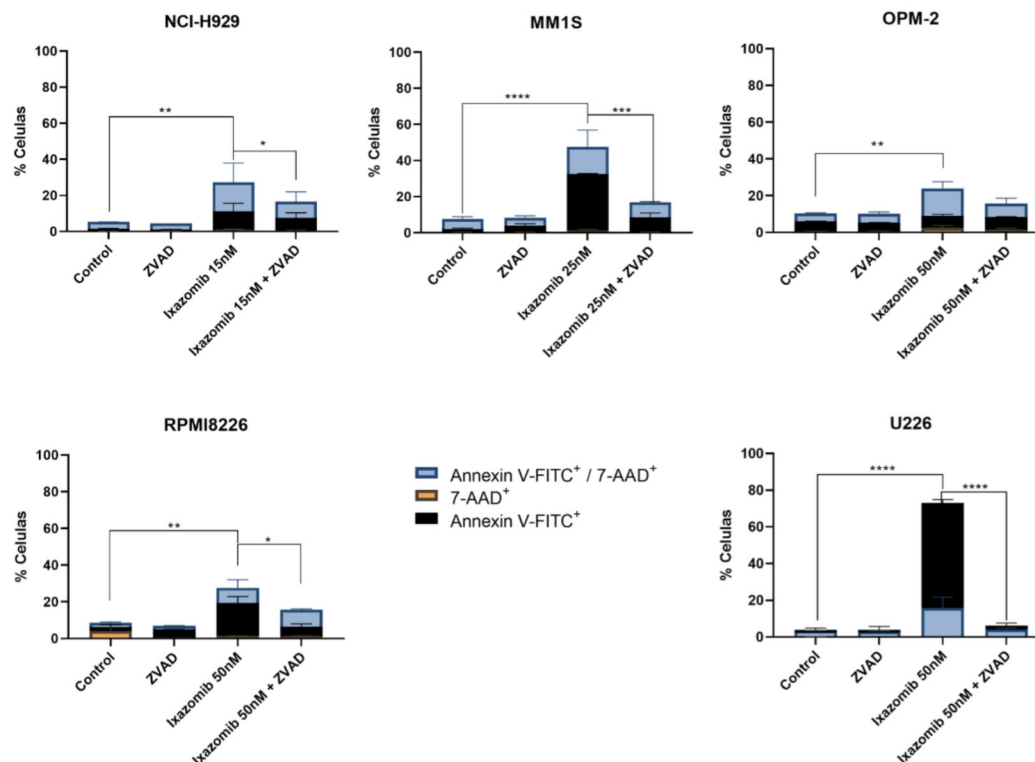


Figura 4.5. Efecto de Z-VAD-fmk en la muerte inducida por ixazomib en líneas de mieloma múltiple.

La concentración de Z-VAD-fmk en todas las líneas es de 50 μ M. En este ensayo se sembraron de cada línea 2×10^5 células por condición de tratamiento y tras 24 h con las dosis de ixazomib indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SD de cada marcaje de $n=2$ en las líneas MM.1S, OPM-2, RPMI8226 y U266, y de $n=3$ en la línea NCI-H929. La significancia de los resultados está obtenida mediante un análisis estadístico *t-test*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Tras los resultados en trabajos anteriores, se comprobó que esta protección ante el efecto citotóxico de ixazomib se produce en todas las líneas de mieloma múltiple disponibles, al añadirse Z-VAD-fmk durante el tratamiento del IP durante 24 h. En la ;Error! No se encuentra el origen de la referencia. se aprecia que la protección que ejerce Z-VAD-fmk es mayor en las líneas U266 (tratada con 50 nM de ixazomib) y MM.1S (tratada con 25 nM de ixazomib). Respecto a NCI-H929 (tratada con 15 nM de ixazomib) la protección es menor que en las líneas anteriores, pero también reduce el efecto citotóxico de ixazomib. Si nos fijamos en OPM-2 y RPMI8226 ambas tratadas con 50 nM de ixazomib la protección ejercida es menor a la que se produce a la misma dosis en la línea U266. Anteriormente, en trabajos de este laboratorio, se ha visto que la línea U266 siempre muestra mayor protección cuando se administra un IP y el inhibidor de caspasa Z-VAD-fmk (Balsas Clavería, 2011; Jarauta, 2015; Serrano del Valle, 2020).

Además se estableció que Z-VAD-fmk es capaz de reducir a la mitad el efecto ocasionado por carfilzomib en las líneas MM.1S y MOPC315.BM (Jarauta, 2015; Serrano del Valle, 2020), en contraste con la reducción parcial que presenta la línea MM.1S ante el tratamiento conjunto de Z-VAD-fmk y bortezomib (Balsas Clavería, 2011). A pesar de que bortezomib es un IP reversible, al igual que ixazomib, el efecto protector de Z-VAD-fmk frente a este último es más similar al observado con carfilzomib. Por otro lado, en la línea NCI-H929 existe cierta controversia entre los resultados obtenidos ante la protección al efecto de carfilzomib si se inhiben las caspasas con el inhibidor pancaspasa Z-VAD-fmk (Jarauta, 2015; Serrano del Valle, 2020) probablemente debida a la inestabilidad genética de las líneas de mieloma que puede dar lugar a cambios en su comportamiento. En cambio, ante el tratamiento con bortezomib, Z-VAD-fmk llega a reducir un 40% la muerte en esta línea (Balsas Clavería, 2011). La inhibición de la apoptosis por Z-VAD-fmk en la línea RPMI8226 es similar, indiferentemente de si se trata de bortezomib o ixazomib. Todas estas variaciones seguramente se deban a características propias de las células.

Otros autores han descrito que Z-VAD-fmk protege ante la acción del inhibidor de proteasoma bortezomib en mieloma, aunque este papel se ejerce indiferentemente de la línea celular o tipo celular (Ando et al., 2014; Iskandarani et al., 2016; Sha & Goldberg, 2020; M. Wang et al., 2008). Las diferencias de protección ante los diferentes inhibidores de proteasoma al inhibir las caspasas con el inhibidor pancaspasa Z-VAD-fmk probablemente se deba a las diferencias moleculares de cada uno de los IP. Aunque, estas diferencias pueden ser por el nivel de activación de caspasa-3 como se vio anteriormente entre carfilzomib y bortezomib en el trabajo del Dr. Alfonso Serrano del Valle (Serrano del Valle, 2020).

Además, podemos diferenciar el tipo de muerte que se aprecia en cada una de las líneas celulares al ser tratados con la combinación de ixazomib y Z-VAD-fmk. En todas las líneas estudiadas el tipo de muerte predominante es la apoptosis, puesto que solo se observa marcaje con Anexina V-FITC (indicador de apoptosis) o doble marcaje Anexina V-FITC y 7-AAD (marcador de ácido nucleico cuando la membrana plasmática está dañada) independientemente del tratamiento en combinación o individual. No se detecta un porcentaje significativo de células marcadas sólo con 7-AAD (indicativo de necrosis), por lo que podemos suponer que la muerte inducida por ixazomib en líneas de mieloma es solo por apoptosis y a través de la activación de caspasas. Destaca la línea U266 al

presentar una protección prácticamente total por parte de Z-VAD-fmk, mientras que el resto de líneas analizadas parecen tener además activada una ruta de muerte independiente de caspasas. Una posible explicación a la muerte independiente de caspasas se encuentra en el trabajo de Ramakrishnan donde se describió que bortezomib induce estrés celular por la inhibición de la proteólisis causando roturas en el DNA, ROS y activación de la vía extrínseca de apoptosis a través de la estimulación de JNK, además de la apoptosis mitocondrial como mecanismo principal (Ramakrishnan & Mager, 2018).

Ante estos resultados se establece que el mecanismo de muerte celular en respuesta a ixazomib se realiza principalmente a través de la apoptosis dependiente de caspasas, aunque en algunas líneas celulares parece activarse también mecanismos independientes de caspasas.

Una vez establecido el papel de las caspasas en la muerte inducida por ixazomib se analizó la activación de caspasa-3. Para ello se llevó a cabo un estudio temporal durante 48 h, tomando muestras a 0, 6, 24 y 48 h de incubación de las células de mieloma con ixazomib en presencia o ausencia de Z-VAD-fmk, para analizar la activación de caspasa-3 mediante citometría de flujo empleando un anticuerpo específico de caspasa-3 activa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.6**.

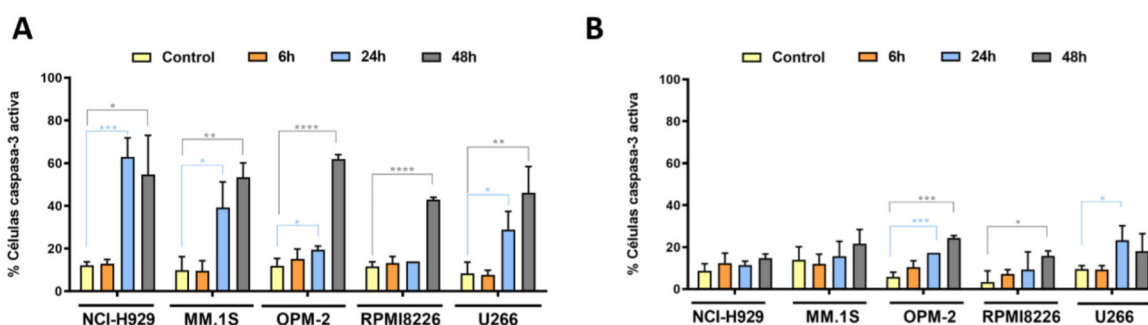


Figura 4.6. Determinación de la activación de caspasa-3 en líneas de mieloma múltiple tras el tratamiento con ixazomib en presencia y ausencia de Z-VAD-fmk. En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición y se trataron con ixazomib en ausencia (A) o presencia (B) de Z-VAD-fmk (50 μ M). Las dosis empleadas fueron 15 nM en NCI-H929, 25 nM en MM.1S, OPM-2 y RPMI8226, y, por último, 50 nM en U266. A los tiempos indicados se recogieron las células y se marcaron para un posterior análisis mediante citometría de flujo con anticuerpo anti-caspasa-3-activa-FITC. Los resultados son la media \pm SD de cada marcaje de $n=3$ en todas las líneas y la significancia está obtenida mediante análisis de *t-test* respecto el control de cada línea. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La activación de caspasa-3 se observa principalmente a partir de las 24 h de tratamiento con ixazomib en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266. En las líneas OPM-2 y RPMI8226 esta activación es más tardía, a las 48 h, como se observa en la **Figura 4.6A**. Esta activación está relacionada con la sensibilidad que presentan las líneas celulares al inhibidor de proteasoma ixazomib. La línea NCI-H929 es la más sensible al IP con una dosis inferior (15 nM) y es la que mayor nivel de activación presenta de caspasa-3 a las 24 h seguida de MM.1S. Las líneas OPM-2 y RPMI8226 ambas son más resistentes, lo que puede ser debido a que la activación de la caspasa-3 se da sobre todo a partir de las 48 h. Resalta la línea U266 que, siendo la más resistente a ixazomib, presenta una activación temprana al igual que NCI-H929 y MM.1S a las 24 h de caspasa-3, pero en menor medida que estas. Una posible explicación podría ser que existan diferencias en los niveles de expresión de XIAP siendo más elevados en la línea U266, pero esta hipótesis queda descartada por el trabajo de Gómez-Benito *et al.* 2007, donde se muestra que las 5 líneas de mieloma presentan altos niveles de XIAP basales y similares entre ellas.

En cambio, en presencia de Z-VAD-fmk (**Figura 4.6B**), la activación de caspasa-3 se da a muy bajo nivel y se produce a las 48 h en general, aunque hay excepciones. En la línea NCI-H929 la presencia de Z-VAD-fmk impide la activación de caspasa-3 por lo que se mantienen niveles bajos de actividad de esta proteína próximos al estado basal. Destaca la línea U266 la cual produce activación de caspasa-3 en un porcentaje pequeño, pero significativo, a 24 h en presencia de Z-VAD-fmk. Se ha descrito que la caspasa-3 puede estar activada, a pesar de que se traten las células con un inhibidor pan-caspasa, si ixazomib produce un efecto muy rápido como se ha visto con inhibidores de fosfatasa (Fladmark *et al.*, 1999). Otra alternativa es la comentada en este mismo apartado, que bortezomib sea capaz de activar la vía extrínseca con su consecuente activación de caspasa-3 (Ramakrishnan & Mager, 2018). Aunque Z-VAD-fmk inhibiría la vía extrínseca, esta activación de caspasa-3 puede darse a tiempos muy cortos (10 min) después de que se induzca la activación de los receptores mortales (Fladmark *et al.*, 1999), antes de que Z-VAD-fmk tenga efecto.

Los resultados de este ensayo demuestran que ixazomib induce apoptosis a través de la activación de caspasa-3, pero no determina si esta activación se realiza por vía mitocondrial o extrínseca. Existen inhibidores de proteasoma que son capaces de activar ambas caspasas (-8 y -9) como el caso de LC53-0110 y su análogo (Park *et al.*, 2016).

Además, Chauhan y su equipo demostraron la capacidad de ixazomib de activar las vías apoptóticas intrínseca (caspasa-9) y extrínseca (caspasa-8) en las líneas NCI-H929 y MM.1S (Chauhan, Tian, Zhou, et al., 2011). Ante los resultados obtenidos en este apartado y los antecedentes descritos se decidió profundizar más en el mecanismo como se recoge más adelante (**apartado 4.1.8.**).

4.1.6. Efecto del tratamiento con ixazomib sobre las proteínas de la familia BCL-2 en líneas de mieloma múltiple.

Como hemos visto en la **sección 1.2.2**, las proteínas de la familia BCL-2 tienen un papel importante en la regulación de la muerte celular por apoptosis. Además, en estudios previos se ha demostrado que los cánceres hematopoyéticos presentan con frecuencia alteraciones en dichas proteínas (Khan & Kahl, 2018; Perini et al., 2018; Reed, 2008; Valentin et al., 2018).

Siguiendo estos antecedentes, se ha estudiado el efecto de ixazomib sobre los niveles de las proteínas de la familia BCL-2 en líneas de mieloma.

Las diferentes líneas de mieloma múltiple establecidas usadas en este trabajo presentan perfiles de la familia BCL-2 diferentes y no relacionados con las traslocaciones génicas que poseen, por lo que en primer lugar se analizó el estado basal de dichas proteínas en las diferentes líneas. Si nos fijamos en la **Figura 4.7**, las líneas de mieloma múltiple se pueden clasificar en 3 grupos en función de la proteína anti-apoptótica principal. En primer lugar, están las líneas NCI-H929 y U266 que expresan mayores niveles de BCL-2 respecto a las demás proteínas anti-apoptóticas, seguida de la expresión de MCL-1 y BCL-X_L respectivamente. Después, MM.1S y OPM-2 que expresan principalmente BCL-X_L, y RPMI8226 que expresa mayores niveles de las proteínas anti-apoptóticas MCL-1 y BCL-X_L, frente a BCL-2.

En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas, concretamente BIM y PUMA ya que NOXA ha sido muy complicado conseguirla tanto por *Western Blot* como por citometría de flujo, vemos también diferencias. Las líneas MM.1S y U266 tienen más elevada la proteína BIM mientras que NCI-H929, OPM-2 y RPMI8226 presentan mayores niveles de PUMA.

En cuanto a BAK y BAX la relación entre ellas es 1:1 en las líneas de MM establecidas siendo su expresión mayor en las líneas NCI-H929 y RPMI8226.

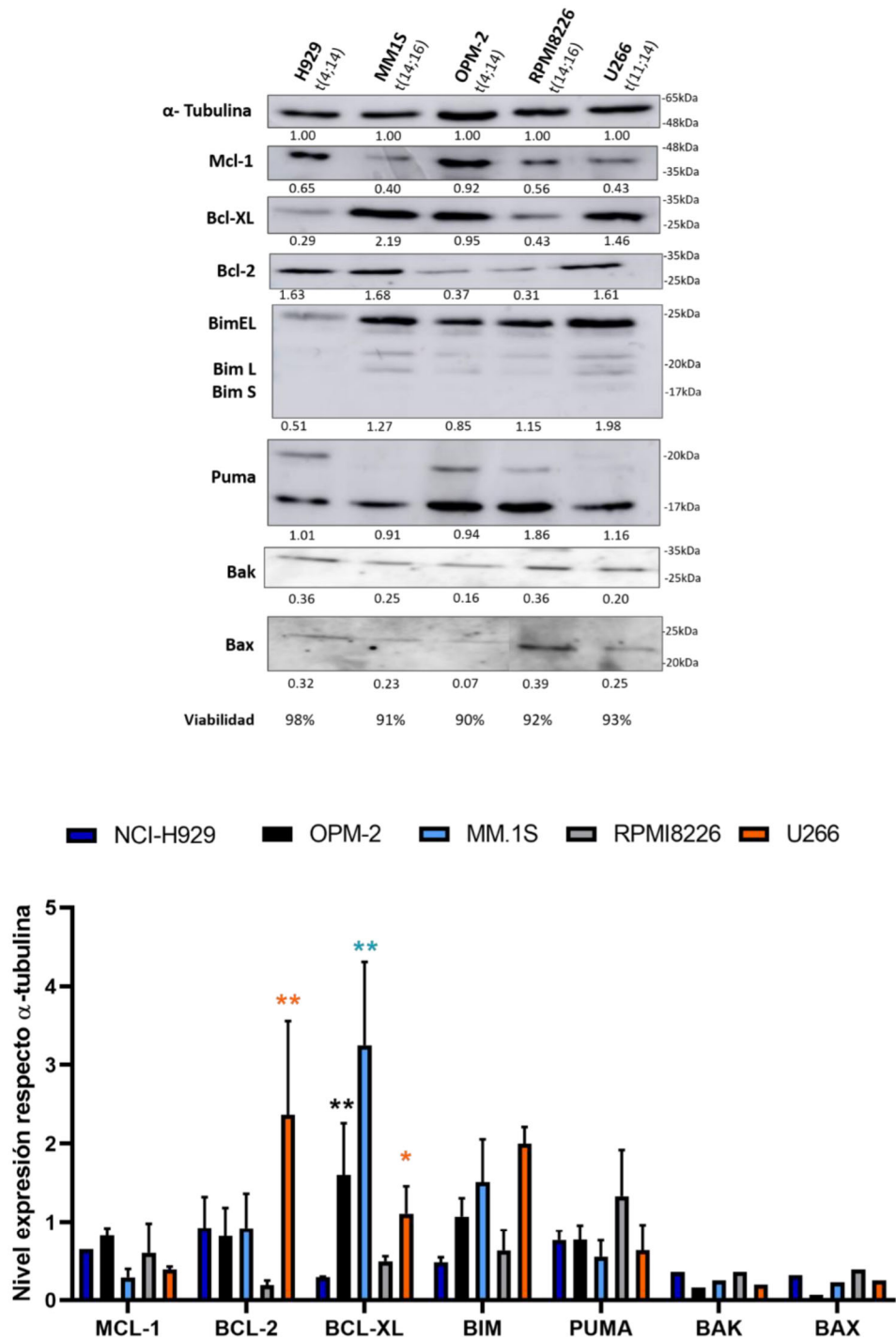


Figura 4.7. Estado basal de las proteínas de la familia BCL-2 en líneas de mieloma múltiple y sus traslocaciones génicas. Se extrajo proteína de 3×10^6 células de cada línea celular y se analizó la expresión de las proteínas de la familia BCL-2 indicadas. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana empleada, mediante el programa ImageJ-NIH. La estadística es la media \pm SEM (n=3) y la significancia está obtenida mediante análisis de *two-ANOVA* con posterior prueba de Tukey, comparando las 5 líneas entre todas ellas, siendo * p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001 y **** p < 0,0001.

Podemos ver que los niveles de proteínas de la familia BCL-2 no parecen depender solo de las anomalías genéticas propias del mieloma que presenta cada línea celular. Por ejemplo, NCI-H929 y OPM-2 tienen la traslocación t(4;14) mientras que cada una sobreexpresa principalmente las proteínas BCL-2 y BCL-X_L respectivamente; o como son MM.1S y RPMI8226 que se caracterizan por su traslocación t(14;16) sobreexpresan las proteínas anti-apoptóticas BCL-X_L y MCL-1 respectivamente. Estos datos corroboran lo descrito por Touzeau *et al.* 2016 cuyo estudio mostraba que la expresión de BCL-2 es indiferente de la traslocación t(11;14), y que la línea MM.1S es dependiente de BCL-X_L.

Existen estudios que indican que el aumento de expresión de BCL-2 proporciona resistencia a terapias con interferón, dexametasona, doxorubicina o bortezomib, y la sobreexpresión de BCL-X_L resistencia al melfalán o doxorubicina (Kline et al., 2007). También el aumento de expresión de MCL-1 puede hacer resistentes a las células al tratamiento con inhibidores de BCL-2 como ABT-199 o ABT-737 (Anstee et al., 2019).

Conocer el perfil de expresión de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas de mieloma podría resultar útil para elegir el tratamiento más adecuado con miméticos BH3 para potenciar la acción de ixazomib (Punnoose et al., 2016). No solo, como se ha comentado anteriormente, para poder conocer las posibles resistencias a fármacos sino qué alternativa de tratamiento puede ser más eficaz. Por ejemplo, en función de la dependencia de una u otra proteína anti-apoptótica, se podrían proponer tratamientos para disminuir los niveles de IL-6 o IFN- α evitando así una mayor expresión de MCL-1 y el efecto pro-supervivencia ocasionado (Jourdan et al., 2000). También se podría conocer y determinar en función de dicha información que mimético BH3 podría ser efectivo en cada caso. Algunos tipos de leucemia y linfomas, así como el mieloma múltiple suelen sobreexpresar MCL-1, en algunos casos debido a la amplificación 1q21, por lo que sería efectivo un tratamiento con miméticos BH3 específicos contra dicha proteína (Merino et al., 2018; Slomp et al., 2019). En cambio, otros tipos de cáncer suelen presentar sobreexpresada la proteína anti-apoptótica BCL-2, como ocurre en la leucemia linfática crónica, el linfoma de células del manto o la macroglobulinemia de Waldenström (Perini et al., 2018). En estos últimos, y como se demostró con anterioridad, la dependencia sobre las proteínas anti-apoptóticas de BCL-2 o BCL-X_L predice un mejor comportamiento ante venetoclax (ABT-199) que aquellos pacientes con un perfil bajo de expresión en BCL-2 (Touzeau et al., 2016). También se ha visto que la combinación de venetoclax con

bortezomib y dexametasona es efectiva en pacientes de mieloma múltiple con una alta expresión de BCL-2 (Moreau et al., 2017). Es posible que el estado de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas no se relacione directamente con la sensibilidad a los fármacos, sino más bien depende de la expresión y distribución de diferentes miembros de la familia BCL-2, tanto anti-apoptóticas como pro-apoptóticas (Slomp et al., 2019). Por tanto, debido a la heterogeneidad que el MM presenta en los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL-2, realizar un perfil de dichas proteínas y determinar su dependencia de cada proteína sería de gran ayuda para diseñar tratamientos basados en el uso de miméticos BH3.

En los apartados 4.1.1 **4.1.5** y en estudios previos (Augello et al., 2018; Muz et al., 2016; Offidani et al., 2014) se ha demostrado que ixazomib induce apoptosis, aunque los datos acerca del mecanismo implicado son escasos. En el trabajo realizado por Chauhan *et al.* 2011 se estableció que ixazomib desencadena vías de señalización tanto dependientes como independientes de las mitocondrias y la apoptosis inducida es mediada por caspasas, además de ocasionar estrés en el RE e inhibir las tres actividades del proteasoma. En este mismo trabajo, se vio también que ixazomib es capaz de inducir la expresión de PUMA y NOXA mediante la activación de la vía p53.

Resultados de nuestro grupo en la línea MM.1S mostraban que el tratamiento durante 24 h con ixazomib produce un aumento de la expresión de las proteínas MCL-1, BIM, PUMA y NOXA a diferencia de la línea U266, en la que se observa un aumento de los niveles de las proteínas BCL-2, BCL-X_L y PUMA (Beltrán-Visiedo, 2018). También en el trabajo de Beltran-Visiedo (2018) se observó que el tratamiento de la línea NCI-H929 con ixazomib no provocaba cambios significativos en las proteínas de la familia BCL-2. La inhibición del proteasoma conlleva un aumento en los niveles de las proteínas BIM, BIK, MCL-1 y NOXA, y una disminución de A1 y BCL-2 (está última puede no variar) y no afecta los niveles de BAX, BAK, BID, BCL-X_L, BCL-W y PUMA (Mortenson et al., 2005; Pérez-Galán et al., 2006; Qin et al., 2005; H. Zhu et al., 2005). Se ha descrito que el tratamiento con bortezomib provoca la desfosforilación de BIM para romper su unión con LC8 y así interaccionar con otros miembros de la familia BCL-2; también ejerce una regulación positiva sobre NOXA, permitiendo la unión de esta con MCL-1 y así la liberación y activación de BAK y BAX, y por último, también se ha descrito que ixazomib regula a BIK al alza para mediar la liberación de calcio y la fragmentación mitocondrial dependiente de DRP-1 (Fennell et al., 2008).

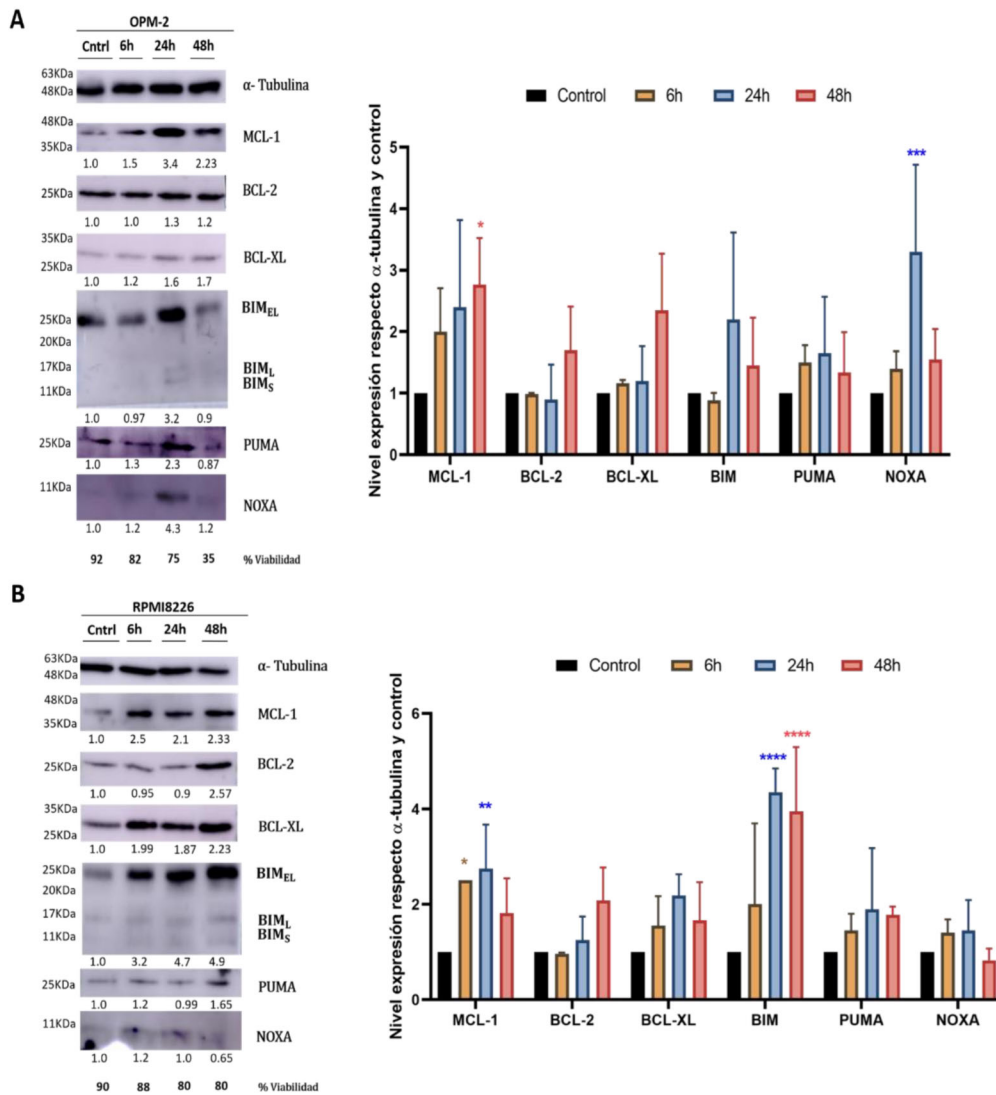


Figura 4.8. Efecto de ixazomib sobre los niveles de proteínas de la familia BCL-2 en las líneas OPM-2 (A) y RPMI8226 (B). Ambas líneas fueron tratadas con 25 nM de ixazomib durante 6, 24 y 48 h. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células totales de cada línea celular y cada condición. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada tiempo y respecto las células sin tratamiento (control) en cada membrana empleada, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. Imagen representativa de $n=2$. La significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada proteína respecto al estado basal (control) donde * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$

Ante los resultados anteriores, se decidió ampliar este estudio previo en otras líneas celulares. La **Figura 4.8** muestra un aumento de los niveles en la línea OPM-2 de MCL-1 a la 6 h y de BIM a las 24 h principalmente. Otras proteínas como BCL-2, BCL-XL, PUMA y NOXA también aumentan ligeramente sus niveles cuando se trata esta línea celular con ixazomib, aunque los cambios no son estadísticamente significativos. Por otro lado, en la línea RPMI8226, ixazomib induce un aumento rápido en el tiempo (6 h) de las proteínas anti-apoptóticas MCL-1 y BCL-XL y a tiempos más largos (48 h) también

aumenta la expresión de BCL-2 y PUMA. En este caso la proteína BH3-*only* NOXA no parece sufrir alteraciones. El aumento de las proteínas pro-apoptóticas que se observa en ambas líneas, podría contrarrestar el efecto protector de las anti-apoptóticas y sugiere que proteína BH3-*only* predomina en cada una de las líneas en el tratamiento con ixazomib. OPM-2 dependería principalmente de NOXA, seguida de BIM y en último lugar PUMA; mientras que en la línea RPMI8226 la primera respuesta apoptótica (6 h) podría corresponder a la proteína BIM, seguida de PUMA y en menor medida de NOXA a las 48 h. Estos resultados dan a entender que cada línea tiene un tiempo distinto de respuesta a la inducción de apoptosis por ixazomib siendo más temprana en la línea RPMI8226 (6 h) y a las 24 h en OPM-2. La rápida inducción de las proteínas pro-apoptóticas en ambas líneas destaca puesto que la activación de caspasa-3 en ellas era tardía, al igual que la activación de caspasa-8 (a las 48 h) implicando una permeabilización de la mitocondria lenta o la existencia de algún factor que impidiese la activación de caspasa-3. Además, estas líneas eran de las más resistentes al tratamiento con ixazomib (**Figura 4.5**).

Los resultados obtenidos en la **Figura 4.8** confirman lo visto en trabajos anteriores que demuestran que bortezomib provoca una mayor acumulación de MCL-1, además de una sobreexpresión de NOXA, pero sin alterar los niveles de BCL-2 y BCL-X_L (Fennell et al., 2008). Además, se ha visto que la activación de MCL-1 se da a tiempos tempranos (4 h o menos) (Gomez-Bougie et al., 2007). La sobreexpresión de NOXA permite desplazar a BIM de los complejos formados por MCL-1/BIM, pero no de los de BCL-2/BIM (Fennell et al., 2008). Este hecho permite que BIM active a BAK y BAX y, por tanto, se desencadene la apoptosis. Por otro lado, ante el tratamiento con bortezomib en líneas de mieloma que expresan un alto nivel de expresión de MCL-1 se ralentiza el efecto de bortezomib resultando en una resistencia a este IP (Gomez-Bougie et al., 2007).

En el **apartado 4.1.5** se confirma que ixazomib induce apoptosis de manera dependiente de caspasas, por lo que se ha estudiado el efecto de ixazomib sobre las proteínas de la familia BCL-2 en presencia de Z-VAD-fmk en las líneas OPM-2 y RPMI8226. Se sembraron 3×10^6 células por condición de tratamiento y se preincubaron 1 h con Z-VAD, después se añadió ixazomib 25 nM y se tomaron muestras a diferentes tiempos. Los resultados se recogen en la **Figura 4.9**.

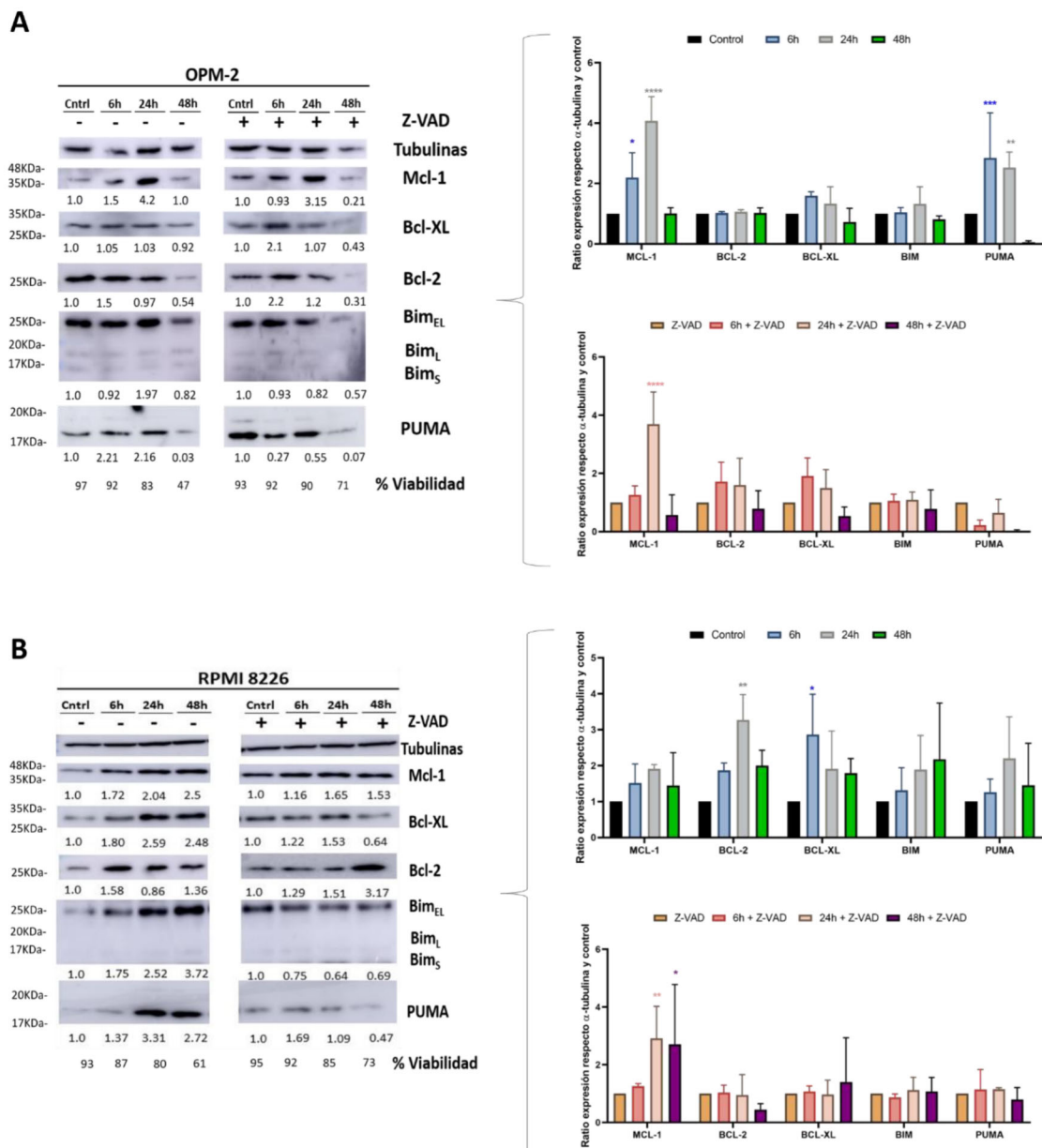


Figura 4.9. Efecto de ixazomib y Z-VAD-fmk sobre los niveles de proteínas de la familia BCL-2 en las líneas OPM-2 (A) y RPMI8226 (B). Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células totales de cada línea celular y cada condición. Ambas líneas fueron tratadas con 25 nM de ixazomib y con 50 μ M de Z-VAD-fmk durante 6, 24 y 48 h. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada tiempo y respecto las células sin tratamiento (control), en cada membrana empleada, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. Imagen representativa de $n=3$. La significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada proteína respecto al estado basal (control) donde * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$

Como se observa en la figura anterior, la inhibición de las caspasas con Z-VAD-fmk no afecta significativamente a la acumulación de MCL-1 inducida por ixazomib a las 24 h, pero se observa una menor acumulación a las 6 h. Sin embargo, se observa que el

aumento de los niveles de PUMA en respuesta a ixazomib no se produce en presencia de Z-VAD-fmk.

En la línea RPMI8226, en presencia de Z-VAD-fmk, el aumento en los niveles de MCL-1 se retrasa a las 24 h manteniéndose en el tiempo a diferencia del tratamiento solo con ixazomib donde el aumento de MCL-1 se observa a las 6 h y en menor proporción. Por otro lado, los cambios en los niveles de expresión de BIM a lo largo del tiempo son similares a los observados en las células sólo tratadas con ixazomib, pero con niveles inferiores en presencia de Z-VAD-fmk.

Previamente se ha establecido que la apoptosis inducida por ixazomib está mediada por la activación de las caspasas-3, 8 y 9 o también por las vías p53-p21, p53-NOXA-PUMA y RB-E2F (Muz et al., 2016). Con los resultados anteriores no podemos determinar el estado de NOXA en las líneas OPM-2 y RPMI8226 ya que los anticuerpos disponibles para *Western Blot* no permiten obtener resultados fiables y reproducibles. Por este motivo se decidió estudiar el efecto de ixazomib sobre la expresión de PUMA y NOXA en estas líneas mediante una técnica diferente para evaluar la posible participación de la ruta p53-NOXA-PUMA en la muerte celular inducida por ixazomib. Este análisis se realizó mediante citometría de flujo con el uso de anticuerpos específicos para cada proteína a diferentes tiempos.

Como se recoge en la **Figura 4.10A**, en ambas líneas se observó un aumento de la expresión de PUMA a las 6 h cuando se tratan las células con ixazomib sólo, y con apenas variaciones hasta las 48 h. En cambio, en presencia de Z-VAD la expresión de dicha proteína permanece inalterable hasta las 48 h. Además, este dato confirma el aumento observado en los *Western Blot* anteriores (**Figura 4.8** y **Figura 4.9**) y la dependencia de caspasas en el proceso de apoptosis inducido por ixazomib.

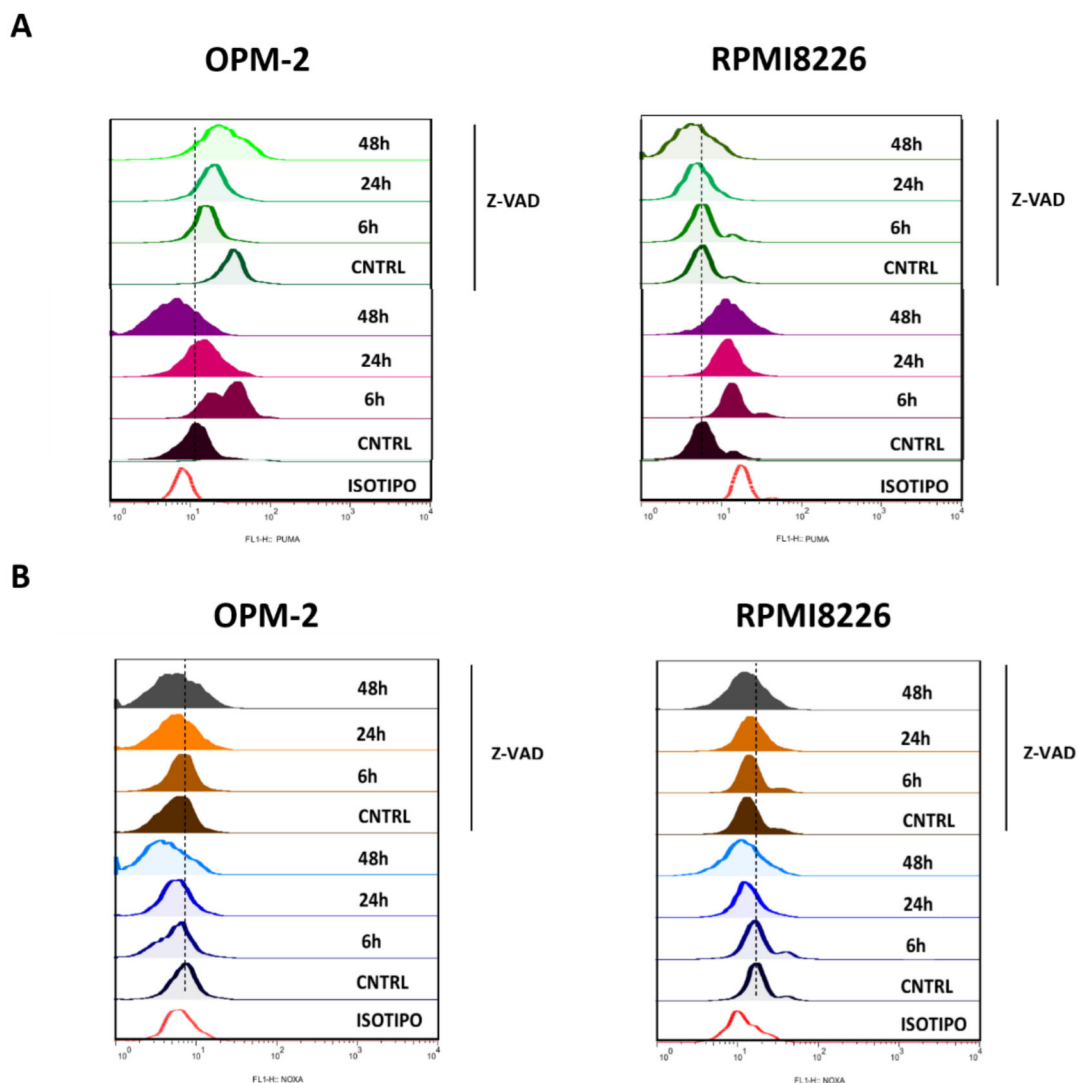


Figura 4.10. Estudio de la expresión de las proteínas PUMA (A) y NOXA (B) en líneas de MM tratadas con ixazomib y Z-VAD-fmk. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por cada condición y se trataron con 25 nM de ixazomib y 50 μ M de Z-VAD-fmk. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 1% y se permeabilizaron con saponina al 0,1% en PBS. A continuación, se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes a PUMA y NOXA, y, por último, el anticuerpo secundario contra la Fc de cada uno de ellos. Imagen representativa de $n=2$.

En cuanto a la expresión de NOXA (**Figura 4.10B**), no se observó aumento de los niveles de esta proteína en respuesta a ixazomib e incluso a tiempos más largos se observa una disminución de los mismos, tanto en ausencia como en presencia de Z-VAD.

El comportamiento de cada línea es diferente, al igual que se estableció en un trabajo previo realizado en nuestro grupo (Beltrán-Visiedo, 2018). En este trabajo se muestra como la línea NCI-H929 presenta una bajada de la expresión de PUMA a las 48 h cuando se trata solo con ixazomib (15 nM) mientras que en presencia de Z-VAD-fmk no varía la expresión en el tiempo. La proteína NOXA se mantiene estable

indiferentemente del tratamiento. Por otro lado, las líneas MM.1S y U266 sólo con ixazomib (25 nM y 50 nM respectivamente) presentan una disminución de la expresión de PUMA a las 24 h y se mantiene incluso a las 48 h, mientras que la expresión de NOXA aumenta ligeramente a las 24 h. En estas líneas, en presencia de Z-VAD-fmk los niveles de PUMA permanecen estables con un leve incremento a las 24 o 48 h respectivamente, mientras que NOXA aumenta la expresión levemente a las 24 h.

En general los inhibidores de proteasoma como bortezomib o MG132 generan apoptosis independiente de la activación de p53 (Pandit & Gartel, 2011), aunque también existen evidencias de que la inducción transcripcional de PUMA mediada por p53 podría jugar un papel importante en la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por la inhibición del proteasoma (Concannon et al., 2007). Destaca que las líneas OPM-2 y RPMI8226 presentan p53 mutado, por lo que el aumento de PUMA puede ser debido a estímulos como estrés en el RE, concretamente mediante la inducción de CHOP, E2F1 y TRB3; o mediante la activación transcripcional de p73, un homólogo de p53 (Yu & Zhang, 2008). En las líneas MM.1S y NCI-H929, que expresan la forma no mutada de p53, inducen apoptosis por la activación de la vía p53-PUMA (Saha et al., 2010). Ambas líneas expresan principalmente BCL-X_L y BCL-2 antes que MCL-1, lo cual corrobora el modelo descrito con anterioridad que propone que p53 se une a BCL-X_L para liberar a PUMA y así puede actuar como activador de BAX (Chipuk et al., 2004, 2005). Sin embargo, otra opción es que p53 actúe desplazando a BIM de su unión con las proteínas anti-apoptóticas MCL-1, BCL-2 y BCL-X_L (Han et al., 2010).

Por otra parte, parece que la adición de Z-VAD-fmk en las líneas OPM-2 y RPMI8226 inhibe el aumento de expresión de las proteínas pro-apoptóticas. En la actualidad no hay bibliografía que respalde este resultado, por lo que sería conveniente investigar más la razón.

4.1.7. Efecto de ixazomib en líneas deficientes en proteínas pro-apoptóticas o con sobreexpresión de anti-apoptóticas.

Anteriormente hemos visto que la proteína BIM eleva sus niveles de expresión cuando tratamos la línea RPMI8226 con ixazomib y en menor medida en la línea OPM-2. Aunque no observar cambios en los niveles de proteína del resto de la familia BCL-2 no permite descartar la participación de las mismas en la muerte celular, decidimos centrarnos en el estudio del posible papel de BIM en la muerte inducida por ixazomib. En las células de mieloma, BIM se encuentra neutralizada por la asociación con MCL-1

o BCL-2 y en el momento que se activan las señales de apoptosis la primera interacción que se rompe es la de MCL-1/BIM, liberando así a BIM, quien se asocia con BAX de manera transitoria para desempeñar su papel pro-apoptótico. De este modo, el balance entre los niveles de proteína MCL-1 y BIM determinan la viabilidad celular en las células de mieloma (Gomez-Bougie et al., 2004; Jette et al., 2008; Niu et al., 2016; O'Connor et al., 1998; Puthalakath et al., 1999). En cambio, la interacción con BCL-2 es más duradera siendo un buen objeto de estudio como diana en mielomas resistentes a inhibidores de proteasoma (Chen et al., 2014). Además, existen evidencias en carcinoma hepatocelular de que la inducción de la expresión de BIM por parte de bortezomib contrarresta la resistencia a fármacos dependientes de la vía HRAS/MAPK37 (Zhang et al., 2019). En base a los antecedentes y los resultados obtenidos en los apartados anteriores, la proteína pro-apoptótica BIM parece tener un papel en la muerte por apoptosis ocasionada por ixazomib. Para estudiar el papel de esta proteína, se generaron clones deficientes en BIM de todas las líneas de mieloma múltiple disponibles mediante infección lentiviral en base a la técnica CRISPR/Cas9, salvo de la línea OPM-2 de la cual ya se disponía en el laboratorio de una línea deficiente en BIM generada mediante interferencia de RNA (shBIM).

Según vemos en la **Figura 4.11A**, tras la infección en la línea NCI-H929, se ha perdido las isoformas habituales de BIM y la funcionalidad de dicha proteína puesto que el crRNA empleado iba dirigido al dominio BH3. Aparte de comprobar si se ha eliminado la proteína BIM, también se analizó el estado del resto de proteínas de la familia BCL-2, los niveles de expresión se recogen en la **Figura 4.11B**.

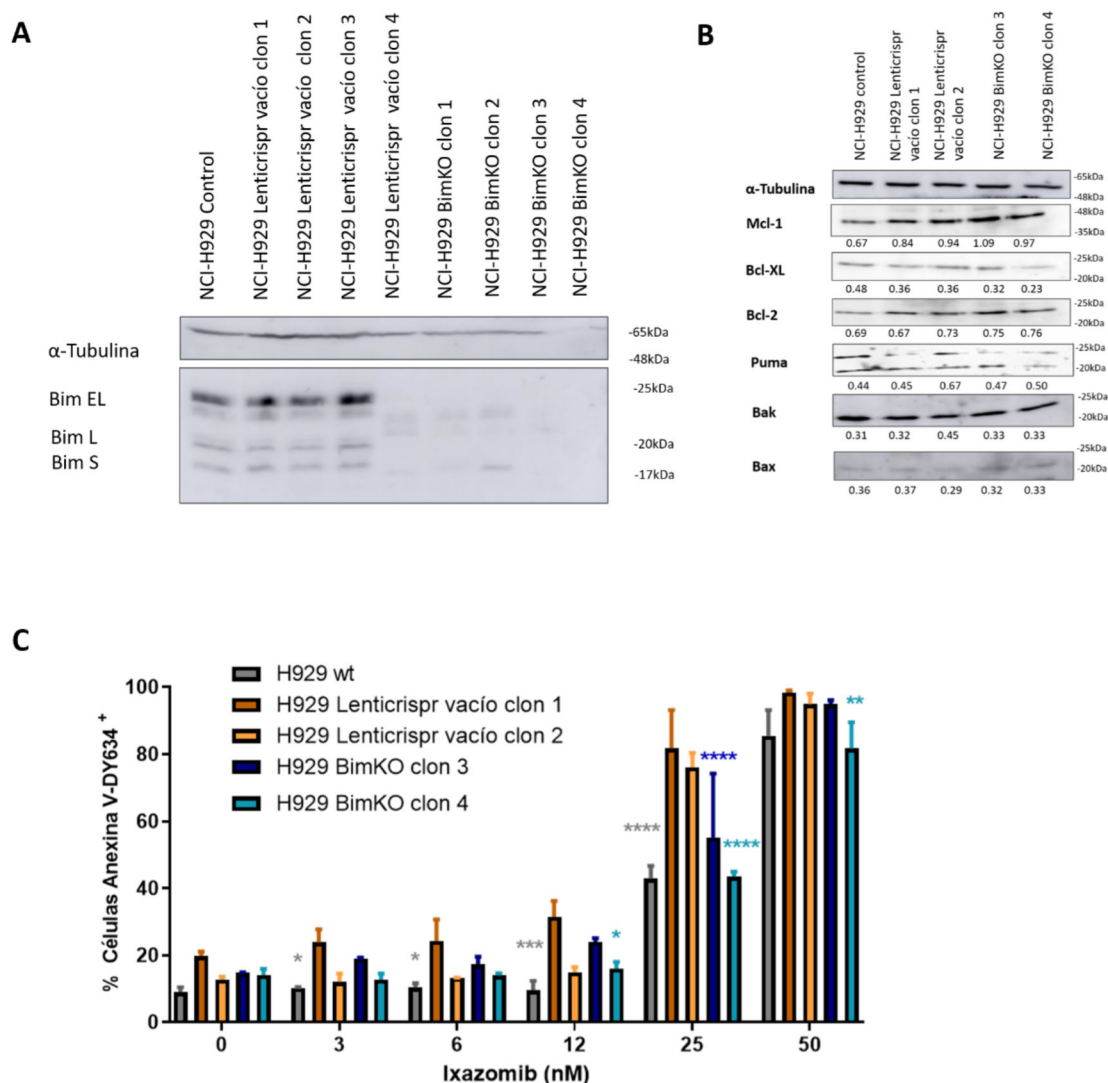


Figura 4.11. Sensibilidad a ixazomib de células NCI-H929 deficientes en BIM. (A) Comprobación líneas celulares de NCI-H929 deficientes en BIM. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células y mediante la técnica *Western Blot* con un anticuerpo específico contra BIM (Cell Signaling) se evaluó la ausencia o presencia de dicha proteína. (B) Estado de las proteínas familia BCL-2 en las líneas modificadas. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. (C) Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en la línea NCI-H929 parental y las líneas modificadas. Para determinar la implicación de BIM se sembraron 3×10^5 células por dosis de ixazomib y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y por marcaje con Anexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD ($n=2$) y la significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea vector vacío en cada caso donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En las líneas NCI-H929 Lenticrispr vacío clon 1 y clon 2 se produce un ligero aumento en la expresión de MCL-1 que se observa también en las líneas NCI-H929 BimKO clon 3 y clon 4. La ausencia de BIM o la infección no afectan al nivel de expresión de BCL-2 siendo similar entre las *wild type*, los controles de infección y las BimKO; pero si afecta al nivel de BCL-X_L. El nivel de esta última proteína de la familia

BCL-2 disminuye ligeramente tras la infección y se mantiene en las líneas que no expresan BIM. En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas (PUMA, BAK y BAX) los niveles no varían tras la infección ni por la ausencia de expresión de BIM. La expresión de BIM no varía apenas tras la infección salvo en la línea NCI-H929 Lenticrispr vacío clon 2 donde se aprecia una disminución de la expresión no significativa.

Posteriormente las líneas obtenidas se trataron con ixazomib durante 24 h para determinar si la deficiencia en BIM protege de la acción de ixazomib. Los resultados se muestran en la **Figura 4.11C**. Según dicha figura, la infección por lentivirus y posterior selección provoca un aumento a la sensibilidad del tratamiento con ixazomib de las líneas NCI-H929, además de producir cambios morfológicos, como un aumento en el tamaño. El déficit de BIM, en general, protege del efecto tóxico de ixazomib, incluso contrarrestando la sensibilidad ocasionada por la infección. En las líneas NCI-H929 se aprecia que los clones deficientes en BIM son menos sensibles a ixazomib (especialmente a 25 nM) que los clones con el vector vacío a pesar de que la infección los haga más sensibles. Además, a concentraciones más altas ya no se aprecian diferencias, posiblemente porque otras proteínas pro-apoptóticas puedan sustituir a BIM en la activación de BAX y BAK.

Al igual que sucede en la línea NCI-H929, tras la infección en la línea MM.1S se han perdido las isoformas habituales de BIM y la funcionalidad de dicha proteína, como se observa en la **Figura 4.12A**. En esta línea también se analizó el estado del resto de proteínas de la familia BCL-2 (**Figura 4.12B**). La infección en la línea MM.1S provoca un aumento de casi el doble en la expresión de las proteínas MCL-1 y BCL-2, mientras que las líneas deficientes en BIM presentan niveles equivalentes a la línea parental. En la expresión de BCL-X_L sucede lo contrario a la expresión de MCL-1, aumenta tras la infección y la ausencia de BIM eleva su nivel ligeramente por debajo de las *wild type*. Si nos fijamos en las proteínas pro-apoptóticas PUMA, BAK y BAX presentan pequeños cambios entre las diferentes líneas, pero no parecen significativos. Se observa un ligero aumento de PUMA tras la ausencia de BIM.

Tras el tratamiento con ixazomib durante 24 h, como se ve en la **Figura 4.12C**, en la línea MM.1S, se produce el mismo efecto que en la línea NCI-H929, la infección aumenta la sensibilidad de las células al efecto de ixazomib y la ausencia de BIM protege parcialmente frente a ixazomib, aunque la diferencia es menor.

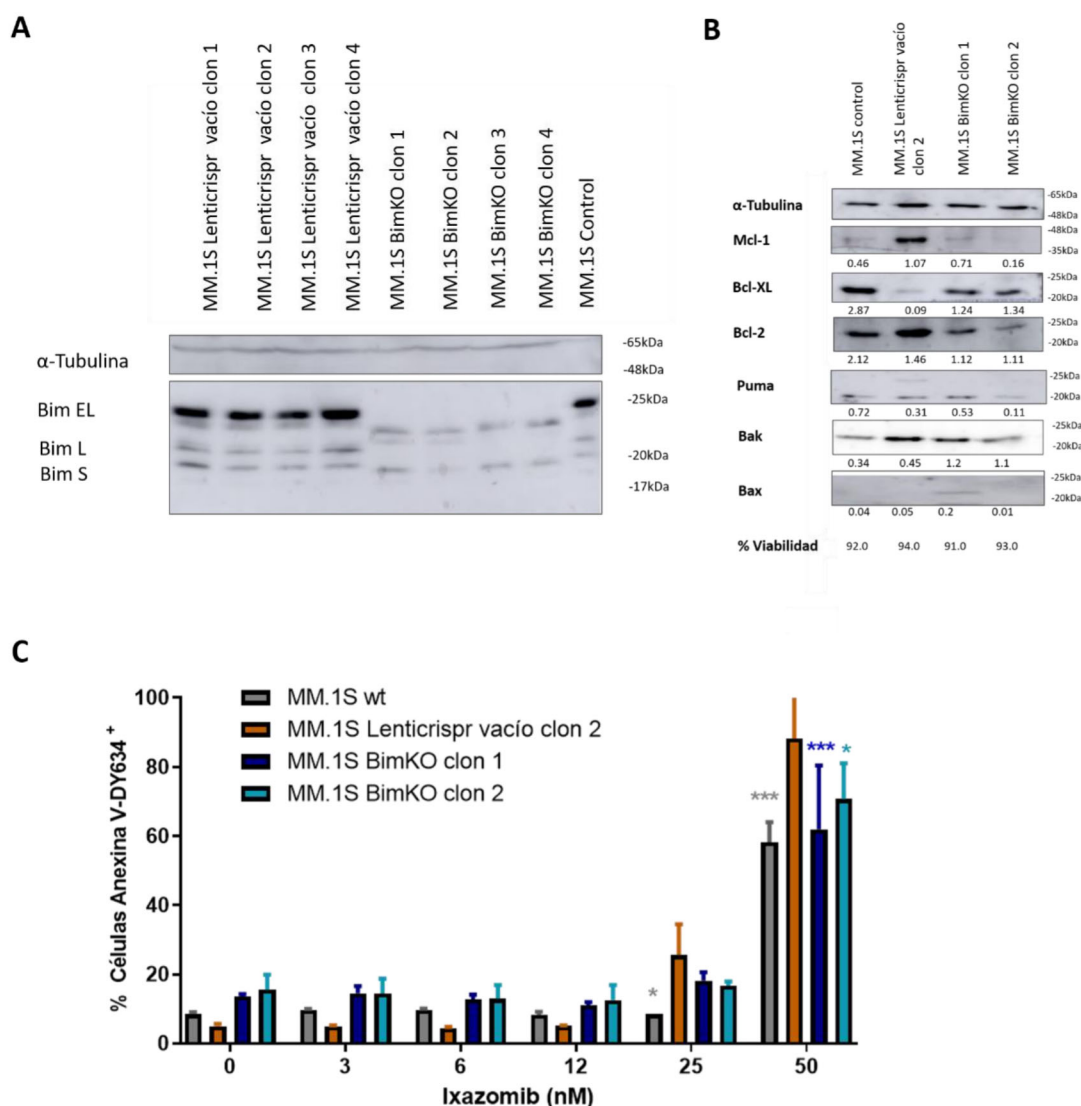


Figura 4.12. Sensibilidad a ixazomib de células MM.1S deficientes en BIM. (A) Comprobación líneas celulares de MM.1S deficientes en BIM. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células y mediante la técnica *Western Blot* con un anticuerpo específico contra BIM (Cell Signaling) se evaluó la ausencia o presencia de dicha proteína. (B) Estado de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas modificadas. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. (C) Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en la línea MM.1S parental y las líneas modificadas. Para determinar la implicación de BIM se sembraron 3×10^5 células por dosis de ixazomib y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y por marcaje con Anexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD ($n=2$) y la significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea vector vacío en cada caso donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Por otro lado, al igual que sucede en las líneas NCI-H929 y MM.1S, como se observa en la **Figura 4.13A**, tras la infección en la línea RPMI8226 se han perdido las isoformas habituales de BIM y la funcionalidad de dicha proteína. En esta línea también se analizó el estado del resto de proteínas de la familia BCL-2 (**Figura 4.13B**).

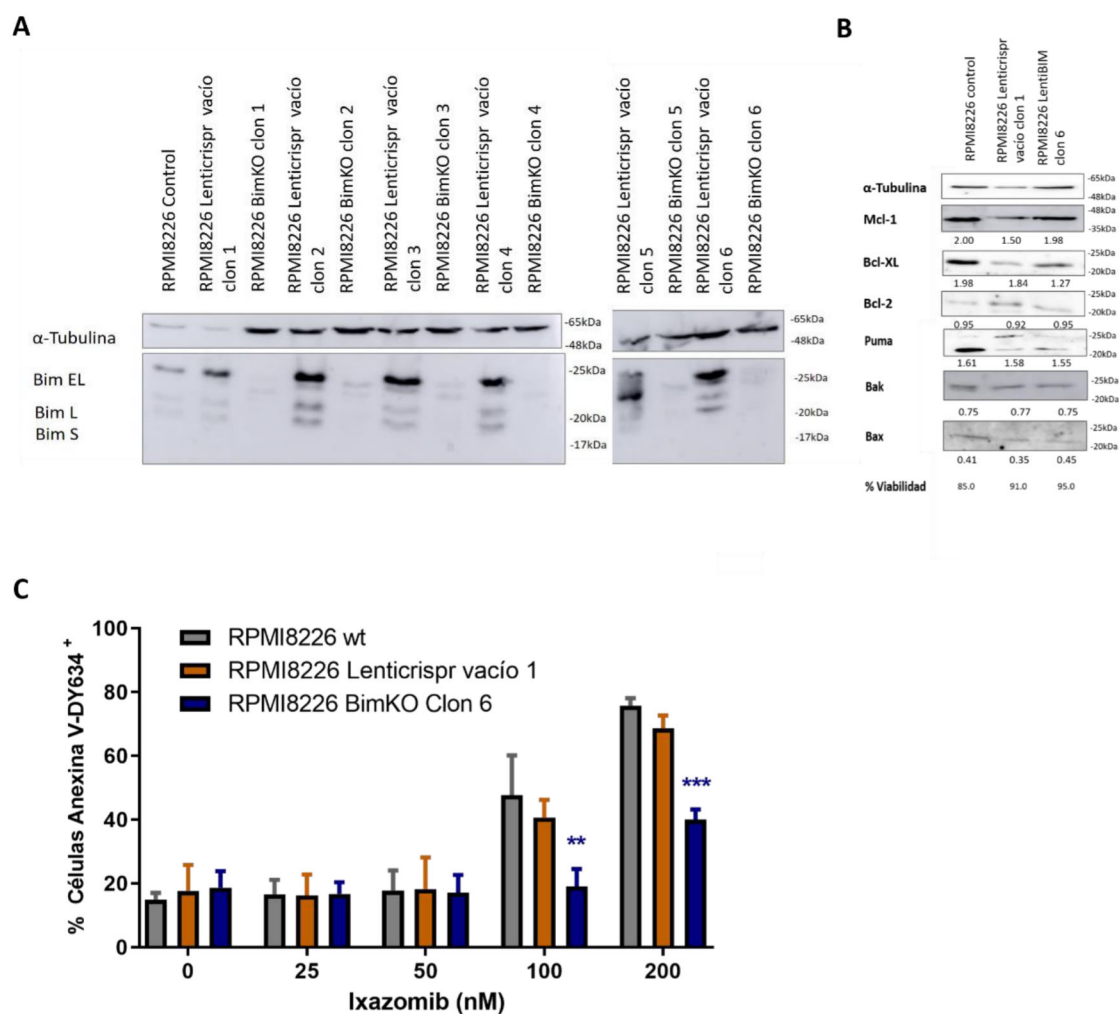


Figura 4.13. Sensibilidad a ixazomib de células RPMI8226 deficientes en BIM. (A) Comprobación líneas celulares de RPMI8226 deficientes en BIM. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células y mediante la técnica *Western Blot* con un anticuerpo específico contra BIM (Cell Signaling) se evaluó la ausencia o presencia de dicha proteína. (B) Estado de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas modificadas. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. (C) Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en la línea RPMI8226 parental y las líneas modificadas. Para determinar la implicación de BIM se sembraron 3×10^5 células por dosis de ixazomib y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y por marcaje con Annexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD ($n=2$) y la significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea vector vacío en cada caso donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

A diferencia de las líneas anteriormente comentadas, RPMI8226 presenta pocos cambios en el estado de las proteínas de la familia BCL-2 tras la infección y ausencia de BIM. Sólo se ve una ligera disminución en la expresión de BCL-X_L en la línea que no expresa BIM. El resto de proteínas mantienen unos niveles similares entre las tres líneas RPMI8226.

La **Figura 4.13C** muestra como esta línea se ve protegida por la ausencia de la proteína BIM, incluso a concentraciones altas de ixazomib. En esta línea, BIM parece tener una gran implicación en la muerte inducida por ixazomib.

Para finalizar las líneas generadas mediante la técnica CRISPR/Cas9, analizamos lo sucedido en la línea U266 (**Figura 4.14A**). En esta línea, tras la infección se han perdido las isoformas habituales de BIM y la funcionalidad, como sucede en las líneas anteriormente comentadas. En cuanto al estado de las proteínas de la familia BCL-2 (**Figura 4.14B**) en las líneas de U266 modificadas genéticamente, tras la infección (U266 Lenticrispr vacío clon 2), se produce una disminución en la expresión de MCL-1 que se mantiene en la línea U266 BimKO clon 3. La ausencia de BIM implica también que aumente el nivel de expresión de BCL-2 ligeramente en comparación a la línea U266 no modificada genéticamente (U266 control). La proteína BCL-X_L no se ve afectada a nivel de expresión en las líneas modificadas que carecen de BIM ni tras la infección lentiviral (línea Lenticrispr vacío). Sí destaca que la línea U266 reduce la expresión de PUMA a la mitad debido a la infección lentiviral manteniendo dicho nivel de expresión incluso cuando BIM no se expresa. Por último, BAK aumenta sus niveles de expresión tras la infección, y en la línea modificada que carece de BIM recupera los niveles de expresión de BAK de la línea parental. Con estos datos se puede concluir que en la línea U266 como en la línea RPMI8226, la infección y selección ha causado algunos cambios en el perfil de expresión de las proteínas de la familia BCL-2, pero dichos cambios observados son equivalentes tanto en las células transformadas con el vector vacío, como en las deficientes en BIM.

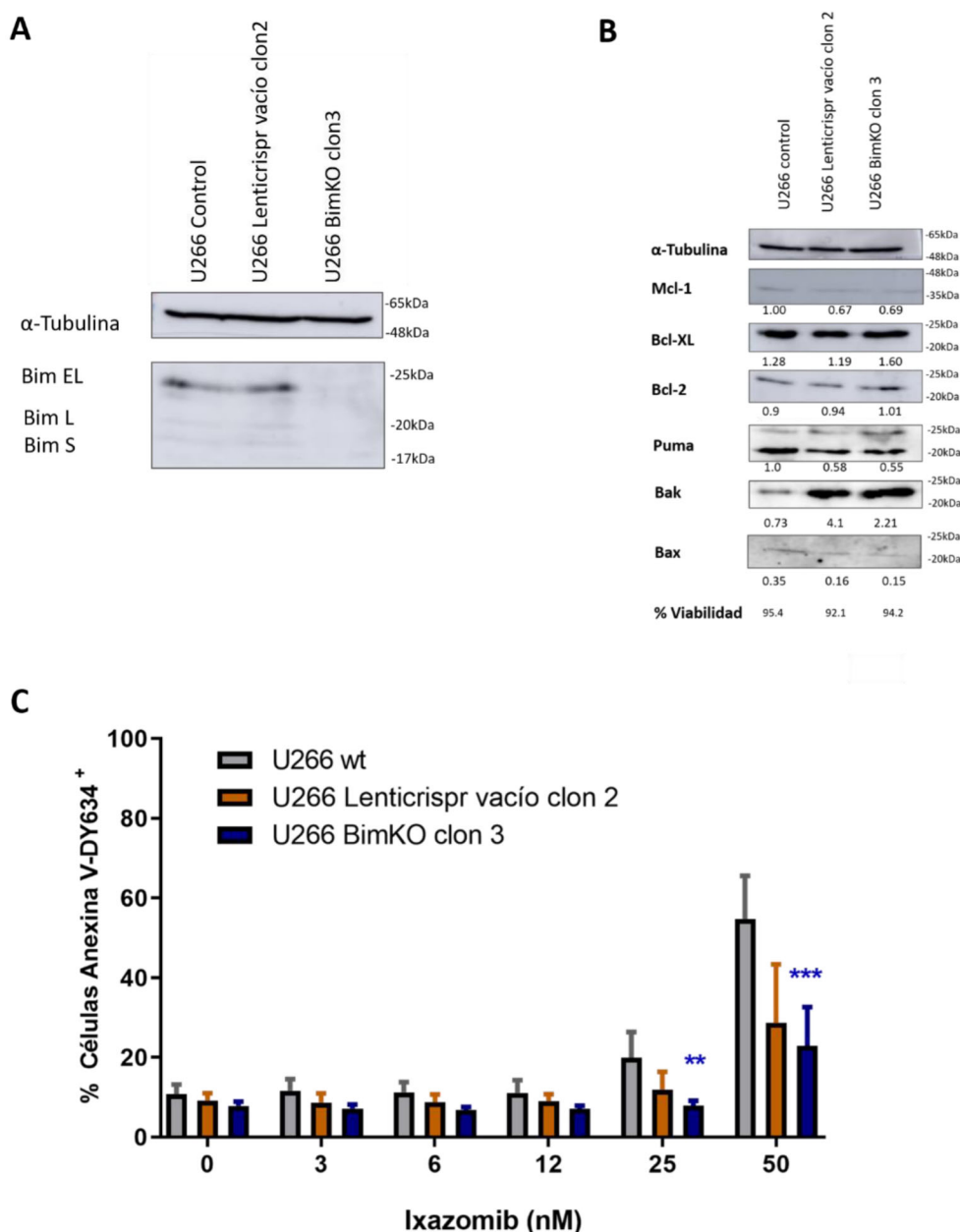


Figura 4.14. Sensibilidad a ixazomib de células U266 deficientes en BIM. (A) Comprobación líneas celulares de U266 deficientes en BIM. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células y mediante la técnica *Western Blot* con un anticuerpo específico contra BIM (Cell Signaling) se evaluó la ausencia o presencia de dicha proteína. (B) Estado de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas modificadas. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. (C) Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en la línea U266 parental y las líneas modificadas. Para determinar la implicación de BIM se sembraron 3×10^5 células por dosis de ixazomib y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y por marcaje con Annexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD ($n=2$) y la significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea vector vacío en cada caso donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En la **Figura 4.14C**, la línea U266 deficiente en BIM presenta un perfil más resistente a ixazomib que la línea U266 *wild type*, pero esta característica parece ser consecuencia de la infección lentiviral (U266 Lenticrispr vacío). Al comparar la línea deficiente en BIM con la línea control, se observa una disminución adicional de la muerte inducida por ixazomib, pero la diferencia no es estadísticamente significativa. Dicha disminución podría deberse a la reducción de los niveles de PUMA que se produce por la infección.

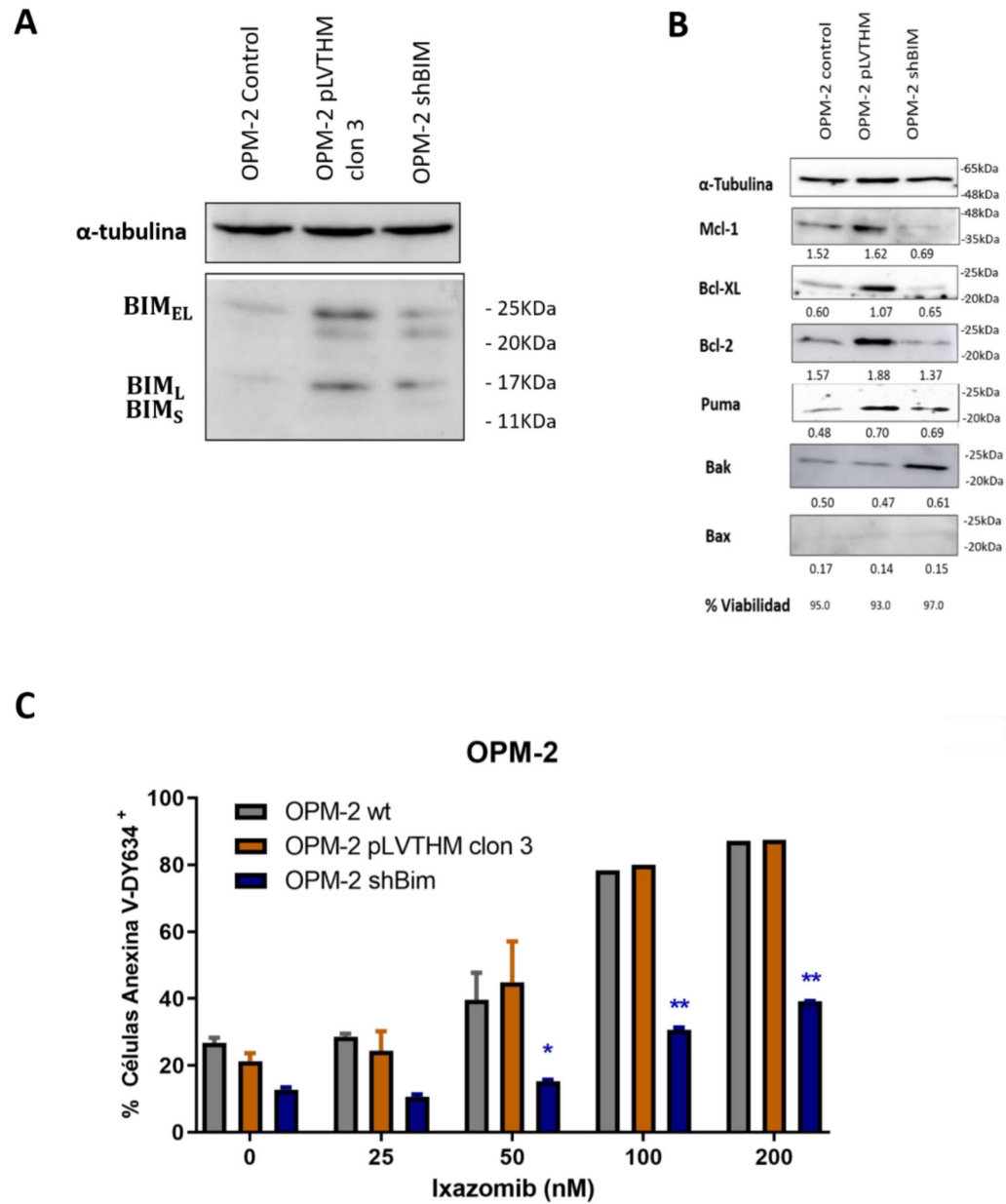


Figura 4.15. Sensibilidad a ixazomib de células OPM-2 deficientes en BIM. (A) Comprobación líneas celulares de OPM-2 deficientes en BIM. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células y mediante la técnica *Western Blot* con un anticuerpo específico contra BIM (Cell Signaling) se evaluó la ausencia o

presencia de dicha proteína. **(B)** Estado de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas modificadas. Se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada línea, en cada membrana, mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante conteo con azul trypan. **(C)** Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en la línea OPM-2 parental y las líneas modificadas. Para determinar la implicación de BIM se sembraron 3×10^5 células por dosis de ixazomib y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo y por marcaje con Anexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD ($n=2$) y la significancia se determinó mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea vector vacío en cada caso donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

A diferencia de las líneas NCI-H929, MM.1S, RPMI8226 y U266, en la línea OPM-2 shBIM se aprecia únicamente una reducción parcial de BIM cuando se compara con la línea control (**Figura 4.15A**). Este resultado probablemente sea debido al método por el que se obtuvo esta línea, mediante interferencia de RNA.

La comprobación del estado de las proteínas de la familia BCL-2, en esta línea se recoge en la **Figura 4.15B**. La línea OPM-2 ve alterada la expresión de MCL-1 por la ausencia de BIM, de manera que se expresa en menor medida que en las *wild type* o la línea OPM-2 pLVTHM. Tras la infección, la expresión de BCL-X_L y BCL-2 aumenta su nivel de expresión, pero el déficit de BIM disminuye la expresión de estas proteínas anti-apoptóticas al nivel de la línea *wild type*. Si nos fijamos en las proteínas pro-apoptóticas PUMA, BAK y BAX, vemos que la infección afecta a la expresión de PUMA elevando su nivel de expresión y el déficit de BIM no implica ningún cambio tras la infección. Por otro lado, BAK y BAX tras la infección no varían su nivel de expresión, pero la ausencia de BIM aumenta el nivel de expresión sólo de BAK. La expresión de BIM disminuye ligeramente en la línea OPM-2 pLVTHM respecto a la línea OPM-2 control.

Al tratar estos clones de OPM-2 con ixazomib durante 24 h (**Figura 4.15C**), observamos como la línea OPM-2 deficiente en BIM muestra una reducción importante de la sensibilidad a ixazomib, incluso a concentraciones altas. El control de infección no sufre diferencias de comportamiento respecto a la línea OPM-2 *wild type*. Lo observado en esta línea es similar a lo que ocurre en la línea RPMI8226 BimKO como observamos en la **Figura 4.13C**. Además, en la línea OPM-2 parece tener una mayor implicación en la muerte inducida por ixazomib, seguida de la línea RPMI8226. Este resultado contrasta con lo visto en la **Figura 4.8** donde se observaba que la expresión de BIM aumentaba en mayor medida en la línea RPMI8226 durante el tratamiento con ixazomib.

El déficit de BIM proporciona protección ante el efecto citotóxico de ixazomib en las diferentes líneas de mieloma múltiple siendo mayor esta protección en la línea OPM-2, que muestra niveles más altos de BCL-X_L como hemos visto en la **Figura 4.7**. Por un lado, pueden producirse diferencias en las interacciones que BIM establece con otras proteínas de la familia BCL-2. Además, otras proteínas pro-apoptóticas, como PUMA, podrían compensar la ausencia de BIM. El nivel de expresión de PUMA en las células MM.1S como se estudió con anterioridad en nuestro laboratorio (Beltrán Visiedo, 2018), aumenta a las 24 h a niveles similares que en OPM-2, pero al no expresarse BIM se ha visto que PUMA aumenta su nivel de expresión y dicho aumento podría explicar las diferencias observadas entre las líneas MM.1S y OPM-2 (Morales et al., 2011).

Las proteínas BAK y BAX son las encargadas por excelencia de ejecutar la apoptosis por la vía intrínseca (Touzeau et al., 2018). Con el fin de determinar si la vía intrínseca es la única que se activa en respuesta a ixazomib, se estudió el efecto de ixazomib en una línea deficiente en ambas proteínas (MM.1S Bax/Bak KO) disponible en el laboratorio. Los resultados se observan en la **Figura 4.1**.

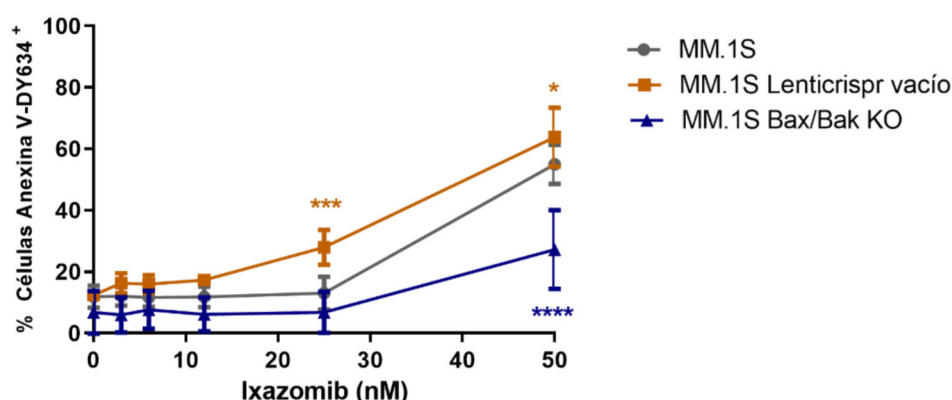


Figura 4.16. Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en células MM.1S deficientes en BAX/BAK. En este ensayo se sembraron las células MM.1S, MM1.S Lenticrispr vacío y MM.1S.Bax/Bak KO a una densidad de 3×10^5 células/ml y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados mostrados son la media \pm SD (n=6) y la significancia determinada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea control donde *p<0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 y **** p< 0,0001.

Como se observa en la gráfica anterior, la ausencia de BAK y BAX protege parcialmente a las células de mieloma frente al efecto citotóxico de ixazomib. Aunque a dosis de 25 nM la ausencia de BAK y BAX parece proteger del efecto de ixazomib

revirtiendo incluso la sensibilización producida por la infección lentiviral, a partir de 50 nM se observa un incremento de la muerte celular. Esta muerte puede ser debida a una posible vía de muerte independiente de BAX y BAK, activada por el tratamiento con inhibidores de proteasoma como se ha descrito con anterioridad (Hellwig et al., 2021). En el citado estudio se describe que la caspasa-8 sirve como caspasa iniciadora para la muerte apoptótica en respuesta a la inhibición del proteasoma en condiciones donde la vía mitocondrial apoptótica está bloqueada. El estudio de esta posible vía se profundiza en el **apartado 4.1**.

Hasta ahora hemos analizado desde el punto de vista de delección de proteínas pro-apoptóticas, pero conviene saber que sucede cuando se sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas. Para ello se estudió el efecto de ixazomib a diferentes dosis en células RPMI8226 que sobreexpresan BCL-X_L o MCL-1 como se recoge en la **Figura 4.17**.

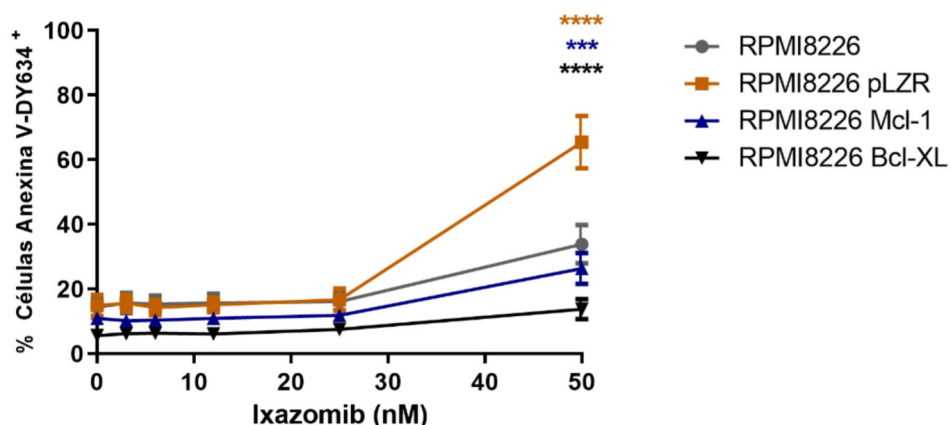


Figura 4.17. Estudio de la muerte celular ocasionada por ixazomib en células RPMI8226 con sobreexpresión de BCL-X_L o MCL-1. En este ensayo se sembraron 3×10^5 células/ml y se trataron con concentraciones crecientes de ixazomib. Posteriormente se analizó la muerte por apoptosis mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=6$ y la significancia determinada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración de ixazomib respecto a la línea control donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Al igual que ocurría en las células modificadas mediante CRISPR-Cas9 (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), el proceso infectivo aumenta la sensibilidad de la línea RPMI8226 a ixazomib. La sobreexpresión de BCL-X_L en la línea RPMI8226 proporciona la mayor protección ante el efecto de ixazomib reduciendo considerablemente su efecto tóxico, sobre todo a dosis altas (50 nM) respecto a la línea RPMI8226 pLZR (**Figura 4.17**). La sobreexpresión de MCL-1 también reduce

considerablemente la sensibilidad a ixazomib generada por la infección lentiviral. Esta línea sin modificar (RPMI8226) depende principalmente de MCL-1 y posteriormente de BCL-X_L. Por tanto, parece lógico al sobreexpresar BCL-X_L se potencie el efecto protector frente a ixazomib, ya que esta proteína otorga una doble barrera anti-apoptótica más activa.

Se ha visto que la sobreexpresión de MCL-1 ayuda a la supervivencia en el mieloma múltiple mientras que la inhibición de ésta produce una activación rápida de la apoptosis (Zhang et al., 2002). La adición de inhibidores de proteasoma inducen la activación de NOXA quien inhibe a MCL-1 (Podar et al., 2008; A. H. Wei et al., 2020) produciendo cierta muerte celular en la línea RPMI8226 MCL-1 pero, insuficiente, puesto que MCL-1 a su vez está sobreexpresado. En lo referente a la protección por la sobreexpresión de BCL-X_L, anteriormente se describió que altos niveles de dicha proteína inhiben la acción de diferentes inhibidores de proteasoma como MG-132 (Yuan et al., 2009), por lo que los datos obtenidos en esta tesis confirman este comportamiento.

En conclusión, la sobreexpresión de BCL-X_L es más efectiva ante ixazomib en la línea RPMI8226 que la sobreexpresión de MCL-1 corroborando los antecedentes existentes.

4.1.8. Muerte independiente de BAX/BAK inducida por ixazomib en líneas de mieloma múltiple.

Para determinar si ixazomib activa la vía extrínseca en células deficientes en BAK y BAX, se analizó por citometría de flujo la muerte inducida por dicho IP en presencia o ausencia de Z-VAD-fmk, Z-DEVD-fmk (inhibidor específico caspasa-3) o Z-IETD-fmk (inhibidor específico caspasa-8) en células de mieloma múltiple de la línea MM.1S, parentales o modificadas mediante CRISPR/Cas9 para generar una línea deficiente en BAK y BAX (generada por el estudiante de doctorado Manuel Beltrán-Visiedo y el Dr. Alfonso Serrano). Las células se preincubaron 1 h con cada inhibidor de caspasas (100 µM) antes de añadir ixazomib a 25 nM durante 24 h. Posteriormente se midió el potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda DIOC₆(3) y la exposición de fosfatidilserina.

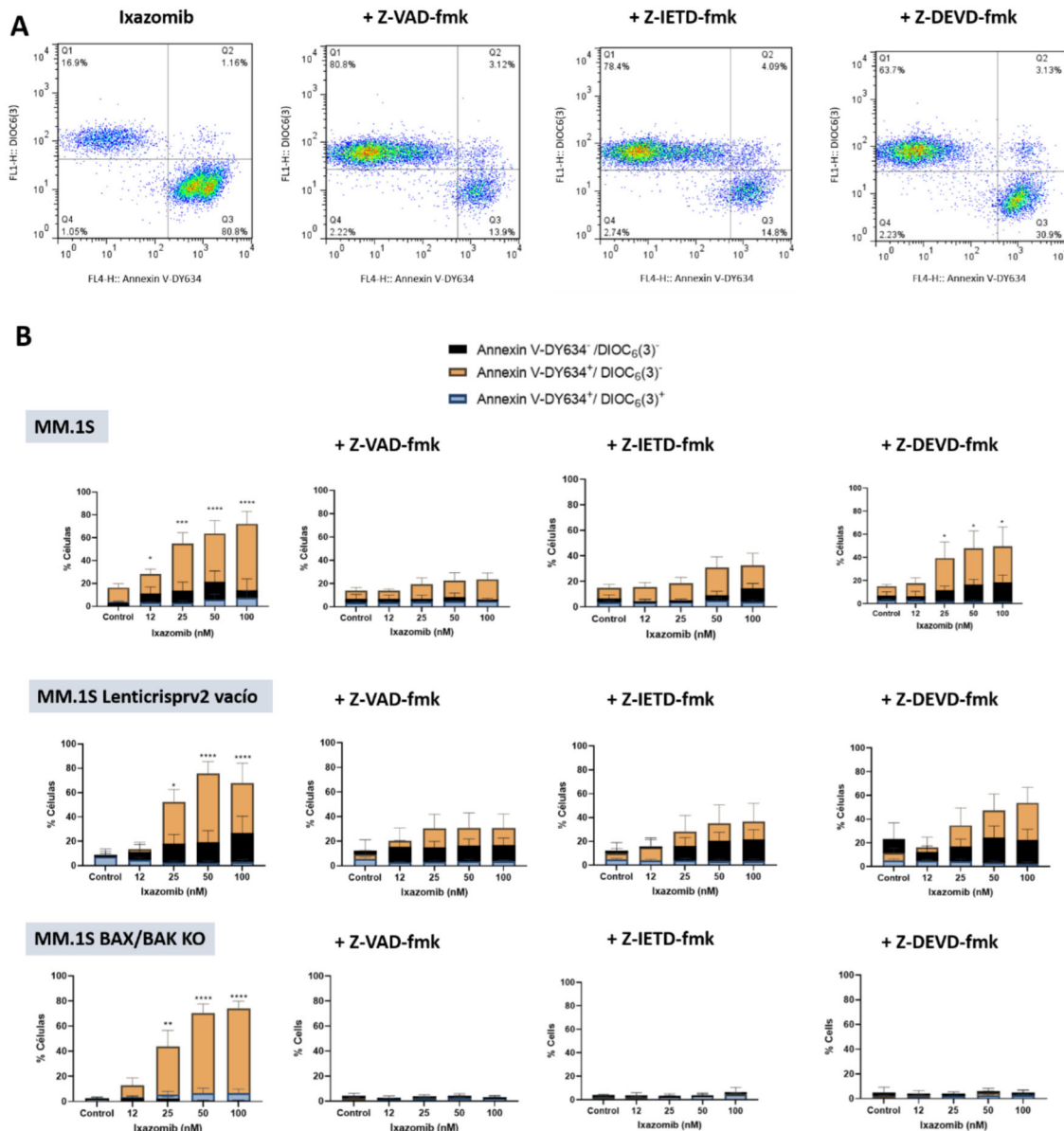


Figura 4.18. Efecto de diferentes inhibidores de caspasas en la muerte inducida por ixazomib en células MM.1S deficientes en BAX y BAK. En este ensayo se sembraron de cada línea 2×10^5 células por condición de tratamiento y se marcaron para un posterior análisis mediante citometría de flujo con Anexina V-DY634 y la sonda mitocondrial DiOC₆(3). **(A)** Dot-plots representativos de la respuesta de la línea MM.1S a ixazomib (25 nM) en presencia y ausencia de cada inhibidor de caspasas. **(B)** Representación de los resultados obtenidos en las líneas MM.1S, MM.1S Lenticrisprv2 vacío y MM.1S BAX/BAK KO. Las dosis de los diferentes inhibidores Z-VAD-fmk, Z-IETD-fmk y Z-DEVD-fmk es 100 μ M en las tres líneas. Los resultados son la media \pm SD de cada marcaje de $n=4$ en todas las líneas y la significancia está obtenida mediante análisis *t-test* respecto el control de cada línea y condición de inhibidor de caspasa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Los resultados que se recogen en la **Figura 4.18** indican que ixazomib produce muerte independientemente de la presencia o ausencia de las proteínas BAK y BAX. Este resultado sugiere que la apoptosis inducida por ixazomib se realiza a través de la

activación de la vía extrínseca, además de la vía intrínseca. Además, los inhibidores de caspasas ejercen su papel protector frente a ixazomib en mayor o menor medida según su especificidad siendo más efectivo Z-VAD-fmk al tratarse de un inhibidor pancaspasa. Por otro lado, Z-IETD-fmk proporciona una mayor protección que Z-DEVD-fmk sugiriendo la implicación de la caspasa-8 en la muerte inducida por ixazomib en las células deficientes en BAX y BAK y, por tanto, la activación de una vía independiente de la mitocondria.

Se ha descrito anteriormente que el estrés en el RE inicia la apoptosis a través del receptor de muerte DR5 independientemente de su ligando extracelular (Hellwig et al., 2021; Lam et al., 2020). Es decir, la activación de la vía extrínseca de la apoptosis como consecuencia del tratamiento con ixazomib se podría deber a la activación intracelular de los receptores de muerte (DR4 o DR5) por la acumulación de proteínas mal plegadas favoreciendo la formación de complejo DR5-caspasa-8 resultando en la activación de esta última quien a su vez activa a la caspasa-3 o tBID. Este efecto se ha descrito con bortezomib (Hellwig et al., 2021). Además, existen evidencias de que ixazomib induce la expresión de DR5 dependiente de CHOP y ocasiona apoptosis en células de cáncer colorrectal (Yue & Sun, 2019).

4.2 AUTOFAGIA OCASIONADA POR IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE.

La muerte celular engloba diferentes procesos y algunos autores han propuesto que la autofagia podría ser uno de ellos. Sin embargo, muchas evidencias apuntan a un papel protector de la autofagia (Doherty & Baehrecke, 2018; Zheng et al., 2019). Los inhibidores del proteasoma desencadenan la apoptosis produciendo estrés en el RE, que las células pueden contrarrestar mediante la activación de mecanismos de adaptación para evitar la apoptosis. Cuando se inhibe el proteasoma las proteínas poliubiquitinadas se pueden destruir por vías alternativas, por ejemplo, por la formación de agresomas (agregación de proteínas mal plegadas en una estructura basada en microtúbulos) cuya degradación se realiza a través de la autofagia (Manasanch & Orłowski, 2017). La inhibición del proteasoma en células de mieloma implica el bloqueo de una de las principales vías de degradación de proteínas mal plegadas y la generación de estrés, por lo que para compensar este hecho las células pueden activar otras vías alternativas como

es la autofagia. El bloqueo de la autofagia con inhibidores específicos de este proceso, podría, por lo tanto, sensibilizar a las células al tratamiento con inhibidores del proteasoma.

Las células de MM presentan activación basal de la autofagia debido al acúmulo de inmunoglobulinas (Meister et al., 2007). En trabajos anteriores se ha descrito que el tratamiento con bortezomib modula el flujo de autofagia en diferentes tumores como son el mieloma o el melanoma (Di Lernia et al., 2020; Selimovic et al., 2013). Ante este hecho, se estudió si ixazomib induce o aumenta la autofagia en líneas establecidas de MM y cuál es el efecto de los inhibidores de autofagia en la sensibilidad a ixazomib.

4.2.1. Efecto de ixazomib en combinación con diferentes inhibidores de autofagia en líneas celulares establecidas de mieloma múltiple.

En la actualidad existen diferentes inhibidores de autofagia, entre ellos, el más conocido y empleado es la cloroquina, un fármaco lisosomotrópico que se emplea en el tratamiento y prevención de la malaria (Cufí et al., 2013). Este fármaco inhibe la acidificación de los autofagolisosomas, bloqueando por tanto el último paso del flujo autofágico. Recientemente se ha descubierto además, que la inhibición de la AAA ATPasa p97 inhibe la autofagia puesto que esta proteína participa en diferentes procesos como la homeostasis de proteínas, la degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD) y autofagia, entre otros (Le Moigne et al., 2017). Además, la disminución de los niveles de expresión de p97 conlleva la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) (Wójcik et al., 2004). Actualmente se encuentran disponibles dos fármacos capaces de inhibir a esta ATPasa, denominados CB5083 y DBeQ. Estos compuestos, además de promover la apoptosis por la inhibición de p97 y generar estrés en el RE, inhiben parcialmente la autofagia (Chou et al., 2011). DBeQ bloquea múltiples procesos dependientes de la ATPasa p97 como son la degradación por unión de ubiquitina y los indicadores de la vía de la degradación asociada al RE o la maduración del autofagosoma; también inhibe el crecimiento de células cancerígenas y actúa más rápido que los IPs activando a las caspasas-3 y 7 (Cufí et al., 2013). CB5083 ha demostrado una alta actividad antitumoral en múltiples cánceres sólidos y hematológicos como el mieloma múltiple (Le Moigne et al., 2017). Este fármaco es eficaz incluso en pacientes de mieloma con resistencia a los inhibidores de proteasoma, tal que se ha probado en combinación con bortezomib o carfilzomib aumentando la toxicidad con menor dosis que si se emplea de manera individual (Le Moigne et al., 2017).

Por otro lado, el trabajo realizado por el Dr. Vidal Jarauta en este laboratorio demostró que en la línea NCI-H929 se produce una sinergia muy significativa en el cotratamiento con CLQ y carfilzomib, incluso a bajas dosis, y esta aumenta conforme se incrementa la dosis del IP (Jarauta et al., 2016). Se dispone de información insuficiente sobre la combinación de ixazomib y cloroquina en el tratamiento de mieloma múltiple y si esta combinación aumenta la toxicidad generada por el IP en las células.

Conociendo estos antecedentes se estudió si existe una potenciación del efecto citotóxico del inhibidor de proteasoma ixazomib junto a uno de los 3 inhibidores de autofagia nombrados anteriormente. Para ello se sembraron las células y se trataron con cloroquina (CLQ), CB5083 y DBeQ en combinación con ixazomib (15 nM para NCI-H929, 25 nM en las líneas MM.1S, OPM-2 y RPMI8226, y 50 nM en U266).

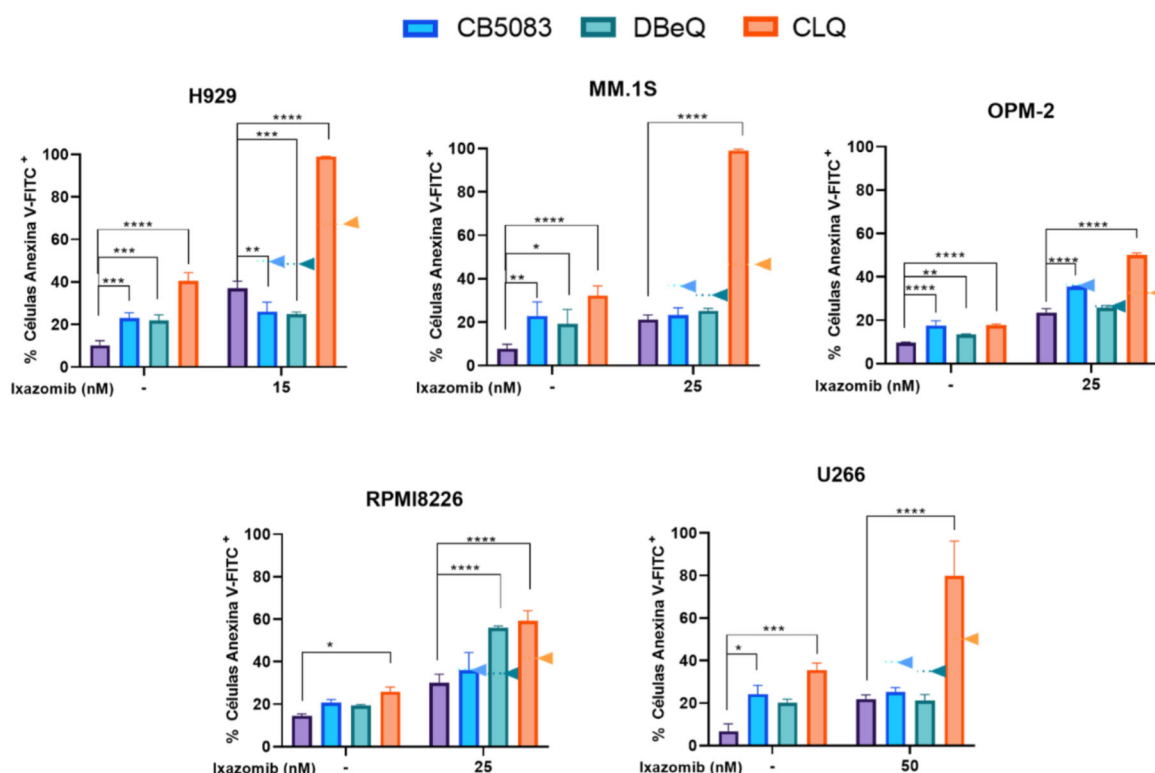


Figura 4.19. Efecto de ixazomib en combinación con diferentes inhibidores de autofagia. Se sembraron 3×10^5 células de cada línea celular por tratamiento y se trataron con los compuestos indicados durante 24 h. Las concentraciones de CB5083 fueron 300 nM para NCI-H929, 800 nM para MM.1S, 250 nM para OPM-2 y 50 nM para las líneas RPMI8226 y U266. La concentración de cloroquina (CLQ) fue 20 μ M en todas las líneas. El inhibidor de p97 DBeQ se usó a una concentración de 1 μ M para RPMI8226 y U266, 1,5 μ M en OPM-2 y, por último, 2,5 μ M para NCI-H929 y MM.1S. Las flechas indican el efecto tóxico de la suma de cada fármaco inhibidor de autofagia junto a ixazomib si fuese aditivo. Los resultados mostrados son la media \pm SD de tres experimentos independientes en todas las líneas. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a su control, siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Como se observa en la **Figura 4.1** a rasgos generales en las líneas establecidas de MM, existe un mayor efecto sinérgico cuando se combina ixazomib con cloroquina; sobre todo en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266. En menor medida se observa sinergia en las líneas OPM-2 y RPMI8226. Este comportamiento de los inhibidores de proteasoma junto a un inhibidor de autofagia se había estudiado con anterioridad, dando mejor resultado la combinación con hidroxicloroquina y carfilzomib (Baranowska et al., 2016), aunque la combinación de este inhibidor de autofagia con bortezomib puede producir efectos antagónicos (Hoang et al., 2009). Sin embargo, con otros inhibidores de autofagia, como la bafilomicina A1, se produce la sensibilización de las células de MM ante el efecto tóxico de bortezomib (Kawaguchi et al., 2011).

Como se ha señalado anteriormente, las células de mieloma múltiple presentan un elevado estrés del RE debido a la continua producción de proteína M, lo cual conlleva a la activación de otras vías como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) o la autofagia, para favorecer la supervivencia celular. Las diferencias observadas ante este tratamiento entre líneas pueden deberse a la expresión de proteínas participantes en la vía principal PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP de la UPR (Wärri et al., 2018). En la tesis llevada a cabo por el Dr. Alfonso Serrano, en este laboratorio, se concluyó que U266 presenta niveles basales elevados de la proteína BIP, e incluso ante el tratamiento conjunto de carfilzomib y cloroquina; a diferencia de las líneas NCI-H929 y MM.1S que presentan niveles basales bajos de esta proteína, que aumentan al ser tratados con carfilzomib o la combinación de este IP con CLQ (Serrano del Valle, 2020). En cuanto a la proteína PERK, las líneas U266 y MM.1S poseen niveles basales bajos que incrementan rápidamente ante el tratamiento de carfilzomib con CLQ, mientras que la línea NCI-H929 ya presenta altos niveles basales que se elevan aún más en los tratamientos que se adiciona cloroquina (Serrano del Valle, 2020). Por otro lado, en ese mismo trabajo se observó que la proteína CHOP aumenta sus niveles en la combinación del IP con CLQ, sobre todo en MM.1S y U266. Además, se sabe que CHOP regula la expresión de proteínas de la familia BCL-2, regulando la expresión de las proteínas anti-apoptóticas a la baja, y al alza la expresión de las proteínas pro-apoptóticas como BIM y PUMA (Puthalakath et al., 2007), lo que justificaría la sinergia observada en estas líneas. En general, los procesos de autofagia, UPR y apoptosis se dan a diferentes tiempos, pero están ligados entre sí, como se ha demostrado que ocurre en modelos de involución de las glándulas mamarias (Wärri et al., 2018).

El fármaco DBeQ, por si sólo tiene un ligero efecto en las líneas de mieloma, pero cuando se combina con ixazomib no se aprecia cambios significativos en la toxicidad del IP, salvo en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266 que se produce un ligero efecto antagónico y, en la línea RPMI8226 donde aumenta la muerte inducida por apoptosis mostrando sinergia, hasta niveles próximos a la combinación de cloroquina e ixazomib. En OPM-2, la combinación de DBeQ e ixazomib muestra un efecto aditivo. La inhibición de p97 conlleva al bloqueo de la ERAD y por tanto, a la activación de la respuesta UPR (Chou et al., 2011). El tratamiento de las células de mieloma con carfilzomib y DBeQ también aumenta los niveles de expresión de CHOP, al menos en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266, así como el incremento de fosforilación de eIF2 α y de XBP1s, este último en la línea NCI-H929 (Serrano del Valle, 2020). El aumento de CHOP tras el tratamiento con inhibidores de proteasoma o con DBeQ está descrito en el trabajo de Chou *et al.* 2011. CHOP se encarga de activar la apoptosis regulando negativamente a p21 deteniendo así el ciclo celular (Mihailidou et al., 2010). Además, anteriormente se había descrito el efecto de la inhibición de p97 junto a bortezomib (Auner et al., 2013), así como se ha descrito una ligera sinergia en las líneas NCI-H929 y MM.1S entre DBeQ y carfilzomib (Serrano del Valle, 2020). Por tanto, las diferencias observadas pueden ser debidas a la naturaleza del IP (reversible o irreversible) o a la expresión de proteínas participantes en la respuesta UPR. Otros autores han descrito que la inhibición de p97 puede sensibilizar a las células de mieloma frente a los inhibidores de proteasoma, debido a que la inhibición de p97 interrumpe el ERAD por encima de la actividad del proteasoma, mostrando efectos independientes de las variaciones en la capacidad proteasomal (Bianchi et al., 2009). Además, en trabajos anteriores, se ha visto que la inhibición de p97 es más eficaz en la alteración de la homeostasis de proteínas que interfieren con la formación del agresoma mediada por la HDAC6 (*H*istone *D*eacetylase *6*) como con la maduración del autofagosoma, que son vías alternativas a la degradación proteasómica (Chou et al., 2011; Gugliotta et al., 2017; Valle et al., 2011). Pero los resultados obtenidos en esta tesis no indican que estos inhibidores sensibilicen de manera general a ixazomib ya que no se ha observado sinergia más que en la línea RPMI8226.

Respecto al fármaco CB5083 no muestra sinergia en combinación con ixazomib en las líneas de mieloma. Destaca el antagonismo en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266, que debería ser analizado con mayor profundidad. Por otra parte, estos resultados contrastan con lo observado en la tesis del Dr. Alfonso Serrano donde se aprecia una

sinergia dependiente de la concentración de CB5083 con carfilzomib en las líneas NCI-H929 y MM.1S. En cambio, en las líneas OPM-2 y RPMI8226 se aprecia una aditividad entre CB5083 e ixazomib. Este dato discrepa con lo que se ha descrito en un trabajo anterior donde la línea RPMI8226 presenta una mayor sensibilidad al tratamiento con carfilzomib si se tratan a la vez con este inhibidor de p97 llegando a presentar un efecto sinérgico (Le Moigne et al., 2017). Una explicación a la contradicción observada con el fármaco CB5083 y los diferentes inhibidores de proteasoma en el tratamiento de células de mieloma múltiple, puede ser debida a la naturaleza del IP (reversible o irreversible) como sucede con DBeQ.

Por tanto, la inhibición de la autofagia potencia la acción de ixazomib principalmente cuando se inhibe el flujo autofagosómico con la adición de cloroquina más que con fármacos que inhiben la AAA ATPasa p97.

4.2.2. Papel de Atg5 en la sinergia entre cloroquina e ixazomib en líneas de mieloma múltiple.

La autofagia puede desempeñar un papel protector y favorecer la supervivencia celular como se ha comentado en el inicio del **apartado 4.2**. Dentro de este mecanismo las proteínas ATG5 y ATG7 tiene un papel importante en la inducción y flujo de la autofagia, conectando con otros procesos como en el estrés del RE, el ciclo celular y la apoptosis a través de la señalización por PERK (Zheng et al., 2019). Concretamente ATG5 está implicada en la formación del autofagosoma, además de regular la calidad mitocondrial después del daño oxidativo, la regulación negativa de la respuesta inmune antiviral innata a través de la asociación a RARRES3 o MAVS, en el desarrollo y proliferación de linfocitos, presentación del antígeno a MHC-II, diferenciación de adipocitos y apoptosis (Ye et al., 2018). Por tanto, estas proteínas están implicadas en los mecanismos que controlan el equilibrio entre la supervivencia y muerte celular.

Teniendo en cuenta estos datos y junto a los obtenidos en el **apartado 4.2.1**, donde se ha demostrado que la cloroquina muestra sinergia aumentando la muerte celular junto a ixazomib sobre todo en las líneas NCI-H929, MM.1S y U266, se estudió si la inhibición prematura de la autofagia por la delección de la proteína ATG5 favorece el efecto sinérgico entre CLQ y el inhibidor de proteasoma ixazomib. Para ello, se sembraron las células MM.1S y MM.1S shAtg5, una sublínea generada previamente en el laboratorio que presenta la autofagia inhibida al no expresar ATG5, y se trataron durante 24 h con dosis diferentes de ixazomib y 15 μ M de cloroquina.

En la **Figura 4.20** se recogen los datos de la combinación de CLQ e ixazomib a dosis crecientes de este IP.

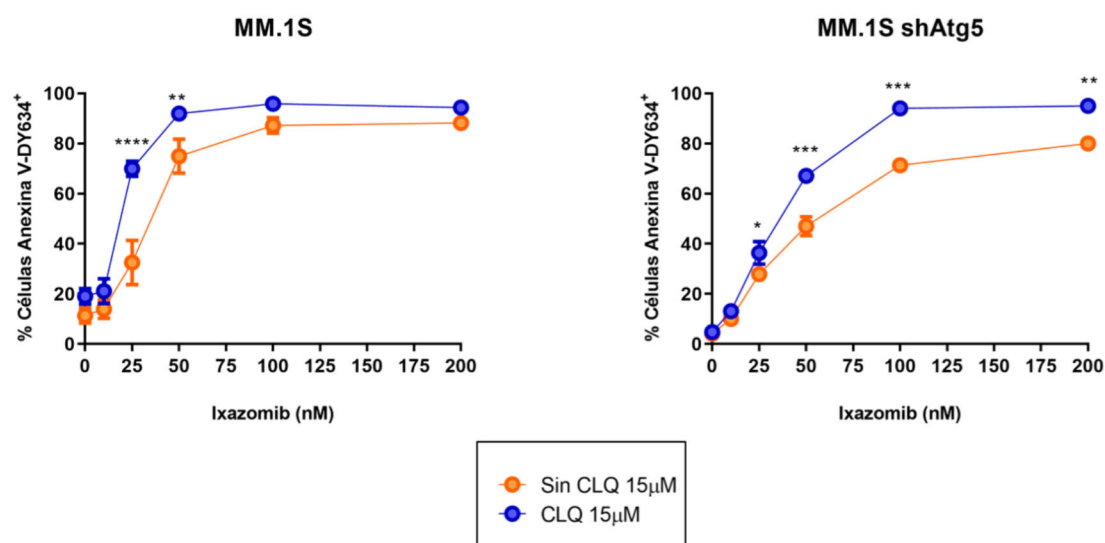


Figura 4.20. Muerte inducida por la combinación de cloroquina con ixazomib en células deficientes en ATG5. Se sembraron 3×10^5 células de cada línea celular por tratamiento, en medio control o con 15 μ M de cloroquina (CLQ) y dosis crecientes desde 0 a 200 nM de ixazomib durante 24 h. Posteriormente se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo con marcaje con Anexina V-DY634. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=3$ en ambas líneas. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *t-test* respecto a la línea sin cloroquina en cada situación siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La combinación de ixazomib con CLQ produce un aumento de la muerte celular por apoptosis muy significativo a la dosis de 25 nM, alcanzando su máximo a la dosis de 50 nM de ixazomib y permaneciendo inalterable a mayores dosis del IP, en comparación con el tratamiento a las mismas dosis de ixazomib sólo.

Es destacable, el efecto de la combinación de cloroquina e ixazomib conforme aumenta la dosis del IP en la línea deficiente de ATG5 (MM.1S shAtg5). Estos resultados sugieren que el uso de cloroquina como tratamiento no implica que se potencie la apoptosis debido a su efecto inhibidor de la autofagia, ya que estas células no expresan ATG5. En cambio, la adición de ixazomib potencia también la apoptosis en esta línea, mostrando mayor efecto sinérgico a mayor dosis de ixazomib hasta 100 nM donde ya se mantiene el efecto causado por la combinación. Además, se puede deducir que la línea MM.1S shAtg5 es más resistente al inhibidor de proteasoma respecto a la línea MM.1S, pero la combinación con CLQ produce un aumento de la citotoxicidad hasta niveles equivalentes a los observados en la línea parental en las dosis más elevadas.

4.2.3. Estado flujo autofágico en células de MM deficientes en ATG5 tratadas con cloroquina.

La inhibición de la autofagia por parte de la cloroquina se debe a que evita la acidificación del lisosoma, lo que supone el acúmulo de proteínas y orgánulos que no son degradados. Los marcadores habituales para medir el flujo autofágico son el aumento de los niveles de LC3B-II o el acúmulo de p62 (Klionsky et al., 2016). LC3B-II es escindido de la membrana del autofagosoma por ATG4 para favorecer el reciclaje una vez finalizada la autofagia. Por tanto, el acúmulo de LC3B-II en los autofagolisosomas de células tratadas con cloroquina se debe a que no se llega a degradar. Por eso es necesario además de observar LC3B-II, analizar el estado de p62. Esta proteína asociada a ubiquitina interactúa con LC3 puesto que puede unirse a un gran número de proteínas a través de sus múltiples motivos de interacción proteína-proteína, incluyendo proteínas ubiquitinadas, y participa en varias vías de señalización como el estrés celular, la homeostasis entre supervivencia y muerte, y la inflamación (Komatsu & Ichimura, 2010). La proteína p62 se localiza en el autofagosoma debido a la interacción de LC3, por lo que se degrada constantemente cuando el proceso se completa correctamente, pero se acumula si se bloquea el flujo autofágico.

Para determinar si el efecto de la cloroquina sobre la autofagia se ve afectado por la ausencia de la proteína ATG5, implicada en dicho proceso, se estudió la línea MM.1S shAtg5 tratada con 15 μ M de CLQ en condiciones normales de cultivo y en medio reducido en suero durante 24 h. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 4.21**.

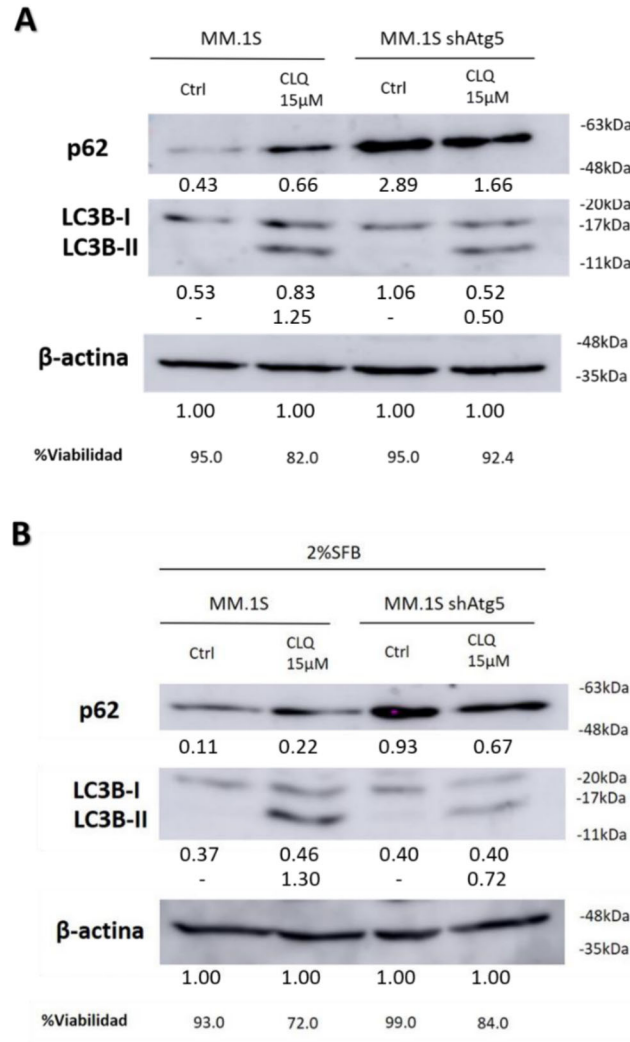


Figura 4.21. Estado de las proteínas p62 y LC3B en células MM.1S y MM.1S shAtg5 tratadas con cloroquina. Las células MM.1S o MM.1S shATG5 se trataron con 15 μM de cloroquina (CLQ) en medio completo con 10% SFB (A) o en medio con 2% SFB (B). Posteriormente se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células en cada condición. La viabilidad celular se estimó mediante citometría de flujo con marcaje Anexina V-FITC. Cuantificación realizada respecto a β-actina correspondiente mediante el programa Image J.-NIH

La deficiencia de ATG5 se ve reflejada principalmente en la acumulación de p62 ya que incluso en las células MM.1S shAtg5 sin tratar los niveles de p62 son más elevados que en la línea no modificada MM.1S, aunque estos bajan en presencia de cloroquina. En la línea MM.1S se elevan los niveles de p62 cuando se bloquea la autofagia con el fármaco cloroquina mientras que en la línea MM.1S shAtg5 disminuye. Los cambios observados en p62 son equivalentes en ambos medios en los que se encuentran las células. En cambio, LC3B-II no se detecta, en ninguna de las dos líneas, hasta que no se inhibe con cloroquina la acidificación de los autofagolisosomas indicando que el flujo autofágico es defectuoso.

Esta acumulación se da a niveles superiores en la línea MM.1S que en MM.1S shAtg5 indiferentemente de la cantidad de suero presente en el medio.

4.2.4. Efecto de la cloroquina combinado con ixazomib en líneas resistentes a bortezomib.

Los inhibidores de proteasoma han significado un importante avance en el tratamiento del mieloma múltiple, pero en ocasiones surgen resistencia a estos fármacos. Uno de los posibles mecanismos de resistencia es la inducción de agresomas junto a la autofagia como vía de eliminación de las proteínas para evitar el ERAD (Baranowska et al., 2016; Jagannathan et al., 2015). En un ensayo clínico previo se demostró que la combinación de bortezomib con hidroxiclороquina en el tratamiento de mieloma múltiple refractario es una terapia factible, tolerada y que mejora potencialmente el resultado en estos pacientes (Vogl et al., 2014). Y no solo el efecto de bortezomib, sino que también se ve potenciado el de carfilzomib cuando se combina con hidroxiclороquina (Baranowska et al., 2016). En esta tesis se analizó la combinación de ixazomib o carfilzomib con CLQ en una línea RPMI8226 resistente a bortezomib generada previamente en el laboratorio por la Dra. Patricia Balsas (Balsas et al., 2012), como posible tratamiento a pacientes de mieloma múltiple resistentes a bortezomib. Los resultados se recogen en la **Figura 4.22**.

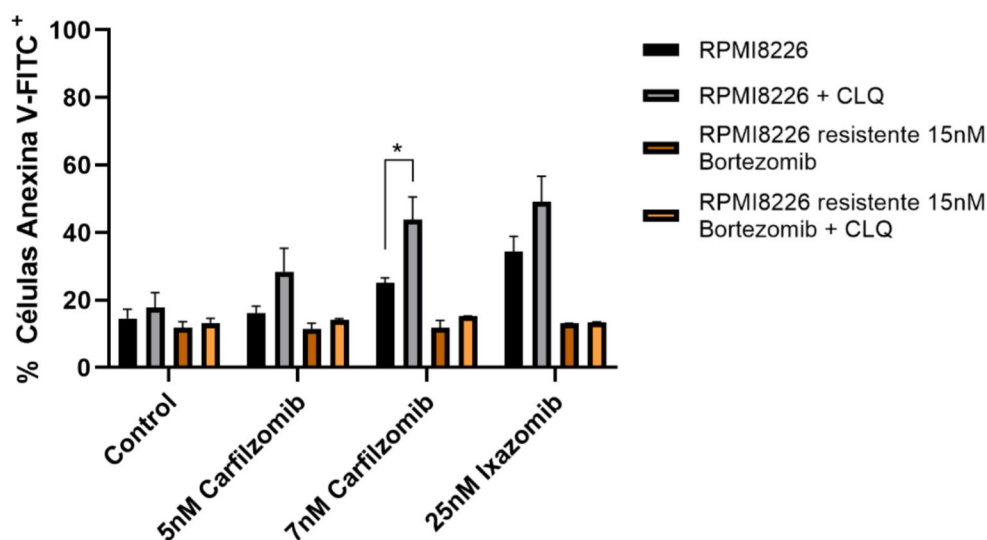


Figura 4.22. Muerte inducida por la combinación de cloroquina con carfilzomib e ixazomib en células resistentes a bortezomib. Se sembraron 3×10^5 células de cada línea celular por cada punto experimental y se trataron con $20 \mu\text{M}$ de cloroquina (CLQ), 5 nM o 7 nM de carfilzomib y 25 nM de ixazomib durante 24 h . Posteriormente se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo con marcaje con Anexina V-FITC. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ en todas las líneas. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a la línea RPMI8226 (negro) siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Tanto el tratamiento con carfilzomib o ixazomib en combinación con CLQ muestra sinergia en el efecto tóxico en la línea RPMI8226, de acuerdo con los resultados previos de nuestro laboratorio en otras líneas celulares (Jarauta et al., 2016). La dosis de carfilzomib es clave en el nivel de sinergia que se establece en el tratamiento junto a CLQ. En cambio, la línea RPMI8226 resistente a bortezomib muestra resistencia cruzada con carfilzomib y, la combinación del inhibidor de autofagia junto a inhibidores de proteasoma de segunda generación no consigue superar la resistencia establecida por bortezomib. Esto contradice lo visto en líneas de mieloma resistentes a carfilzomib, en ellas la adición de hidroxiclороquina al tratamiento con el mismo IP es capaz de contrarrestar dicha resistencia y aumentar la muerte celular (Baranowska et al., 2016). Como se muestra en el artículo de Baranowska, la diferencia de comportamiento puede ser debida al recambio de los proteasomas disfuncionales por proteasomas funcionales, siendo posible incluso ante un IP reversible como es bortezomib, pero imposible ante un IP irreversible como carfilzomib y a su vez el bloqueo de la degradación lisosomal por parte de la hidroxiclороquina favorece el aumento del estrés en el RE. Por otra parte, la línea RPMI8226 resistente a bortezomib presenta una mutación en la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, en el gen *PSM $\beta 5$* , que conlleva una sobreexpresión de dicho gen y una menor unión de bortezomib al proteasoma (Balsas et al., 2012). Estos resultados sugieren que la combinación con cloroquina no sería un tratamiento eficaz en pacientes con mieloma refractario resistentes a IPs.

4.3 COMBINACIÓN DE MIMÉTICOS BH3 E IXAZOMIB EN CÉLULAS DE MIELOMA.

Las proteínas de la familia BCL-2 juegan un papel importante en las resistencias a las terapias antitumorales, por ello se han desarrollado pequeñas moléculas que actúan de manera similar a proteínas BH3-*only*. Estas moléculas, denominadas miméticos BH3, están diseñadas de manera específica contra una proteína anti-apoptótica (BCL-2, BCL-X_L y MCL-1).

El mieloma múltiple sigue siendo incurable y, a pesar de los avances y nuevas terapias que han surgido en las últimas décadas, se producen sucesivas recaídas o resistencia a los tratamientos. En apartados anteriores se ha demostrado como la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas o la reducción en los niveles de la proteína

BIM pueden reducir la sensibilidad de las células de mieloma a ixazomib. Cuando se trata el mieloma múltiple con inhibidores del proteasoma como bortezomib se producen cambios en la expresión de las proteínas de la familia BCL-2, ya que la apoptosis inducida por esta clase de fármacos se realiza a través de la activación de caspasas, tanto por vía intrínseca como extrínseca (Fennell et al., 2008).

Una posible estrategia para mejorar la efectividad de los fármacos utilizados actualmente es su combinación con nuevas moléculas como los miméticos BH3. En otros tipos de tumores, como el melanoma, se ha descrito que la combinación ABT-737 con inhibidores de proteasoma era favorable en el tratamiento de esta enfermedad al inducir apoptosis mediante la activación de NOXA (Miller et al., 2009). En trabajos anteriores se ha observado la eficacia de la combinación de S63845 con ABT-199 en el tratamiento del mieloma múltiple tanto *in vitro* como en modelos murinos (Algarín et al., 2020). A lo largo del desarrollo de esta tesis se estudió la hipótesis de combinar los miméticos BH3 (ABT-199, A-1155463 y S63845), entre ellos y junto al inhibidor ixazomib para observar su efecto en líneas de mieloma múltiple establecidas.

4.3.1. Estudio de la sinergia de las combinaciones de miméticos BH3 con ixazomib en líneas de mieloma múltiple establecidas.

Las células de diferentes líneas celulares se incubaron durante 24 h con concentraciones subtóxicas de cada mimético, sólo o en combinación de ixazomib a la dosis de 25 nM, salvo la línea NCI-H929 que fue con 15 nM.

La primera combinación que se analizó fue ABT-199 (venetoclax) e ixazomib como se muestra en la **Figura 4.21** y en la

Tabla 4.1. Esta combinación ha demostrado ser eficaz en sarcomas, al sensibilizar con venetoclax al tratamiento con inhibidores de proteasoma (Muenchow et al., 2020).

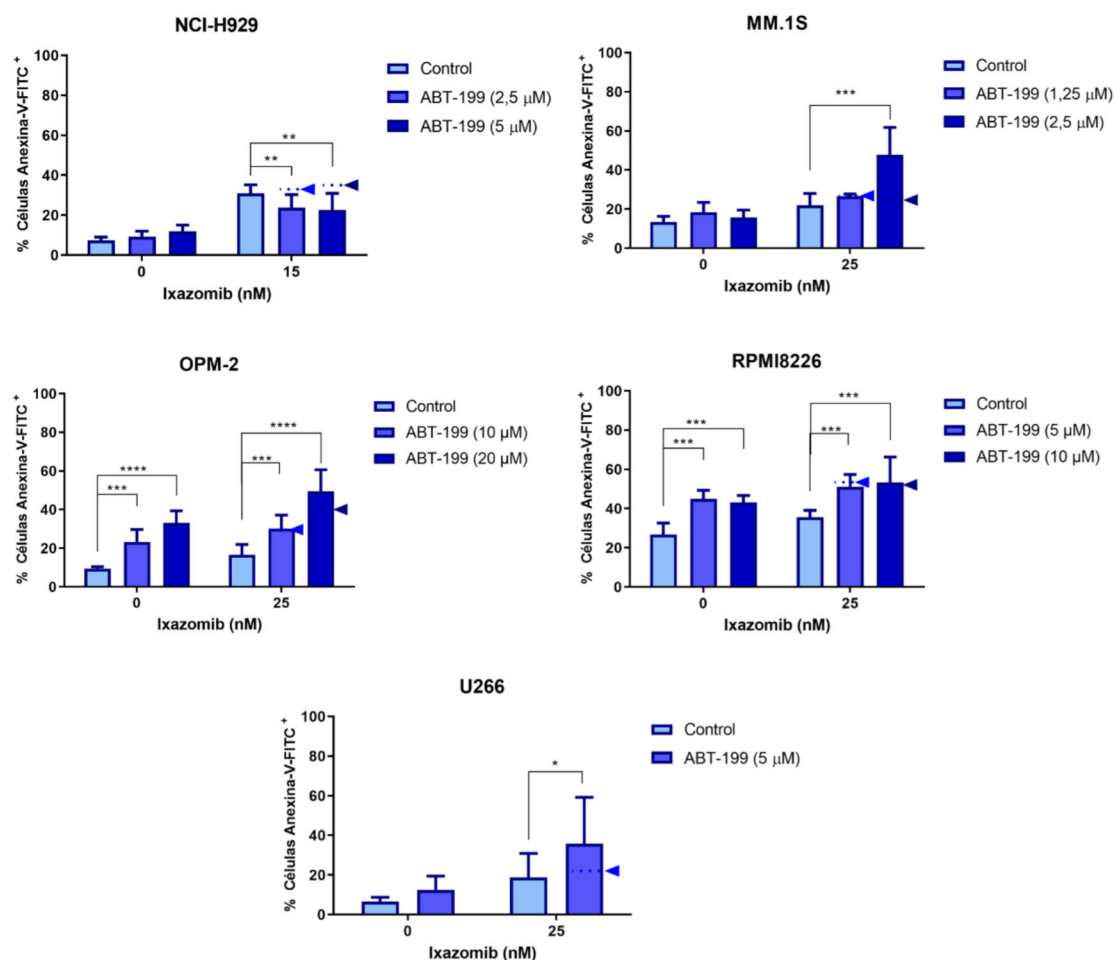


Figura 4.21. Determinación de la muerte celular inducida en líneas de MM por la combinación de ABT-199 e ixazomib. En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento y tras el mismo se marcaron con Anexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ para OPM-2 y RPMI8226, $n=6$ para MM.1S y U266, y $n=7$ para NCI-H929. Las flechas indican la suma de los porcentajes de muerte de los tratamientos individuales. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al estado control (sin mimético BH3) donde $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$ y $****p<0,0001$.

En la línea NCI-H929 la combinación de ABT-199 e ixazomib resulta antagónica al tratamiento sólo con ixazomib, siendo indiferente la dosis del mimético BH3 empleada. Este resultado no es el esperado ya que esta línea expresa principalmente BCL-2, pero concuerda con lo observado en trabajos anteriores (Gong et al., 2016). Si nos fijamos en la línea MM.1S presenta aditividad (como determina el índice de Bliss,

Tabla 4.1) a la dosis de 1,25 μ M de ABT-199 con ixazomib y sinergia a la dosis superior de ABT-199. La línea MM.1S es la línea con mayor sinergia en este tratamiento. Esta línea expresa principalmente BCL-X_L, pero también cuenta como segunda barrera con BCL-2 como hemos visto en la **Figura 4.7**, además de ser junto a la línea U266 las

que menos MCL-1 expresan (**Figura 4.7**). Al inhibir esta última, disminuye la capacidad de contrarrestar la inducción de apoptosis y las células se sensibilizan a otros fármacos, como lo sumado al inhibidor de proteasoma generando estrés en el RE, se potencia el efecto citotóxico de este último.

Para poder estimar de modo más preciso si se produce sinergia hemos empleado el siguiente cálculo, que se denomina índice de Bliss (*Bliss Score*). Este cálculo supone mecanismos de acción independientes de los diferentes fármacos empleados. Las sinergias se detectan comparando los datos obtenidos de una combinación con el efecto aditivo calculado (sumando el efecto de cada fármaco individual). Para ello, se restan los valores calculados de inhibición aditiva a la inhibición medida por la combinación para obtener los valores de diferencia final. El valor de la resta final es el indicativo de sinergia, antagonismo o aditividad. Si los valores son positivos e iguales o superiores a 10 indican sinergia y si son positivos pero inferiores a 10 muestran aditividad; mientras que los valores negativos indican antagonismo (Bliss, 1939).

Tabla 4.1. Índices de la combinación de ABT-199 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo (≥ 10) del índice indica una mayor sinergia, < 10 aditividad y si el valor es negativo antagonismo.

	Ixazomib	ABT-199	
H929	15 nM	2,5 μM	5 μM
<i>Índice de Bliss</i>		<i>-14,38</i>	<i>-12,53</i>
MM.1S	25 nM	1,25 μM	2,5 μM
<i>Índice de Bliss</i>		<i>0,19</i>	<i>27,28</i>
OPM-2	25 nM	10 μM	20 μM
<i>Índice de Bliss</i>		<i>5,69</i>	<i>12,42</i>
RPMI8226	25 nM	5 μM	10 μM
<i>Índice de Bliss</i>		<i>-5,34</i>	<i>6,64</i>
U266	25 nM	5 μM	
<i>Índice de Bliss</i>		<i>10,50</i>	

Por otro lado, en la línea OPM-2 se observa cierta sinergia a la dosis más alta del mimético BH3 ante esta combinación, pero a 10 μ M el índice de Bliss sugiere que el efecto de la combinación es aditivo. OPM-2 expresa BCL-X_L y posteriormente MCL-1 (**Figura 4.7**), siendo esta quien puede dotar a la línea de resistencia ante ABT-199 al unirse BIM libre, como se ha visto en trabajos anteriores publicados (Niu et al., 2016).

Además, esta línea es la más resistente a venetoclax (ABT-199), necesitando al menos una concentración de 10 μ M para observar efecto tóxico en las células. Este comportamiento difiere a la línea RPMI8226 donde se observa un alto antagonismo según el índice de Bliss puesto que la proteína de la familia BCL-2 mayormente expresada es MCL-1 y la que menos BCL-2 (**Figura 4.7**), dotando de resistencia ante venetoclax y presentando antagonismo ante la combinación de ABT-199 e ixazomib a la dosis baja del mimético BH3 y aditividad a la dosis alta. Por último, en la línea U266 se observa también cierta sinergia al combinar venetoclax e ixazomib. Esta sinergia podría deberse a que esta línea depende principalmente de la proteína BCL-2 y expresa niveles altos de ella (Gong et al., 2016). Dicha expresión de BCL-2 se correlaciona con la sensibilidad a ABT-199 presentando una IC_{50} más baja en aquellas líneas que expresan más BCL-2 (Gong et al., 2016; Punnoose et al., 2016; Ross et al., 2015). Por otro lado, la línea U266 también presenta la traslocación t(11;14). Existen múltiples trabajos en los que se demuestra que las células que presentan esta traslocación son más sensibles al ABT-199 (Bajpai et al., 2020; Premkumar et al., 2021; Sidiqi et al., 2020). Se desconoce cuál es el mecanismo por el cual esta traslocación confiere sensibilidad al inhibidor de BCL-2, aunque sí se sabe que las células con esta traslocación y tratadas con venetoclax reducen su respiración mitocondrial (Bajpai et al., 2020). Otra razón puede ser debida a la expresión y unión de BIM con una proteína anti-apoptótica, ya que BIM puede unirse a MCL-1 o BCL-2 (Morales et al., 2011). Anteriormente se ha observado en mieloma múltiple como la resistencia a ABT-199 viene dada por un incremento de las interacciones de MCL-1 con BIM (Algarín et al., 2020), aunque las interacciones de las proteína anti-apoptóticas con las pro-apoptóticas pueden variar según el comportamiento de las células con el microambiente del estroma (Algarín et al., 2021).

Ante los resultados obtenidos de la combinación ABT-199 e ixazomib en los que se observó cierta sinergia en las células MM.1S y U266, se analizó la siguiente combinación con el mimético A-1155463, específico para BCL-X_L, e ixazomib como se muestra en la **Figura 4.22**. Cabe destacar que, a diferencia de la combinación anterior, no se ha probado en la clínica la combinación de A-1155463 con cualquier inhibidor de proteasoma como tratamiento para el mieloma múltiple.

La combinación de A-1155463 e ixazomib presenta sinergia en las líneas NCI-H929, OPM-2 y U266, mientras que en el resto se observa un efecto de aditividad. En la línea NCI-H929 la combinación de A-1155463 e ixazomib presenta sinergia a la dosis

100 nM de A-1155463 con 15 nM de ixazomib. La combinación del IP con 50 nM del mimético muestra aditividad en función del valor del índice de Bliss (

Tabla 4.2). Observando los resultados en la línea MM.1S, se aprecia un efecto aditivo independientemente de la dosis de mimético BH3 empleada, aunque esta es mayor a la concentración más baja (

Tabla 4.2), a diferencia de la línea NCI-H929. Los resultados obtenidos concuerdan con la dependencia de BCL-X_L descrita para esta línea.

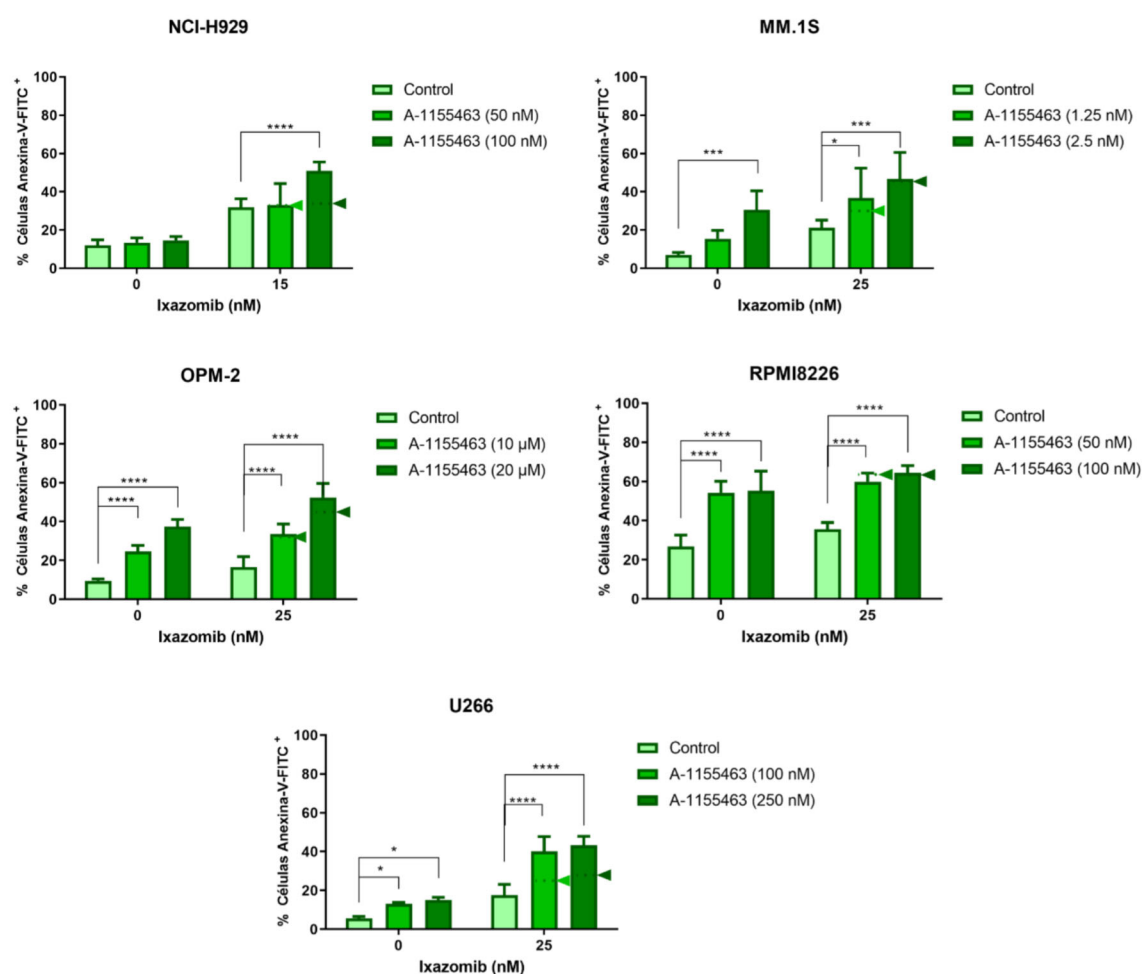


Figura 4.22. Determinación de la muerte celular en líneas de MM por la combinación de A-1155463 e ixazomib. En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento y tras el mismo se marcaron con Annexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ para U266, $n=6$ para NCI-H929, MM.1S y RPMI8226, y $n=8$ para OPM-2. Las flechas indican la suma de los porcentajes de muerte de los tratamientos individuales. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al estado control (sin mimético BH3) donde * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Por otro lado, la línea OPM-2 parece presentar aditividad según el índice de Bliss ante esta combinación a la dosis 10 μM , y cierta sinergia a la dosis 20 μM al mostrar un índice de Bliss superior a 10. Esta línea, al igual que MM.1S, expresa niveles elevados de BCL-X_L pero no es muy sensible a A-1155463 y necesita mínimo 10 μM , para observar efecto tóxico en las células. En cuanto a la línea RPMI8226 no se observó sinergia al combinar el mimético A-1155463 con ixazomib (

Tabla 4.2 y Figura 4.22). A la dosis baja del mimético BH3 se observa un ligero antagonismo y a la dosis alta aditividad. Puede ser debido a que el papel más importante de las proteínas de la familia BCL-2 anti-apoptóticas lo desempeña MCL-1, como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, el trabajo de Gong *et al.* 2016 muestra como esta línea presenta una sensibilidad media a A-1155463. Por último, la línea U266 presenta sinergia ante esta combinación a pesar de que predomine la acción de la proteína BCL-2, pero está seguida de BCL-X_L.

Tabla 4.2. Índices de la combinación de A-1155463 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo (≥ 10) del índice indica una mayor sinergia, < 10 aditividad y si el valor es negativo antagonismo.

	Ixazomib	A-1155463	
H929	15 nM	50 nM	100 nM
<i>Índice de Bliss</i>		0,16	19,34
MM.1S	25 nM	1,25 nM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		8,89	5,86
OPM-2	25 nM	10 μM	20 μM
<i>Índice de Bliss</i>		0,27	11,15
RPMI8226	25 nM	50 nM	100 nM
<i>Índice de Bliss</i>		-0,08	5,16
U266	25 nM	100 nM	250 nM
<i>Índice de Bliss</i>		16,9	18,5

Los cánceres hematopoyéticos como leucemias y mielomas tienden a sobreexpresar las proteínas BCL-2 y MCL-1 (Anstee et al., 2019; Reed, 2008). En el caso del mieloma múltiple, MCL-1 parece desempeñar un papel predominante en la supervivencia celular (Derenne et al., 2002; Gong et al., 2016; B. Zhang et al., 2002). Además, como hemos observado en el **apartado 4.1** y se recoge en un estudio anterior, los inhibidores de proteasoma como ixazomib o bortezomib aumentan la expresión de

MCL-1, entre otras proteínas, en leucemias mieloides agudas o mieloma (Anstee et al., 2019). Otro dato a tener en consideración es que a diferencia del inhibidor de ABT-199, S63845 es eficaz en líneas con traslocaciones t(11;14), t(4;14), con mutaciones en p53 o con ganancia 1q (Algarín et al., 2020, 2021; Kotschy et al., 2016). Basándonos en estos antecedentes se decidió estudiar la combinación del mimético BH3 S63845 e ixazomib como se muestra en la **Figura 4.23**.

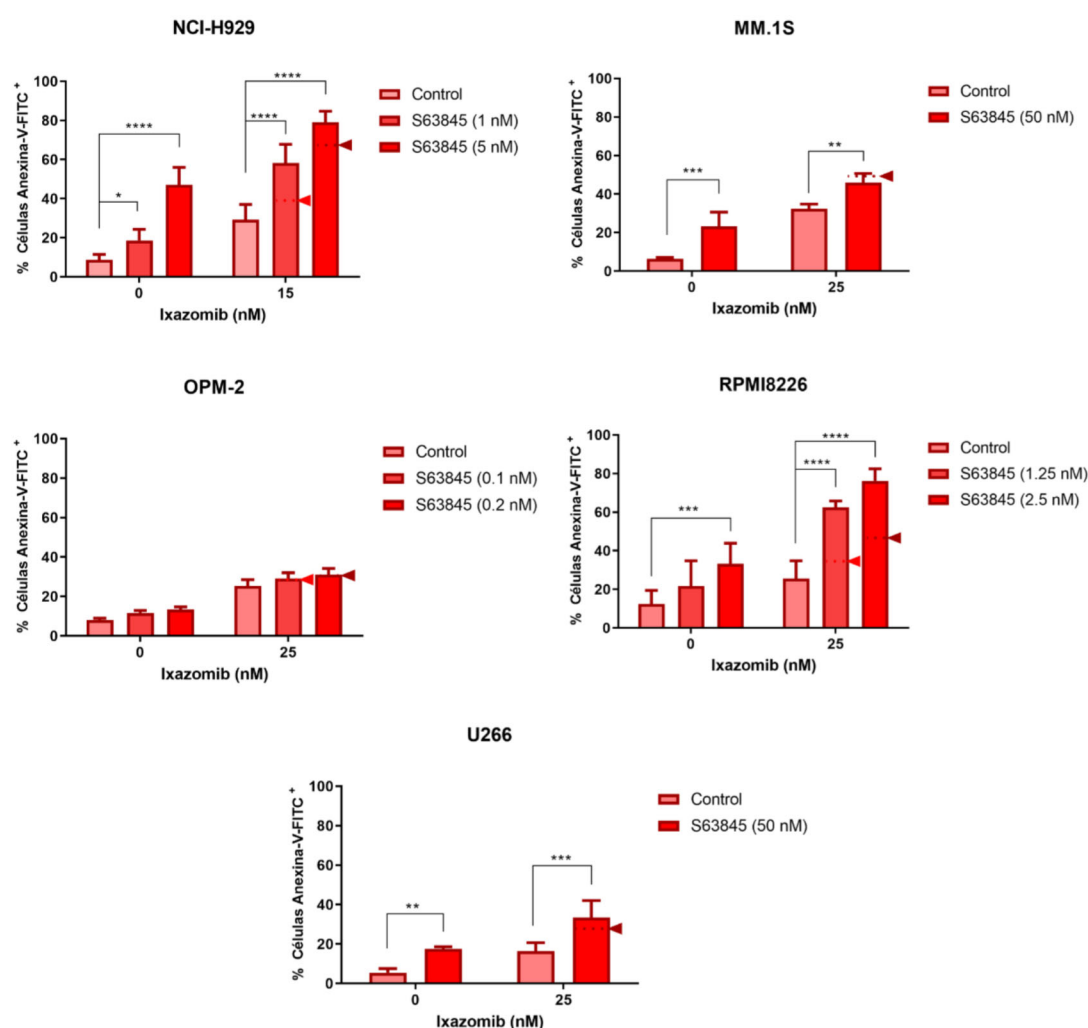


Figura 4.23. Determinación de la muerte celular en líneas de MM para la combinación de S63845 e ixazomib. En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento y tras el mismo se marcaron con Annexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ para MM.1S y U266, y $n=6$ para NCI-H929, OPM-2 Y RPMI8226. Las flechas indican la suma de los porcentajes de muerte de los tratamientos individuales. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al estado control (sin mimético BH3) donde ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La combinación de S63845 e ixazomib resulta sinérgica en las líneas NCI-H929 y RPMI8226, mientras que en el resto de las líneas estudiadas muestra un efecto aditivo al analizar el índice de Bliss (

Tabla 4.3). En la línea NCI-H929 el efecto tóxico está principalmente ocasionado por la inhibición de MCL-1. Esta línea expresa MCL-1 como segunda proteína anti-apoptótica principal y es sensible al inhibidor de MCL-1 (Kotschy et al., 2016). Mientras que en la combinación de ABT-199 con ixazomib resultaba antagónica por el papel protector de MCL-1, la inhibición de este por parte del compuesto S63845 aumenta el efecto tóxico de ixazomib. La línea MM.1S no presenta sinergia en comparación con NCI-H929, mostrando una ligera aditividad, además de necesitar una mayor dosis de S63845 para apreciar muerte apoptótica en las células. Como se ha indicado anteriormente, MM.1S expresa elevados niveles de BCL-X_L y BCL-2 en la protección contra el desarrollo de la apoptosis por lo que es lógico que las combinaciones anteriores sean más efectivas que la de S63845 e ixazomib.

Tabla 4.3. Índices de la combinación de S63845 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo (≥ 10) del índice indica una mayor sinergia, <10 aditividad y si el valor es negativo antagonismo.

	Ixazomib	S63845	
H929	15 nM	1 nM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		23,8	22,0
MM.1S	25 nM	50 nM	
<i>Índice de Bliss</i>		1,52	
OPM-2	25 nM	0,1 nM	0,2 nM
<i>Índice de Bliss</i>		0,69	1,43
RPMI8226	25 nM	1,25 nM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		33,01	37,5
U266	25 nM	50 nM	
<i>Índice de Bliss</i>		6,69	

Si nos centramos en la línea OPM-2, no se observa sinergia entre los dos compuestos, a pesar de que esta línea es la más sensible a la inhibición de MCL-1, pero sí se observa aditividad. Por otro lado, la línea RPMI8226 es la línea con mayor sinergia y, por tanto, muerte celular ante esta combinación. Esto se debe a que el principal mecanismo de evasión de la apoptosis lo realiza mediante la proteína anti-apoptótica

MCL-1. Y, por último, la línea U266 presenta un efecto aditivo al combinar dichos fármacos.

4.3.2. Efecto de las combinaciones entre miméticos BH3 e ixazomib sobre los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL-2.

Los resultados anteriores parecen indicar que las combinaciones más prometedoras para aumentar la eficacia de ixazomib serían con A-1155463 o con S63845. Para intentar comprender cómo se produce la sensibilización en dichas combinaciones se investigó el estado de las proteínas de la familia BCL-2 en las líneas OPM-2 y RPMI8226 tratadas con ixazomib y el inhibidor S63845 a diferentes tiempos, como se aprecia en la **Figura 4.24**.

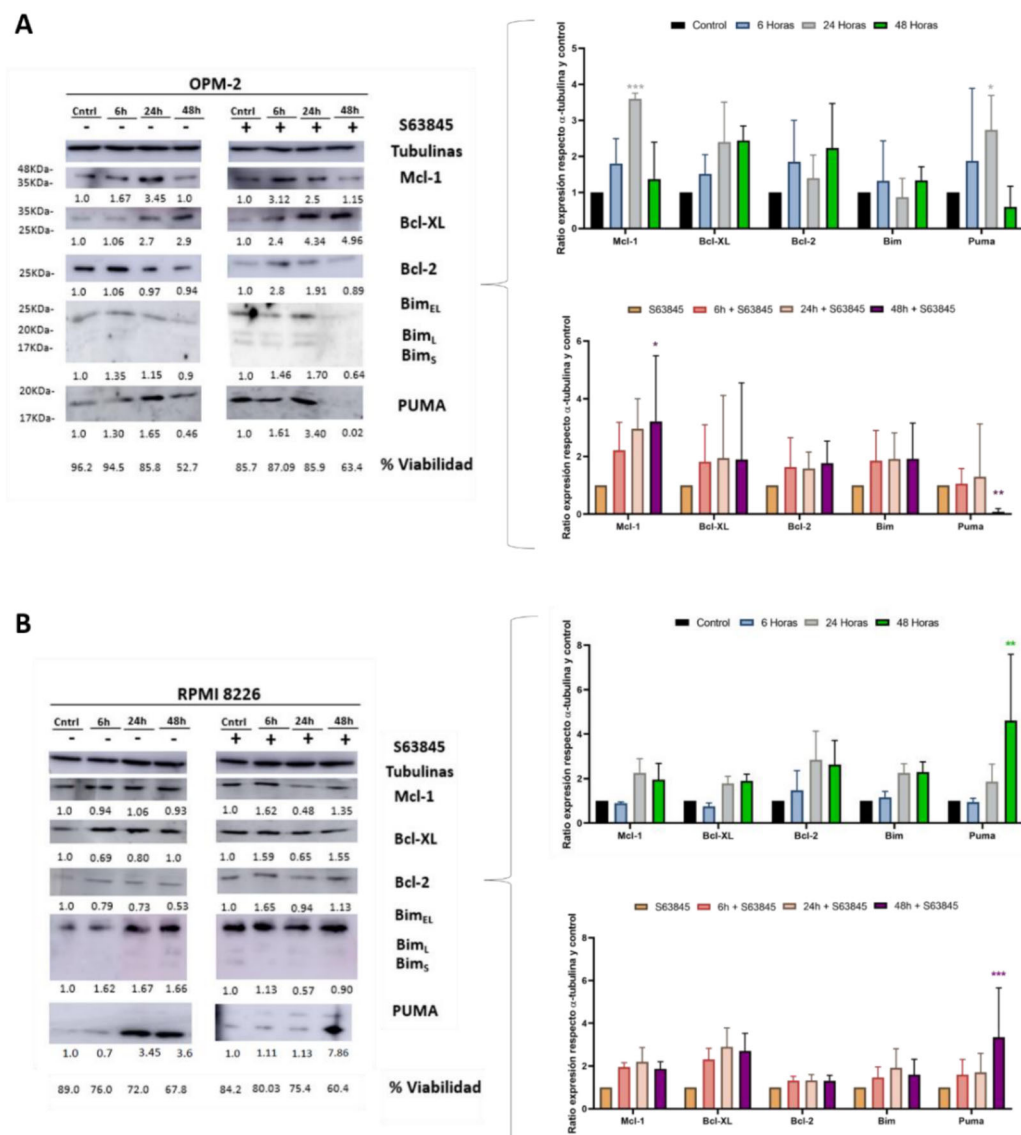


Figura 4.24. Efecto del tratamiento S63845 e ixazomib en los niveles de proteínas de la familia BCL-2 de las líneas OPM-2 (A) Y RPMI8226 (B). Las células fueron tratadas con 0,2 nM de S63845 en el caso de OPM-2 y 1,25 nM en RPMI8226 y con 25 nM de ixazomib ambas líneas a las 6, 24 y 48 h. Tras los tratamientos, se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células de cada línea celular y cada condición. La

cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada tiempo y respecto las células sin tratamiento (control), mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante citometría de flujo con marcaje con Anexina V-FITC. Imagen representativa de n=2-4. Y la estadística (\pm SEM) está realizada mediante two-ANOVA con posterior test de Dunett siendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Las diferencias que se aprecian en la línea OPM-2 cuando es tratada con S63845 e ixazomib respecto al IP sólo se encuentran principalmente en la expresión de las proteínas de la familia BCL-2 en nivel y tiempo. En el tratamiento conjunto MCL-1 se induce, además de mantenerse más tiempo, y eleva su expresión a las 6 h y continúa aumentando hasta las 48 h donde alcanza niveles máximos, a diferencia del tratamiento con ixazomib sólo donde el máximo de expresión se produce a las 24 h y luego disminuye. También aumenta la expresión de BCL-X_L a las 24 h y esta se mantiene en el tiempo, al igual que con ixazomib sólo, pero su nivel de expresión es inferior al obtenido en el tratamiento sólo con ixazomib. La proteína BCL-2 no muestra diferencia a nivel de expresión dándose a las mismas horas (6 h). Respecto a las proteínas pro-apoptóticas, los niveles de BIM aumentan en ambos tratamientos, alcanzando un máximo a las 6 h que se mantiene solo en el tratamiento combinado con ixazomib y S63845. Finalmente, se produce un aumento de los niveles de PUMA durante el tratamiento con ixazomib, que no se observa en el tratamiento combinado.

En la línea RPMI8226 la expresión de MCL-1 se adelanta a las 6 h y se da a un nivel mayor que en el tratamiento con ixazomib individual. Al igual que sucede con la expresión de BCL-X_L. En cambio, la inducción de BCL-2 se comporta de manera similar en los dos tratamientos, aunque se adelanta ligeramente a las 6 h y mantienen los niveles durante el tiempo en la combinación del mimético BH3 e ixazomib. Respecto a las proteínas pro-apoptóticas, en la combinación de ambos fármacos la expresión de BIM no sufre cambios significativos. Por otro lado, PUMA se comporta similar en ambos tratamientos, aunque difieren en el nivel de expresión a las 48 h siendo superior en el tratamiento combinado con S63845 e ixazomib.

El hecho de que los niveles de MCL-1 se mantengan más tiempo y no aumente PUMA podría estar relacionado con la falta de sinergia de esta combinación en las células OPM-2 (**Figura 4.23**). Sin embargo, en la línea RPMI8226 los niveles de PUMA aumentan en ambos tratamientos y podría contrarrestar el aumento de MCL-1 y BCL-X_L, el cual es menor que en la línea OPM-2.

La sobreexpresión de MCL-1 cuando se añade S63845 está previamente descrita en trabajos anteriores (Dengler et al., 2020; Kotschy et al., 2016; Li, He, & Look, 2019). Además, existen estudios que demuestran que el inhibidor S63845 es eficaz en cánceres dependientes de MCL-1 mediante la activación de la vía mitocondrial apoptótica por parte de BAK/BAX y la correspondiente salida de citocromo C (Kotschy et al., 2016) e incluso en aquellos cánceres resistentes a ABT-199 ((Dengler et al., 2020). S63845 se une al surco canónico de MCL-1 liberando las proteínas BIM y NOXA de la interacción inhibitoria por parte de MCL-1 y permitiendo así que se desencadene la apoptosis mediante la unión a las proteínas BAX y BAK; por tanto, las células intentan contrarrestar dicha acción mediante un aumento de la expresión de MCL-1 (Dengler et al., 2020). Otra opción al aumento de MCL-1 podría deberse a que al separarse de NOXA podría estar degradándose más lentamente. También se ha observado que el tratamiento con S63845 en células de mieloma muestra un aumento de la interacción del complejo BCL-X_L/ BIM, por lo que la proteína BCL-X_L puede estar ejerciendo un papel importante y desconocido en la resistencia a este fármaco (Algarín et al., 2021).

Por otro lado, existe cierta controversia sobre los factores que determinan la sensibilidad a S63845 (Kotschy et al., 2016; Li et al., 2019). Algunos estudios sugieren que dicha sensibilidad viene determinada principalmente por las proteínas anti-apoptóticas de las que depende cada línea celular, siendo más eficaz en aquellas líneas que dependen de MCL-1, pero sobre todo si presentan niveles ínfimos de BCL-X_L, y en menor medida de aquellas que predomina la acción de BCL-2 o BCL-X_L (Kotschy et al., 2016); sin embargo, existen también datos que indicarían que no existe relación entre los niveles de las proteínas anti-apoptóticas y la sensibilidad a los miméticos BH3 (Li et al., 2019) ni de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas como BIM o NOXA (Dengler et al., 2020). En lo que están de acuerdo es que actúa indiferentemente del estado de p53 (Kotschy et al., 2016) pero de manera dependiente de la traslocación genómica que presentan. Por ejemplo, se ha visto que las células que presentan la traslocación t(11;14) muestran mayor sensibilidad a venetoclax (Bajpai et al., 2020; Premkumar et al., 2021; Sidiqi et al., 2020), y por otro lado algunos datos indican que la amplificación 1q puede influir en la sensibilidad a los inhibidores de MCL-1 (Slomp et al., 2019).

El aumento de PUMA que se refleja en esta tesis no se ha descrito con anterioridad al tratar las células con S63845, y tampoco puede ser debido en mayor medida a la acción del inhibidor de proteasoma quien actúa a través de la vía p53-NOXA-PUMA entre otras

como se describe en el trabajo de Muz *et al.* 2016 porque ambas líneas poseen p53 mutado.

4.3.3. Combinaciones de dos miméticos BH3 e ixazomib.

Los resultados anteriores indican que el empleo individual de un solo mimético BH3 es solo relativamente eficaz en algunas líneas de mieloma. En enfermedades de células B, se ha descrito que la resistencia a ABT-199 puede deberse a la expresión de las proteínas BCL-X_L y MCL-1 que secuestran a BIM libre (Algarín et al., 2020, 2021; Kapoor et al., 2020). Ante este dato se hipotetizó si la inhibición de 2 proteínas anti-apoptóticas de manera simultánea a la inhibición del proteasoma con ixazomib potenciaría el efecto citotóxico de este último superando las resistencias existentes a cada mimético BH3. Por ejemplo, en el caso del melanoma se ha descrito que el uso de S63845 y navitoclax, inhibidor de BCL-2 y BCL-X_L, favorece el tratamiento de casos complicados (Mukherjee et al., 2020) o para casos de linfoma de células del manto resistentes a ABT-199, en las que resulta eficaz la combinación de ABT-199 y S63845 (Dengler et al., 2020). En mieloma múltiple se ha visto como la combinación de ABT-199 y S63845 aumenta el efecto citotóxico de cada uno de los fármacos y si se adiciona un tercer fármaco como la dexametasona se observa una mayor sinergia (Algarín et al., 2020). También se ha visto en pacientes con la amplificación 1q21 como el tratamiento dual de inhibidores de MCL-1 junto a inhibidores de BCL-2 o BCL-X_L favorecía la muerte celular del tumor en dichos pacientes (Slomp et al., 2019). Además, existen estudios que demuestran que la inhibición dual de BCL-2 y BCL-X_L favorece la acción de determinados fármacos antitumorales o la radioterapia para diferentes cánceres (Del Bufalo et al., 2003; F. Luo et al., 2021; Ritter et al., 2021; Zhang et al., 2018). Por otro lado, el fármaco ABT-737 (que inhibe a BCL-2 y BCL-X_L) ya se ha probado en combinación con inhibidores de proteasoma (bortezomib) favoreciendo el efecto tóxico de estos últimos incluso contrarrestando la resistencia generada a ellos en pacientes (Chauhan et al., 2007; Kline et al., 2007), por lo que es un buen punto de partida para comparar el efecto si inhibimos con los inhibidores más específicos y eficaces de las proteínas BCL-2 y BCL-X_L individuales (ABT-199 y A-1155463 respectivamente).

Se realizaron 3 ensayos en los que se combinaron ABT-199/A-1155463/ixazomib (**Figura 4.2**), ABT-199/S63845/ixazomib (**Figura 4.26**) y la última, A-1155463/S63845/ixazomib (**Figura 4.28**). Las dosis para estas combinaciones se

eligieron en función a una curva dosis-respuesta de la combinación de ambos miméticos BH3 que ocasionen una muerte no muy elevada.

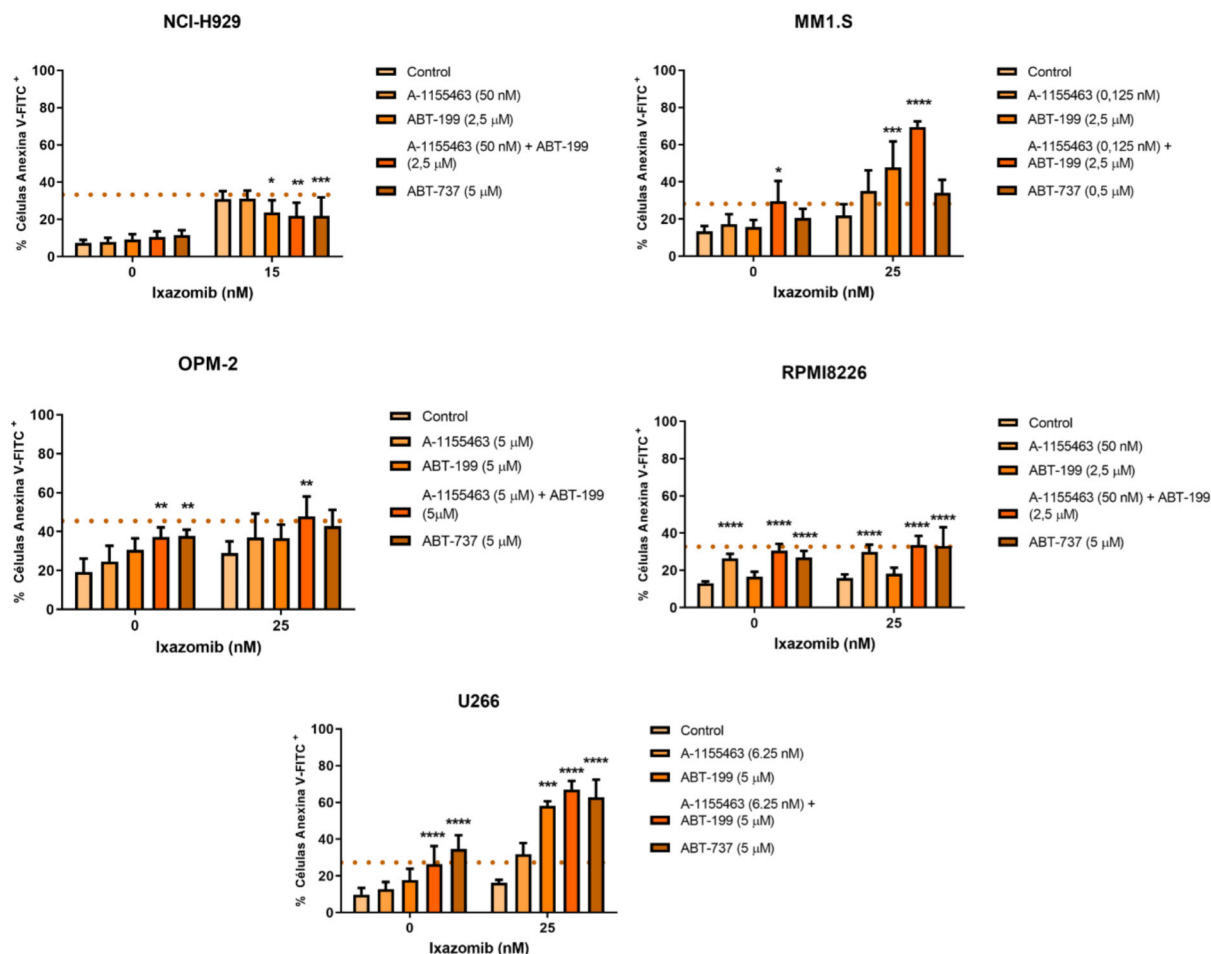


Figura 4.25. Determinación de la muerte celular inducida en líneas de MM por la combinación de ABT-199, A-1155463 e ixazomib. Para determinar la sinergia de los compuestos se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento, y tras el mismo se marcaron con Annexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La línea discontinua de puntos naranjas indica la suma de los porcentajes de muerte celular de cada tratamiento individual. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ para MM.1S y OPM-2, $n=6$ para RPMI8226, $n=8$ para U266, y $n=10$ para NCI-H929. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al control (sin mimético BH3) donde * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$.

Los resultados recogidos en la **Figura 4.2** indican que la combinación de ABT-199, A-1155463 e ixazomib presenta una mayor sinergia en las líneas MM.1S y U266. La doble inhibición de BCL-2 y BCL-X_L con inhibidores específicos de cada una como ABT-199 y A-1155463 potencia el efecto citotóxico de ixazomib. Cuando añadimos ABT-737, un inhibidor dual de BCL-2 y BCL-X_L, se potencia el efecto de ixazomib sobre las células MM.1S, pero a un nivel inferior que con la combinación anterior. En la línea U266 también se observa sinergia ante esta combinación, pero a niveles similares a inhibir

BCL-X_L y BCL-2 con el inhibidor no selectivo ABT-737 e ixazomib. En la línea NCI-H929 la inhibición simultanea de BCL-2 y BCL-X_L junto a la inhibición del proteasoma resulta antagónica al efecto causado por el inhibidor A-1155463 e ixazomib, pero es similar a la muerte ocasionada por ABT-737 e ixazomib. En las líneas OPM-2 y RPMI8226 la combinación de ABT-199, A-1155463 e ixazomib presenta aditividad, y es similar a la muerte inducida por ABT-737 e ixazomib. Las líneas U266 y MM.1S dependen de BCL-2 y BCL-X_L como proteínas anti-apoptóticas principales (**Figura 4.7**) o en segundo rango, siendo esta la razón por la que esta combinación es efectiva en ellas, ya que el resto de líneas expresan MCL-1 a niveles suficientes como para que secuestre a BIM libre y genere resistencia (Gomez-Bougie et al., 2004). La sensibilidad a ABT-737 viene definida por la cantidad de proteína BIM que es desplazada de BCL-X_L y BCL-2 al añadir el fármaco (Morales et al., 2011).

Tabla 4.4. Índices de la combinación de ABT-199, A-1155463 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo del índice indica una mayor sinergia.

	Ixazomib	ABT-199	A-1155463
H929	-	2,5 µM	50 nM
<i>Índice de Bliss</i>		0,78	
	15 nM	2,5 µM	50 nM
<i>Índice de Bliss</i>		-12,27	
MM.1S	-	2,5 µM	0,125 nM
<i>Índice de Bliss</i>		11,55	
	25 nM	2,5 µM	0,125 nM
<i>Índice de Bliss</i>		47,73	
OPM-2	-	5 µM	5 µM
<i>Índice de Bliss</i>		2,56	
	25 nM	5 µM	5 µM
<i>Índice de Bliss</i>		2,95	
RPMI8226	-	2,5 µM	50 nM
<i>Índice de Bliss</i>		1,38	
	25 nM	2,5 µM	50 nM
<i>Índice de Bliss</i>		1,06	
U266	-	5 µM	6,25 nM
<i>Índice de Bliss</i>		6,4	
	25 nM	5 µM	6,25 nM
<i>Índice de Bliss</i>		32,83	

La combinación de ABT-199 y S63845 ha sido testada previamente en leucemias linfoblásticas agudas de células T, las cuales no responden a ABT-199, observándose sinergia (Li et al., 2019). También se ha probado en células de mieloma múltiple resistentes a venetoclax, e incluso con la triple combinación con dexametasona, mostrando muy buenos resultados (Algarín et al., 2020). Además, la doble inhibición de BCL-2 y MCL-1 es beneficiosa en líneas de mieloma con la traslocación t(11;14) (Seiller et al., 2020). Estos datos se confirman en el estudio llevado a cabo en el desarrollo de esta tesis como se observa en la **Figura 4.26**. La combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib presenta sinergia especialmente en la línea U266 la cual posee la traslocación t(11;14). También en la línea NCI-H929, según el índice de Bliss (**Tabla 4.5**), se observa una ligera sinergia. U266 es la línea más resistente al inhibidor de proteasoma ixazomib, como hemos determinado en el **apartado 4.1.1** siendo necesaria una dosis superior a 50 nM para alcanzar el 50% de muerte celular. El siguiente paso podría ser ver si al aumentar la dosis de ixazomib se alcanzan niveles mayores de apoptosis con esta combinación de tres fármacos.

En la línea OPM-2 el efecto tóxico parece ser principalmente debido a la combinación de ABT-199 e ixazomib, y la adición de S63845 incrementa ligeramente, pero de manera significativa ($p < 0,0143$), la muerte celular producida por ambos compuestos. Este mismo efecto se ve en la línea U266. La línea MM.1S muestra ante la combinación de los dos miméticos BH3 e ixazomib un efecto aditivo, próximo a la sinergia (**Tabla 4.5**). En contraste se encuentra la línea RPMI8226 en la cual la inhibición simultánea de BCL-2 y MCL-1 junto a la inhibición del proteasoma apenas produce un efecto aditivo de la muerte celular respecto a la generada por la suma de cada fármaco individualmente según los índices de Bliss proporcionados (**Tabla 4.5**).

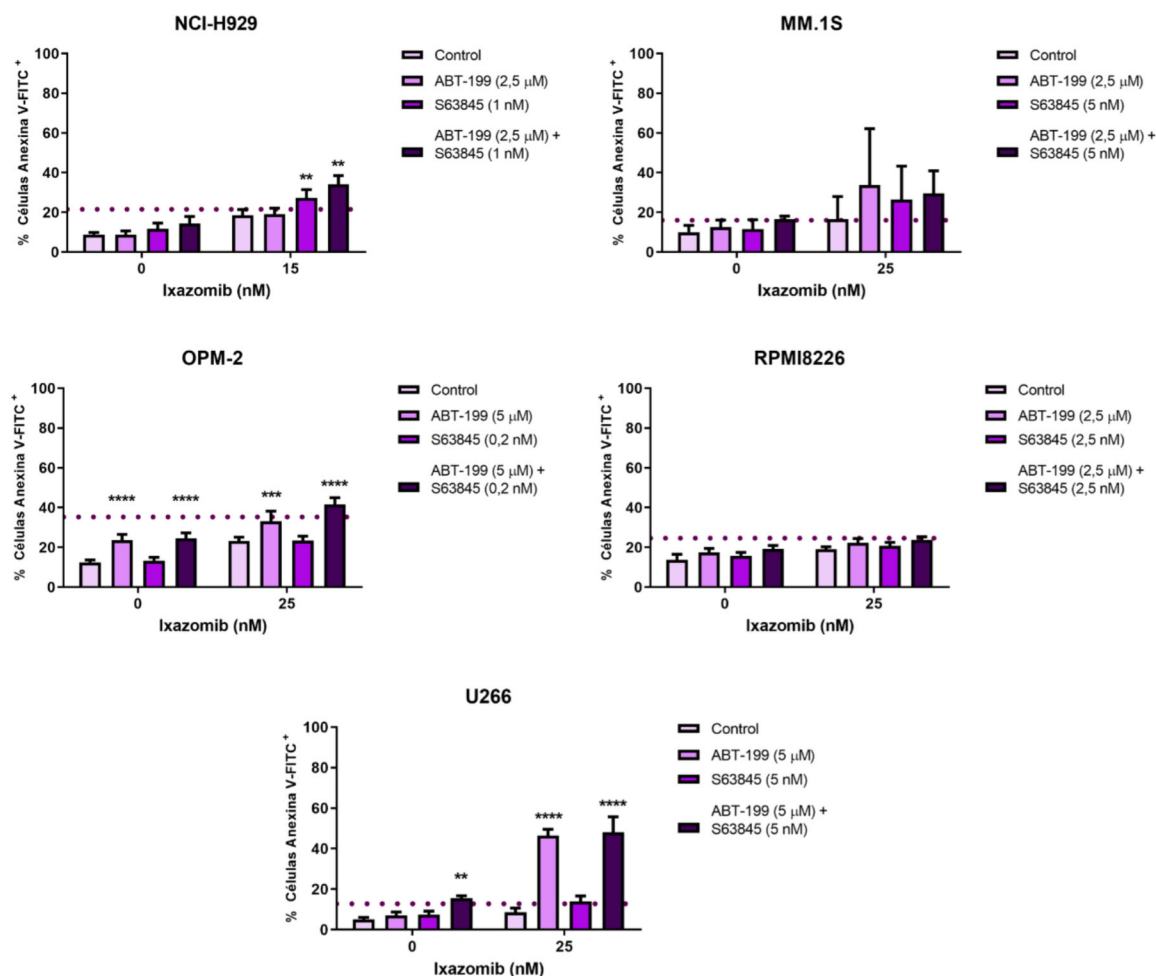


Figura 4.26. Determinación de la muerte celular inducida en líneas de MM por la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib. Para determinar la sinergia de los compuestos se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento, y tras el mismo se marcaron con Anexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La línea discontinua de puntos morada indica la suma de los porcentajes de muerte celular de cada tratamiento individual. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$ para OPM-2 Y RPMI8226, $n=8$ para MM.1S y U266, y $n=10$ para NCI-H929. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al control (sin mimético BH3) donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Tabla 4.5. Índices de la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo del índice indica una mayor sinergia.

	Ixazomib	ABT-199	S63845
H929	-	2,5 µM	1 nM
<i>Índice de Bliss</i>		2,93	
	15 nM	2,5 µM	1 nM
<i>Índice de Bliss</i>		13,74	
MM.1S	-	2,5 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		2,53	
	25 nM	2,5 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		9,88	
OPM-2	-	5 µM	0,2 nM
<i>Índice de Bliss</i>		0,32	
	25 nM	5 µM	0,2 nM
<i>Índice de Bliss</i>		7,21	
RPMI8226	-	2,5 µM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		4,35	
	25 nM	2,5 µM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		3,49	
U266	-	5 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		6,55	
	25 nM	5 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		27,66	

Estos resultados sugieren que la inhibición simultánea de BCL-2 y MCL-1 podría aumentar la efectividad del tratamiento con ixazomib en algunos mielomas. De este modo al inhibir MCL-1 (sobreexpresada en la mayoría de mielomas) se contrarrestarían las resistencias a ABT-199 como se observó en pacientes con leucemia de células del manto (Prukova et al., 2019). La mayor muerte celular se observó en las células U266, por lo que estudiamos en ella el efecto de los fármacos por separado y su combinación en los niveles de expresión de las proteínas de la familia BCL-2, como se muestra en la **Figura 4.27**.

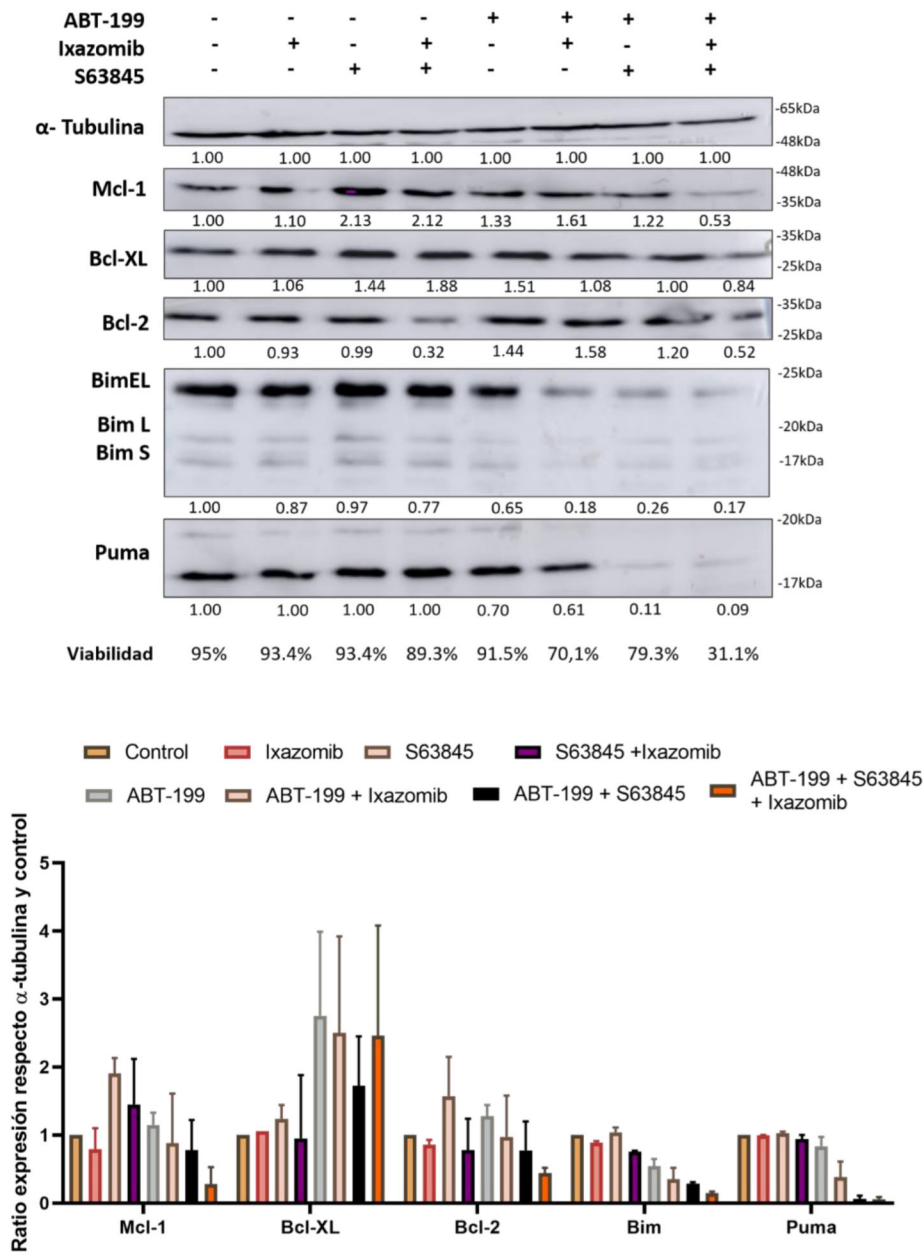


Figura 4.27. Efecto del tratamiento con ABT-199, S63845 e ixazomib en los niveles de proteínas de la familia BCL-2 en la línea U266. Las células fueron tratadas con 15 nM de ixazomib, 5 μ M ABT-199 y 5 nM S63845 durante 24 h. Tras los tratamientos, se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células de cada condición. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada condición y respecto las células sin tratamiento (control), mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante citometría de flujo con marcaje Anexina V-FITC. Imagen representativa de $n=2$. La estadística (\pm SEM) está realizada mediante análisis *two*-ANOVA y posterior test de Dunett respecto al estado basal del control resultando en no significativo.

Centrándonos en las proteínas anti-apoptóticas, los niveles de MCL-1 aumentan cuando se trata con S63845 sólo o combinado con ixazomib como se había observado en apartados anteriores. En cambio, en las combinaciones con ABT-199/ixazomib y ABT-199/S63845 no se observa dicho aumento, llegando incluso a disminuir en la triple

combinación, lo que podría explicar a lo mejor la mayor sensibilidad a ixazomib. La proteína BCL-X_L eleva sus niveles de expresión cuando se tratan las células con ABT-199 solo, al añadir ixazomib la expresión de BCL-X_L disminuye levemente respecto a los niveles de ABT-199 solo, pero vuelve a aumentar si se añade los 2 miméticos BH3 e ixazomib. Y, BCL-2 apenas sufre variaciones en su expresión ante los diferentes tratamientos.

Por otra parte, las proteínas pro-apoptóticas también disminuyen sus niveles de expresión sobre todo en presencia del mimético BH3 ABT-199, ya sea sólo, en combinación con S63845 o ixazomib, o combinando los dos miméticos BH3 y el inhibidor de proteasoma. BIM, disminuye ligeramente cuando se tratan con ixazomib aumentando este cambio de nivel de expresión cuando se combina con S63845, pero principalmente cuando a cualquiera de estas combinaciones se adiciona ABT-199. Y, por último, la expresión de la proteína PUMA desaparece cuando se trata con los dos miméticos BH3 o se combinan con ixazomib.

Estos resultados indican que la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib disminuye la expresión tanto de las proteínas anti-apoptóticas (sobre todo MCL-1) como pro-apoptóticas, aunque cabe destacar que no se pudo observar el estado de NOXA, una razón podría ser que hay tanta mortalidad en la triple combinación que se pierde proteína a la hora de realizar los extractos celulares. Esta proteína, NOXA, puede ser la encargada de desencadenar la apoptosis como se ha comentado en diferentes estudios en los que afirman que NOXA está sobreexpresada en las células de linfoma del manto cuando se tratan con venetoclax (ABT-199) o, con inhibidores de proteasoma como bortezomib (Prukova et al., 2019; Punnoose et al., 2016). El aumento en los niveles de NOXA junto a la inhibición de MCL-1 por parte de S63845 libera las proteínas BIM, PUMA y NOXA para activar la ruta mitocondrial a través de BAK y BAX. Además, a su vez se está inhibiendo a BCL-2 por parte de ABT-199 liberando a BIM (Kotschy et al., 2016; Morales et al., 2011), de esta manera se puede activar la apoptosis mediante los modelos indirecto o mixto descritos en el **apartado 1.2.2**. En respuesta a los miméticos BH3, las células U266 aumentan la expresión de BCL-X_L que puede unirse a BIM para contrarrestar la muerte celular producida, pero resulta insuficiente; por otro lado, la inhibición del proteasoma puede favorecer la apoptosis a través de la ruta p53-NOXA (Muz et al., 2016), pero en esta línea p53 se encuentra mutado, por lo que se descarta esta posibilidad. Otra posibilidad a que se desencadene la apoptosis en la combinación de los

dos miméticos sería que las proteínas BAK y BAX estén activándose de manera independiente a las proteínas BH3-*only*.

Los resultados anteriores indican que las combinaciones probadas no son eficaces en todas las líneas. Algunos autores han propuesto que la resistencia a ABT-199 se debe a la activación de AKT y el incremento de los niveles de BCL-X_L y MCL-1, que secuestran a BIM evitando así el desarrollo de apoptosis. En otros cánceres, como es el carcinoma de células escamosas de pulmón, se ha demostrado que la inhibición simultánea de BCL-X_L y MCL-1 favorece y aumenta la sensibilidad a otros tratamientos (Weeden et al., 2018). En vista de los antecedentes expuestos junto a los resultados anteriores se analizó la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib en líneas de mieloma.

Como se muestra en la **Figura 4.28**, la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib presenta sinergia en todas las líneas. La línea NCI-H929 no muestra apenas incremento de la apoptosis cuando se combina cada mimético con ixazomib. En cambio, la combinación de los tres fármacos potencia el efecto tóxico de ixazomib llegando a mostrar una elevada sinergia. Esta línea es muy resistente al inhibidor de BCL-2 y muy dependiente de MCL-1 (Gong et al., 2016), por lo que destaca que haya tanta sinergia al inhibir BCL-X_L y MCL-1. OPM-2 tiene un comportamiento similar a NCI-H929, aunque se requiere una concentración mucho más elevada del inhibidor de BCL-X_L. Las líneas MM.1S y RPMI8226 presentan sinergia (según el índice de Bliss **Tabla 4.6**) al combinar los dos miméticos con ixazomib, ambas líneas presentan la misma traslocación t(14;16).

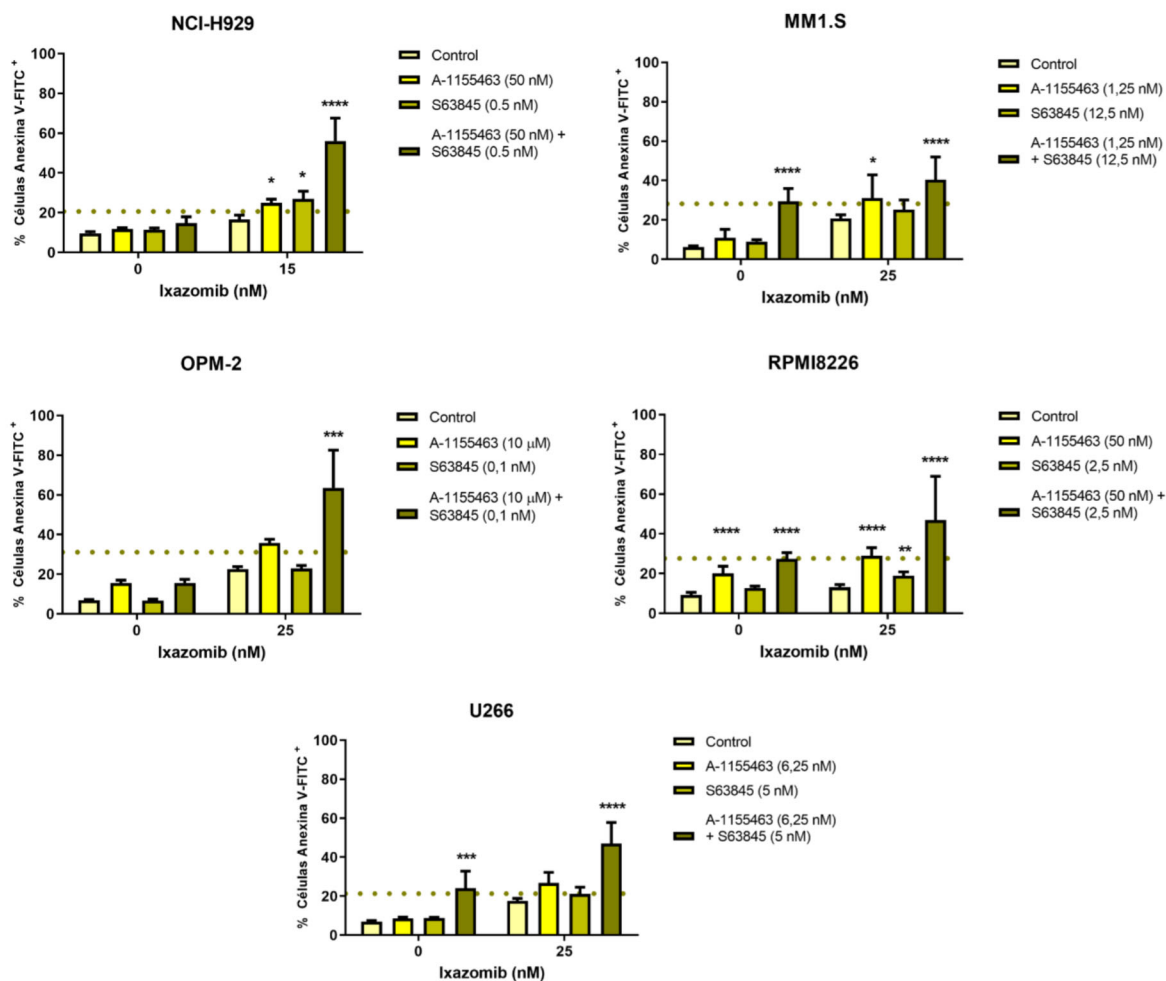


Figura 4.28. Determinación de la muerte celular inducida en líneas de MM por la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib. Para determinar la sinergia de los compuestos se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento, y tras el mismo se marcaron con Anexina V-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La línea discontinua de puntos verde indica la suma de los porcentajes de muerte celular de cada tratamiento individual. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=2$ para OPM-2, $n=4$ para NCI-H929 y U266, $n=6$ para RPMI8226, y $n=12$ para MM1.S. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada concentración del mimético BH3 respecto al control (sin mimético BH3) donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Por último, la línea U266 a pesar de expresar altos niveles basales de BCL-2, presenta sinergia con ixazomib cuando se inhibe de manera dual a BCL-X_L y MCL-1. Esta línea es la menos sensible a ixazomib (**Figura 4.1**) además de ser resistente a la inhibición individual de las proteínas anti-apoptóticas (Gong et al., 2016). Sin embargo, esta combinación, A-1155463/S63845 parece sensibilizar dicha línea celular a la acción de ixazomib siendo útil en líneas resistentes a los miméticos BH3.

Tabla 4.6. Índices de la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib. Se refleja para cada concentración el índice de combinación calculado a través del índice de Bliss. Según este método un mayor valor positivo del índice indica una mayor sinergia.

	Ixazomib	A-1155463	S63845
H929	-	50 nM	0,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		1,41	
	15 nM	50 nM	0,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		41,22	
MM.1S	-	1,25 nM	12,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		17,02	
	25 nM	1,25 nM	12,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		13,10	
OPM-2	-	10 µM	0,1 nM
<i>Índice de Bliss</i>		0,24	
	25 nM	10 µM	0,1 nM
<i>Índice de Bliss</i>		34,81	
RPMI8226	-	50 nM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		4,94	
	25 nM	50 nM	2,5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		15,23	
U266	-	6,25 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		14,62	
	25 nM	6,25 µM	5 nM
<i>Índice de Bliss</i>		27,47	

La combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib tiene buenos resultados en células de mieloma *in vitro* y podría ser un posible tratamiento ante resistencias a venetoclax u otros inhibidores de proteasoma como bortezomib y carfilzomib.

Al igual que en la combinación ABT-199, S63845 e ixazomib se analizó el estado de expresión de las proteínas de la familia BCL-2. Para ello se escogió la línea NCI-H929, puesto que era una de las que se había mostrado una mayor sinergia. Los resultados se recogen en la **Figura 4.29**.

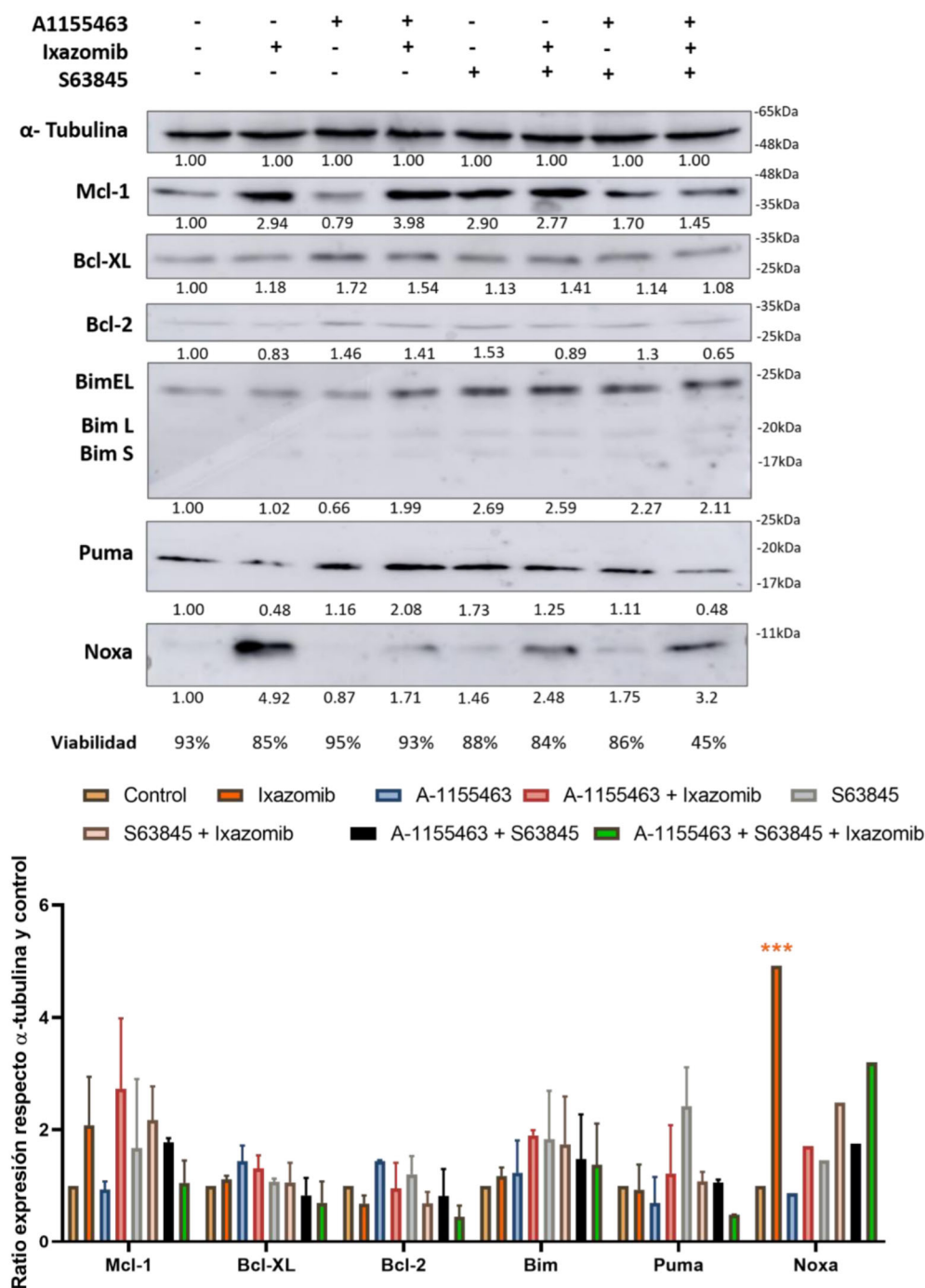


Figura 4.29. Efecto del tratamiento con A-1155463, S63845 e ixazomib en los niveles de proteínas de la familia BCL-2 en la línea NCI-H929. Las células fueron tratadas con 15 nM de ixazomib, 50 nM A-1155463 y 0.5 nM S63845 durante 24 h. Tras los tratamientos, se recogió y se extrajo proteína a 3×10^6 células de cada condición. La cuantificación de las proteínas está realizada en referencia a la α -tubulina de cada condición y respecto las células sin tratamiento (control), mediante el programa ImageJ-NIH. La viabilidad celular se estimó mediante citometría de flujo con marcaje Anexina V-FITC. Imagen representativa de $n=2$. La estadística (media de $n=2 \pm$ SEM) está realizada mediante análisis *two*-ANOVA y posterior test de Dunnett respecto al estado basal del control resultando en no significativo.

Centrándonos en las proteínas anti-apoptóticas, se observa que tanto ixazomib como S63845, individualmente o en combinación, inducen un aumento de los niveles de MCL-1. El mayor nivel de expresión se da cuando se tratan las células con A-1155463 e ixazomib, mientras que la expresión de MCL-1 no se vio alterada cuando se trataron solo con A-1155463 o con la combinación A-1155463/S63845/ixazomib. La proteína BCL-X_L mantiene sus niveles cercanos a los basales en todos los tratamientos. Y los niveles de BCL-2 aumentan ligeramente de manera no significativa en presencia de A-1155463 solo o en combinación con ixazomib, de S63845 y de la combinación de ambos miméticos, mientras que disminuye sus niveles con ixazomib solo, S63845 e ixazomib, pero sobre todo con la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib. Por otra parte, las proteínas pro-apoptóticas aumentan sus niveles de expresión en general. BIM, aumenta principalmente cuando se tratan las células con S63845 sólo o en combinación con ixazomib. La expresión de la proteína PUMA aumenta principalmente cuando se tratan las células con S63845. No se puede descartar que PUMA aumente de manera transitoria en la triple combinación contribuyendo a la activación de la vía intrínseca, aunque se vea que disminuye su expresión a las 24 h. PUMA habitualmente desaparece cuando la viabilidad comienza a disminuir, y como observamos en la combinación A-1155463/S63845 e ixazomib la viabilidad es relativamente baja. Y, por último, los niveles de NOXA aumentan principalmente en todos los tratamientos que contienen ixazomib. En el resto de tratamientos aumenta en menor medida salvo en presencia de A-1155463 solo que decae la expresión ligeramente.

Estos resultados indican que la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib en las células NCI-H929 aumenta la expresión de las proteínas BIM y NOXA principalmente, y disminuye la expresión de MCL-1, BCL-2 y PUMA, mientras mantiene los niveles basales de BCL-X_L. La disminución de MCL-1 junto al aumento de BIM y NOXA puede ser la explicación a la sinergia observada ante esta combinación, en contraste con las combinaciones de cada mimético con ixazomib.

4.3.4. Combinación de miméticos BH3 con el fármaco ixazomib en líneas de mieloma múltiple deficientes en BIM.

Algunos datos recientes indican que la proteína pro-apoptótica BIM podría ser fundamental en la respuesta a los tratamientos con miméticos BH3 (Algarín et al., 2021; Morales et al., 2011). Además, como se ha visto en la **Figura 4.29**, el tratamiento simultáneo con ixazomib y los inhibidores de MCL-1 y BCL-X_L induce un aumento de

los niveles de esta proteína en las células NCI-H929, lo que sugiere su posible implicación en la muerte inducida por dicha combinación. Por lo tanto, se decidió estudiar si el silenciamiento de BIM protege ante el tratamiento con miméticos BH3 o inhibidores de proteasoma como ixazomib. Concretamente se han estudiado las combinaciones que mostraron sinergia en cada línea *wild type*.

La primera combinación que se investigó en líneas deficientes en BIM fue la de ABT-199, A-1155463 e ixazomib (**Figura 4.31**). A pesar de que la línea U266 también mostró sensibilidad a esta combinación, sólo se analizó en la línea MM.1S BimKO, puesto que la línea celular en la que se observó una mayor sinergia fue MM.1S, y la línea OPM-2 (**Figura 4.2**).

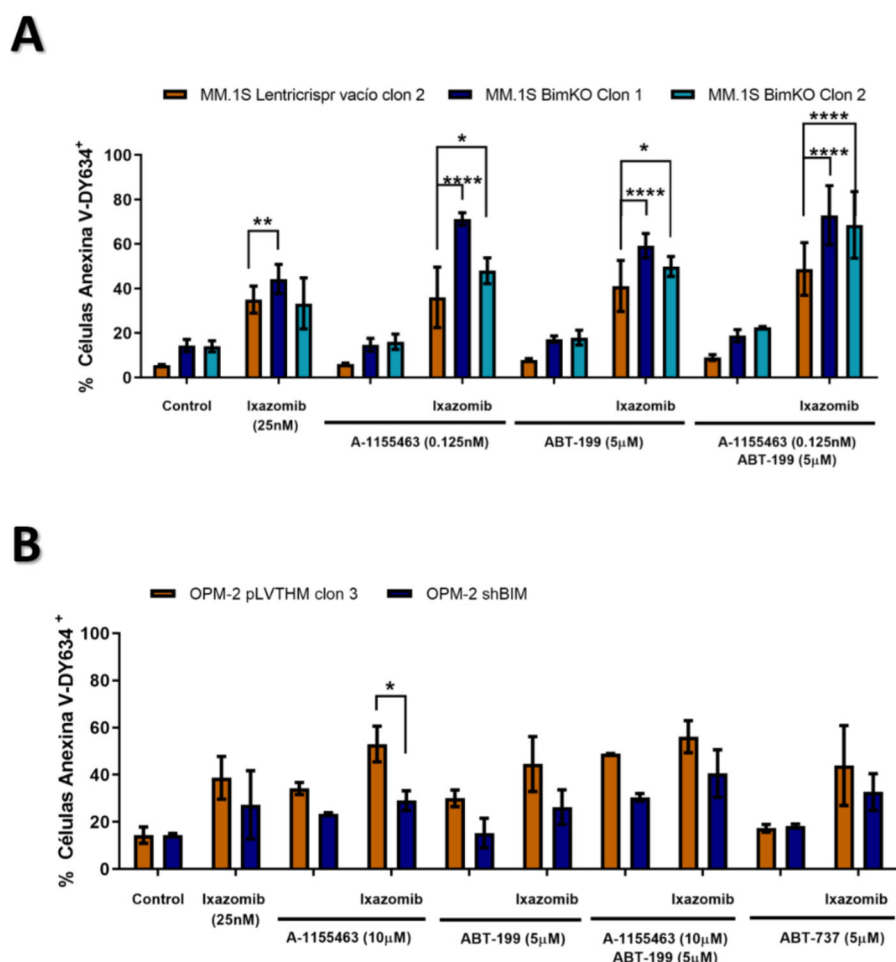


Figura 4.31. Muerte celular por apoptosis inducida por la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib en líneas deficientes en BIM. Se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición y tras los tratamientos se marcaron con Anexina V-DY634 para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a la línea control de infección en cada caso siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. (A) Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea MM.1S Lentricrispr vacío (control de la infección lentiviral) y MM.1S BimKO. Los resultados mostrados

son la media \pm SD de $n=2$. **(B)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea OPM-2 pLVTHM y OPM-2 shBIM. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=2$.

Lo primero que se observa en la **Figura 4.31A** es que los dos clones deficientes en BIM presentan una mayor sensibilidad a ixazomib y sus combinaciones con ABT-199 y A-1155463 que la línea control (MM.1S Lenticrispr vacío clon 2). Sí se observa diferencia en el nivel de sensibilidad a estos fármacos entre clones MM.1S BimKO. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que en esta línea BIM no juega un papel importante en el desencadenamiento de la apoptosis ante inhibidores de proteasoma como ixazomib o el uso de miméticos BH3.

En cuanto a la línea OPM-2 (**Figura 4.31B**) la ausencia de BIM protege ante el efecto de la combinación de los miméticos BH3 dirigidos a BCL-2 y BCL-X_L solos o en combinación con ixazomib, pero sobre todo protege ante el tratamiento con A-1155463 e ixazomib de manera significativa. Esta protección sugiere que, en esta línea y a diferencia de lo observado en MM.1S, BIM participa en el desencadenamiento de la apoptosis ante A-1155463 e ixazomib, además de mostrar la interacción prioritaria de BCL-X_L y BIM en esta línea.

A continuación, se recoge en la **Figura 4.32** los resultados en las líneas RPMI8226 y U266 con BIM *Knock out* tratadas con la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib, puesto que la línea U266 fue la que mayor sinergia mostró ante este tratamiento y la línea RPMI8226 mostró aditividad.

La ausencia de BIM protege principalmente del efecto ocasionado por ixazomib indiferentemente de si está combinado o no con algún mimético en la línea RPMI8226 BimKO (**Figura 4.32A**) como ya se había observado anteriormente (**Figura 4.13**). También se observa que existe una ligera protección no significativa cuando se tratan con los miméticos ABT-199 y S63845 individualmente o en combinación, lo que corrobora lo observado en el estudio de Algarín *et al.* 2020, donde la ausencia de BIM disminuía la sensibilidad al tratamiento con ambos miméticos BH3. Este resultado parece indicar que BIM participa en la inducción de apoptosis a través del mecanismo generado por la inhibición del proteasoma.

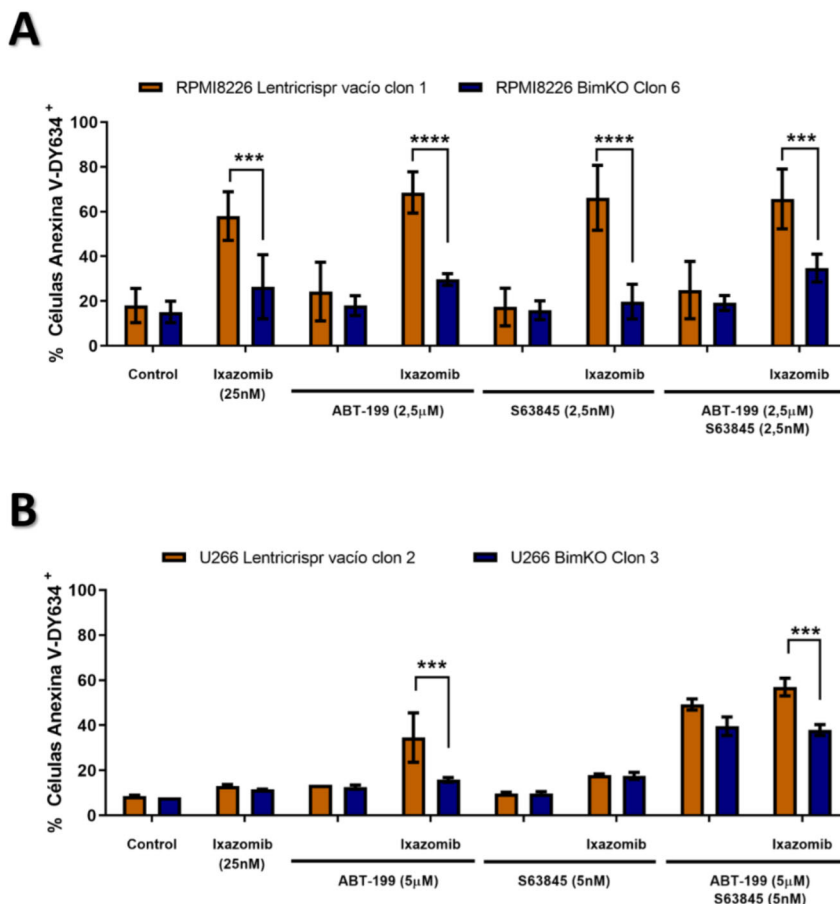


Figura 4.32. Muerte celular por apoptosis inducida por la combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib en líneas deficientes en BIM. Se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición y tras los tratamientos se marcaron con Annexina V-DY634 para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a la línea control de infección en cada caso siendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ y $****p < 0,0001$. **(A)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea RPMI8226 Lentricrispr vacío (control de la infección lentiviral) y RPMI8226 BimKO. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=5$. **(B)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea U266 Lentricrispr vacío (control de la infección lentiviral) y U266 BimKO. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$.

En cambio, en la línea U266 (**Figura 4.32B**) la deficiencia en BIM disminuye los niveles de apoptosis de manera muy significativa en comparación con el control de infección en la combinación de ABT-199 con ixazomib y en la combinación de los 2 miméticos BH3 disminuye la sensibilidad, pero sobre todo cuando se adiciona a estos ixazomib se alcanza una protección significativa.

En conclusión, en la línea RPMI8226 la ausencia de BIM protege ante el tratamiento con ixazomib, solo o combinado con ABT-199 y S63845, mientras que en la

línea U266 la protección se observa ante el tratamiento con ABT-199 con ixazomib o con S63845.

La combinación A-1155463, S63845 e ixazomib ha dado buenos resultados como hemos visto en el apartado **apartado 4.3.3** en todas las líneas de mieloma múltiple estudiadas, especialmente en las líneas NCI-H929, OPM-2 y U266. Además, el tratamiento con esta combinación eleva los niveles de expresión de la proteína BIM en las células U266 (**Figura 4.27**). Al igual que con las dos combinaciones anteriores se analizó la implicación de BIM en el proceso apoptótico ante la combinación de estos miméticos en líneas deficientes en dicha proteína. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 4.33**.

En el caso de NCI-H929 (**Figura 4.33A**), la deficiencia de la proteína BIM protege de manera significativa contra el tratamiento con A-1155463, S63845 e ixazomib, aunque esta protección varía entre los diferentes clones NCI-H929 BimKO siendo mayor la protección en la línea NCI-H929 BimKO clon 4 ya que presenta niveles inferiores de BCL-X_L como se ha observado en la **Figura 4.33A**. Además, también se observa una ligera protección ante el inhibidor de MCL-1 la cual aumenta de manera significativa si se adiciona el IP. Estos hechos parecen indicar que BIM está implicada en la muerte inducida por S63845 principalmente, ya que como se ha comentado con anterioridad esta suele interaccionar con MCL-1.

La ausencia de BIM en la línea MM.1S protege de la apoptosis cuando se tratan las células sólo con los dos miméticos o con el inhibidor de MCL-1 solo o en combinación con ixazomib (**Figura 4.33B**). Por tanto, BIM juega un papel importante en el desarrollo de la apoptosis en esta línea ante cualquier tratamiento que incluya S63845, pero no para A-1155463. Esto podría indicar que la combinación de ambos miméticos BH3 podría aumentar la eficiencia de ixazomib en células que presenten la proteína BIM no funcional.

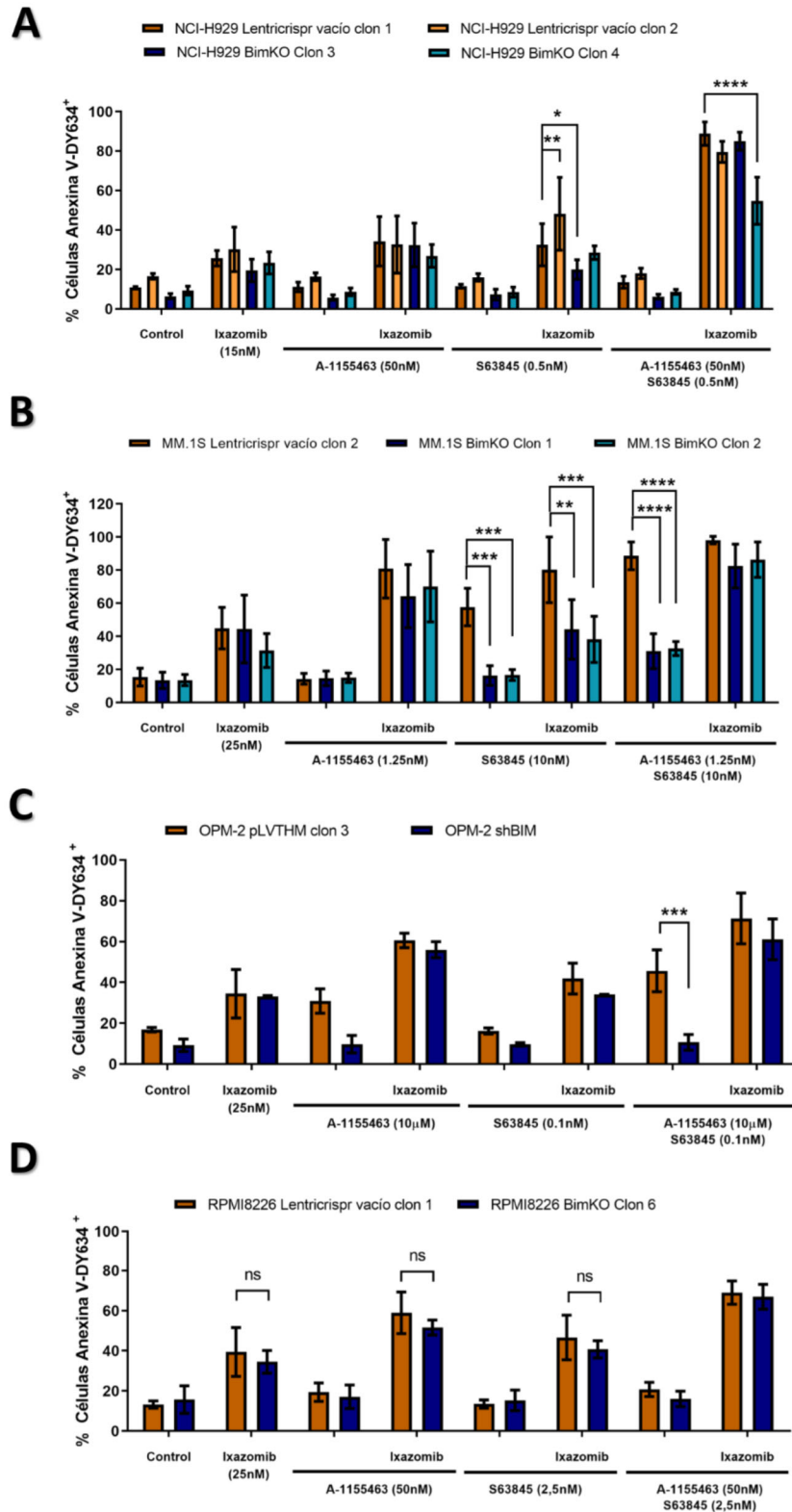


Figura 4.33. Muerte celular por apoptosis inducida por la combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib en líneas deficientes en BIM. Se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición y tras los tratamientos se marcaron con Anexina V-DY634 para un posterior análisis mediante citometría de flujo. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a la línea control de infección siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. (A) Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea NCI-H929 Lenticrispr vacío clon 1 (control de la infección lentiviral), NCI-H929 Lenticrispr vacío clon 2 (control de

la infección lentiviral), NCI-H929 BimKO clon 3 y NCI-H929 BimKO clon 4. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$. **(B)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea MM.1S Lentricrispr vacío clon 2 (control de la infección lentiviral), MM.1S BimKO clon 1 y MM.1S BimKO clon 2. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$. **(C)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea 2, OPM-2 pLVTHM (control de la infección lentiviral) y OPM-2 shBIM. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=2$. **(D)** Muerte inducida por la combinación de los tres fármacos en la línea RPMI8226 Lentricrispr vacío clon 1 (control de la infección lentiviral) y RPMI8226 BimKO clon 6. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$.

Si nos centramos en la línea OPM-2 (**Figura 4.33C**) se corrobora que la protección por la ausencia de BIM se da cuando se inhibe a BCL-X_L, por lo que presenta una disminución de la muerte celular cuando se trata esta línea deficiente en BIM con A-1155463 y S63845 principalmente, aunque también se observa una disminución a la sensibilidad si se trata sólo con A-1155463. Al añadir ixazomib las diferencias entre las vector vacior y las shBIM desaparecen.

Y, por último, la ausencia de BIM en las células RPMI8226 ejerce una ligera protección ante la acción de ixazomib en combinación con A-1155463 o S63845 (**Figura 4.33D**) pero no llega a ser significativa.

Como se ha comentado antes, se ha descrito que BIM está implicada en la muerte inducida por bortezomib, siendo fosforilada en respuesta al IP, lo que permite su interacción con las proteínas anti-apoptóticas y la liberación de BAK y BAX (Fennell et al., 2008). Además, el empleo de inhibidores de proteínas anti-apoptóticas como ABT-737 favorece la regulación al alza de NOXA y en consecuencia el desencadenamiento de la apoptosis (Miller et al., 2009).

Por tanto, la ausencia de BIM favorece la resistencia a los fármacos A-1155463, S63845 e ixazomib en función del tipo celular que se trata, probablemente debido a la expresión de proteínas de la familia BCL-2 o a las traslocaciones que presentan cada una de ellas. Se debería profundizar en los factores que determinan la implicación de BIM y otras proteínas de la familia BCL-2 con el fin de encontrar las combinaciones más eficaces para cada caso.

4.3.5. Expresión de ecto-calreticulina en combinación de miméticos BH3 con el fármaco ixazomib en líneas de mieloma múltiple.

La muerte inmunogénica (ICD: *Immunogenic Cell Death*) hace referencia a la muerte celular que induce la activación del sistema inmune. En la actualidad existen varios fármacos antitumorales, virus oncolíticos, terapias fisicoquímicas, fotodinámicas

o la radioterapia capaces de inducir este tipo de muerte en pacientes inmunocompetentes (Ahmed & Tait, 2020). La ICD provoca la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que activan la respuesta inmunitaria contra el tumor. Estos DAMPs son: la exposición de calreticulina (CRT) y proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) en la superficie celular, liberación extracelular de ATP, HMGB1, INF-1 y citoquinas como la IL-1 (Ahmed & Tait, 2020; Hahn et al., 2013). Uno de los métodos más habituales para analizar la muerte inmunogénica es estudiar la exposición de calreticulina en la superficie con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo.

La calreticulina (CRT) es una chaperona asociada al RE que desempeña múltiples funciones en él. Las células tumorales a punto de perecer pueden provocar una respuesta inmune al exponer el complejo CRT/ERP57 en la superficie celular antes de que manifiesten signos de apoptosis facilitando así la fagocitosis (Martins et al., 2010; Obeid, Tesniere, et al., 2007; Panaretakis et al., 2009). Múltiples ensayos demuestran la capacidad de ciertos agentes anticancerígenos de exponer la calreticulina al exterior (Obeid, Tufi, et al., 2007; Wemeau et al., 2010). Se ha descrito con anterioridad que tanto bortezomib como carfilzomib producen muerte inmunogénica al exponer calreticulina en el exterior de la célula (Chang et al., 2012; Jarauta et al., 2016).

Sin embargo, no existen datos que demuestren si ixazomib promueve también la exposición de calreticulina. En este trabajo hemos analizado la exposición de calreticulina en las células NCI-H929 tratadas con ixazomib, solo o en combinación con los miméticos BH3. Tras 24 h de tratamiento se analizó la expresión de ecto-calreticulina mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos en la población 7-AAD negativa para centrarnos en aquellas que posean la membrana celular intacta. Los resultados se recogen en la **Figura 4.34**.

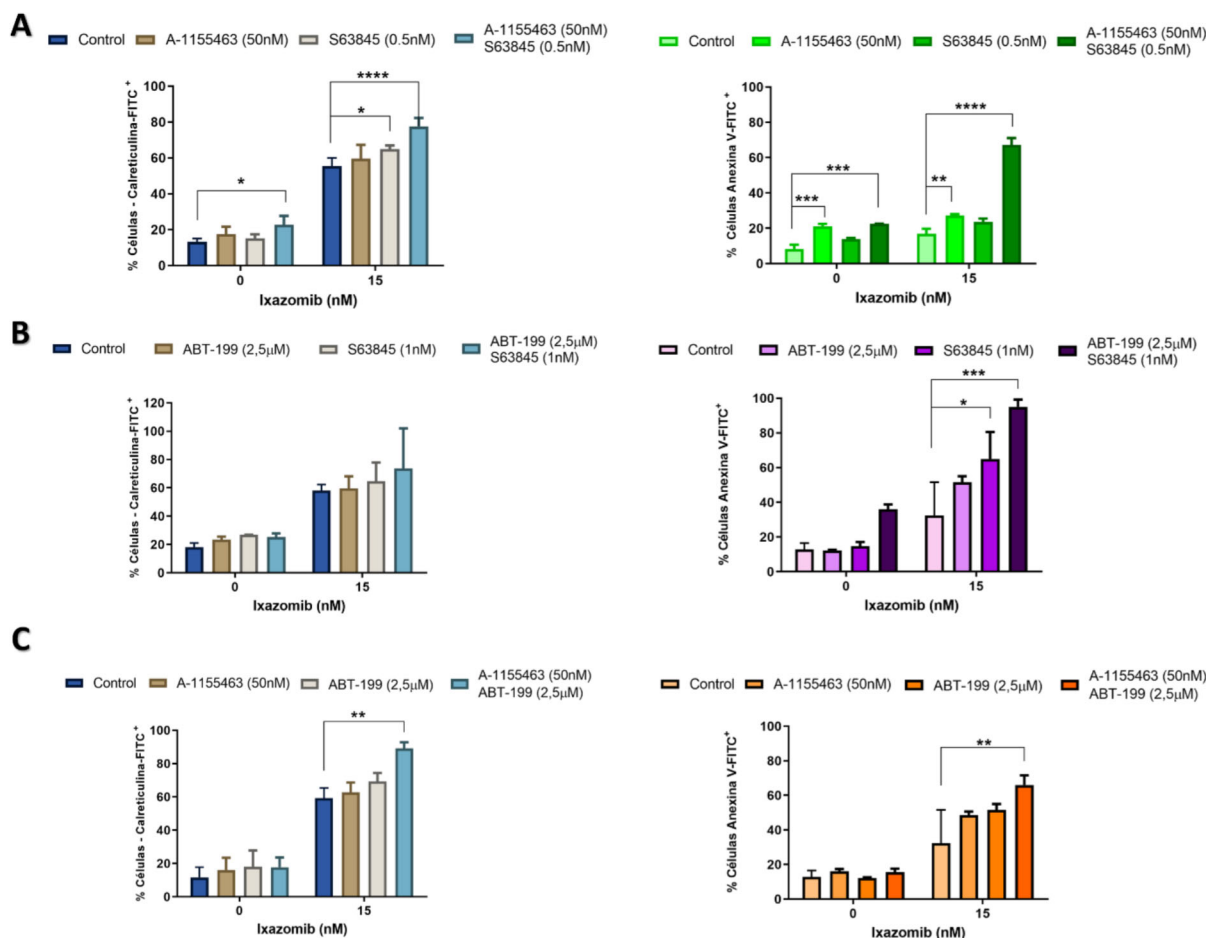


Figura 4.34. Inmunogenicidad de la combinación de miméticos BH3 e ixazomib en la línea NCI-H929.

En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por condición de tratamiento, y pasadas 24 h se marcaron con Anexina V-FITC o 7-AAD y anti-calreticulina-FITC para un posterior análisis mediante citometría de flujo. El porcentaje de células positivas para ecto-calreticulina se determinó en la fracción celular 7-AAD negativa. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea siendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. (A) Exposición de calreticulina en la línea NCI-H929 con la combinación 50 nM A-1155463, 0.5 nM S63845 y 15 nM ixazomib, además de su relación con muerte por apoptosis. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$. (B) Exposición de calreticulina en la línea NCI-H929 con la combinación 2,5 μ M ABT-199, 1 nM S63845 y 15 nM ixazomib, además de su relación con muerte por apoptosis. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=2$. (C) Exposición de calreticulina en la línea NCI-H929 con la combinación 2,5 μ M ABT-199, 50 nM A-1155463 y 15 nM ixazomib, además de su relación con muerte por apoptosis. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=2$.

El tratamiento con ixazomib induce exposición de ecto-calreticulina en un porcentaje elevado de células, incluso cuando el porcentaje de células apoptóticas no es muy alto. Las combinaciones con miméticos BH3 muestran sinergia con ixazomib como se había visto en el **apartado 4.3.3**, pero solo aumenta ligeramente en algunos casos la exposición de calreticulina, concretamente en los tratamientos que incluyen al inhibidor de BCL-X_L. Si nos fijamos en la **Figura 4.34A**, la combinación de A-1155463 e ixazomib induce la exposición de calreticulina en la superficie en la línea NCI-H929 respecto al

tratamiento individual con ixazomib. Además, si a esta combinación añadimos el mimético S63845 aún aumenta más la inmunogenicidad, pero con una alta muerte celular respecto al tratamiento solo con ixazomib.

Las combinaciones A-1155463, ABT-199 e ixazomib (**Figura 4.34C**) y ABT-199, S63845 e ixazomib (**Figura 4.34B**) también aumentan levemente la exposición respecto al tratamiento con ixazomib sólo siendo solo significativa en la combinación con los inhibidores de BCL-2 y BCL-X_L.

Anteriormente se ha descrito que el RE es especialmente importante en las células secretoras como las células B plasmáticas o las células de Paneth (Nikesitch et al., 2018). En el mieloma múltiple el RE está sometido a un gran estrés debido, en parte, a la constante producción de paraproteína, por lo que las células activan entre otros mecanismos la respuesta UPR. Otra vía adicional que se activa para reducir el estrés del RE es la UPS. Si adicionamos un inhibidor de proteasoma estamos bloqueando una de las vías de regulación de la homeostasis para el estrés del RE por lo que se genera mayor estrés. En condiciones de un elevado estrés en el RE se sobre-regula y expone la CRT lo cual puede conllevar a una activación de la respuesta inmune innata o puede ayudar a eliminar las células apoptóticas. La CRT es capaz de interactuar con los receptores de la superficie de las células DC favoreciendo la fagocitosis de las células apoptóticas (Montico et al., 2018). En base a los resultados mostrados en la **Figura 4.34** podemos asegurar que la adición de miméticos BH3 a pesar de haberse descrito que pueden promover un estrés en el RE, como ABT-737 (Antignani et al., 2014), no conllevan una elevación en el nivel de exposición de CRT a no ser que se adicione un inhibidor de proteasoma como es ixazomib.

Por tanto, la exposición de calreticulina observada en las células tratadas con combinaciones de ixazomib y miméticos BH3 parece deberse principalmente a la acción del IP y el estrés del RE que genera.

4.3.6. Inducción de inmunogenicidad por la combinación de cloroquina e ixazomib en células BAX/BAK KO.

Durante los subapartados anteriores hemos estudiado si la muerte apoptótica inducida por ixazomib se ve potenciada mediante la adición de un inhibidor de autofagia como es cloroquina. Además, se ha demostrado que ixazomib y carfilzomib inducen ICD mediante la exposición de calreticulina en la membrana externa celular. Se analizó si la

combinación de ixazomib o carfilzomib junto a cloroquina promueve la exposición de calreticulina en células deficientes en BAX/BAK. Los resultados se muestran a continuación en la **Figura 4.35**.

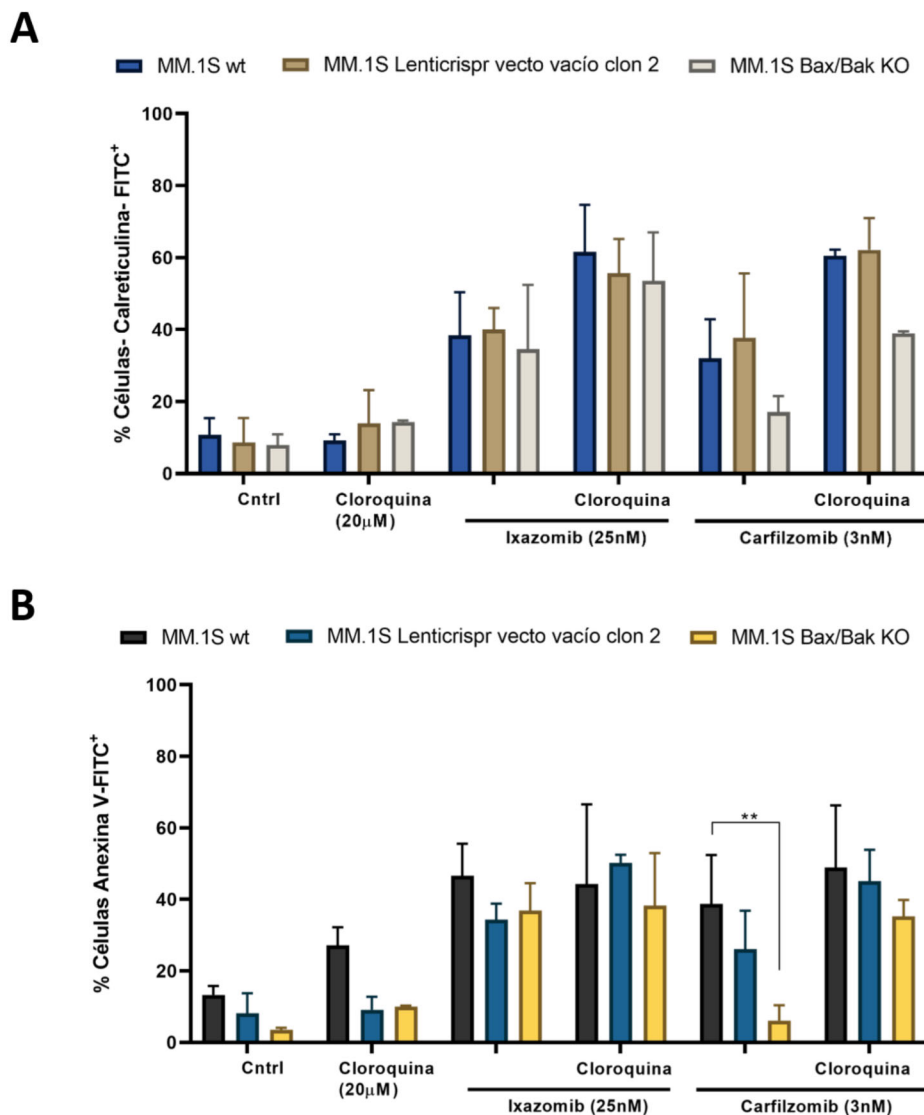


Figura 4.35. Expresión de ecto-calreticulina (A) y muerte celular (B) en células MM.1S deficientes en BAK y BAX tratadas con cloroquina, carfilzomib e ixazomib. En este ensayo se sembraron de cada línea 3×10^5 células por punto experimental, y tras el tratamiento durante 24 h se marcaron para un posterior análisis mediante citometría de flujo con Anexina V-FITC o 7-AAD y anti-calreticulina-FITC. Los resultados mostrados son la media \pm SD de $n=4$. La significancia fue calculada mediante el análisis estadístico *two-ANOVA* y su posterior análisis de Dunnett de cada línea respecto a la línea MM.1S *wild type* (wt) resultando en datos estadístico no significativos, salvo en la gráfica de muerte celular (B) donde $**p < 0,01$.

La cloroquina no induce la exposición de calreticulina por lo que no activa la ICD por sí sola en ninguna de las líneas estudiadas. En la línea MM.1S Bax/Bak KO la exposición de calreticulina se ve disminuida en contraste con la línea MM.1S cuando se

trata con carfilzomib sólo. Esta disminución de CRT se mantiene incluso cuando se combina carfilzomib con cloroquina en esta línea, aunque los niveles de ecto-CRT aumentan respecto a los alcanzados sólo con el IP. Por otro lado, el tratamiento con ixazomib individual no implica cambios a nivel de exposición de CRT entre las líneas, ni cuando se combina con CLQ.

La cinética de la ecto-CRT depende del tipo de estímulo de muerte celular (Krysko et al., 2012). Se ha demostrado que dicha traslocación inducida por quimioterapia depende de la fosforilación de eIF2 α mediada por PERK, la vía secretora y la activación de la proteína asociada al receptor de células B (BCAP31) mediada por caspasa-8 y las proteínas BAX y BAK (Panaretakis et al., 2009). Se ha visto que células deficientes en BAK y BAX inducen una baja exposición de CRT (Krysko et al., 2012), lo que no corresponde con lo observado en esta tesis donde ixazomib induce una exposición similar de CRT en las líneas estudiadas, aunque sí se observó una disminución de dicho proceso en las células DKO tratadas con la combinación de CLQ e ixazomib. Por tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de BAX y BAK interfiere en la traslocación de CRT dependiendo del estímulo apoptótico.

4.4 EFECTO EN MUESTRAS EX VIVO DE LA COMBINACIÓN DE MIMÉTICOS BH3 E IXAZOMIB.

A pesar de los avances en el tratamiento del mieloma, esta enfermedad sigue siendo incurable debido en parte a la plasticidad génica de la enfermedad y por otro lado a la generación de resistencias a los tratamientos como inhibidores de proteasoma. En la actualidad, el tratamiento del mieloma múltiple se basa en el uso de combinaciones de diferentes fármacos, como por ejemplo el empleo de dexametasona e inhibidores del proteasoma. Existen diferentes ensayos en los que se ha demostrado que la administración conjunta de bortezomib o carfilzomib con panobinostat mejora la respuesta en pacientes con recaídas en mieloma múltiple previamente tratados (Berdeja et al., 2021; Richardson et al., 2016; San-Miguel et al., 2014).

Actualmente ixazomib se suministra en combinación con diferentes fármacos como tratamiento para pacientes de mieloma (Muz et al., 2016). Entre dichas combinaciones están el empleo de ixazomib junto a panobinostat y dexametasona, este ensayo clínico finalizó en 2019 con bajos efectos adversos, o la combinación de ixazomib

junto a dexametasona y ciclofosfamida para pacientes con mieloma refractario a lenalidomida (Hinsley et al., 2020; Reu et al., 2015). También, anteriormente se ha publicado un estudio en el que ixazomib se emplea como tratamiento único o en combinación con lenalidomida en pacientes de MM de nuevo diagnóstico no trasplantados (M. A. Dimopoulos et al., 2019) e incluso combinado con talidomida y dexametasona en pacientes con recaída (Muz et al., 2016). El tratamiento más empleado es ixazomib junto a dexametasona pero se están generando resistencias por lo que es conveniente buscar nuevos tratamientos (Muz et al., 2016). Una posible vía alternativa es el empleo de inhibidores de proteasoma combinados con miméticos BH3. En la actualidad se han suspendido dos ensayos clínicos basados en el empleo de venetoclax combinado con bortezomib y dexametasona para pacientes con recaída en mieloma, o combinado con ixazomib y dexametasona para pacientes con mieloma de células plasmáticas recurrente, refractario y que no presenten la traslocación t(11;14), a diferencia de los ensayos clínicos que se basan en la combinación de carfilzomib con venetoclax y dexametasona o la combinación de venetoclax junto a daratumumab, dexametasona y bortezomib, ambos, para pacientes con recaída en mieloma múltiple (Bahlis et al., 2021; L. J. Costa et al., 2021; Ghobrial, 2020; Kumar et al., 2020). Con esa idea y los resultados obtenidos en esta tesis se ha propuesto probar la combinación de ixazomib con miméticos BH3 en un total de 37 muestras *ex vivo* de médula ósea de pacientes con MM cedidas por el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y el Hospital Universitario Miguel Servet, ambos de la ciudad de Zaragoza.

Primero se analizó la sensibilidad al tratamiento con ixazomib cuantificando la exposición de PS mediante marcaje con Anexina V tras 16 h de tratamiento con el IP (**Figura 4.36A**). Las células de pacientes son más resistentes que las líneas establecidas necesitando el doble de dosis (100 nM) para alcanzar al menos un 35% de muerte celular media.

Cuando dividimos las 37 muestras de pacientes en resistentes y sensibles estableciendo el corte de resistentes dentro del primer cuartil de respuesta a ixazomib (según la muerte específica) en ambas dosis de 100 nM y 200 nM de ixazomib, vemos que la mayor diferencia significativa entre ambos grupos se da a la dosis más alta, aunque a la dosis más baja también se vean diferencias significativas (**Figura 4.36B**). Los resultados obtenidos indican que sólo 6 muestras de pacientes resultaron resistentes a ixazomib, de las cuales 5 se caracterizan por presentar alteraciones génicas (**Tabla 4.7**),

mientras que la muestra nº 14 posee una genética normal. Este indicio puede sugerir que aquellos pacientes con alteraciones génicas estén más predispuestos a ser más susceptibles al tratamiento con ixazomib.

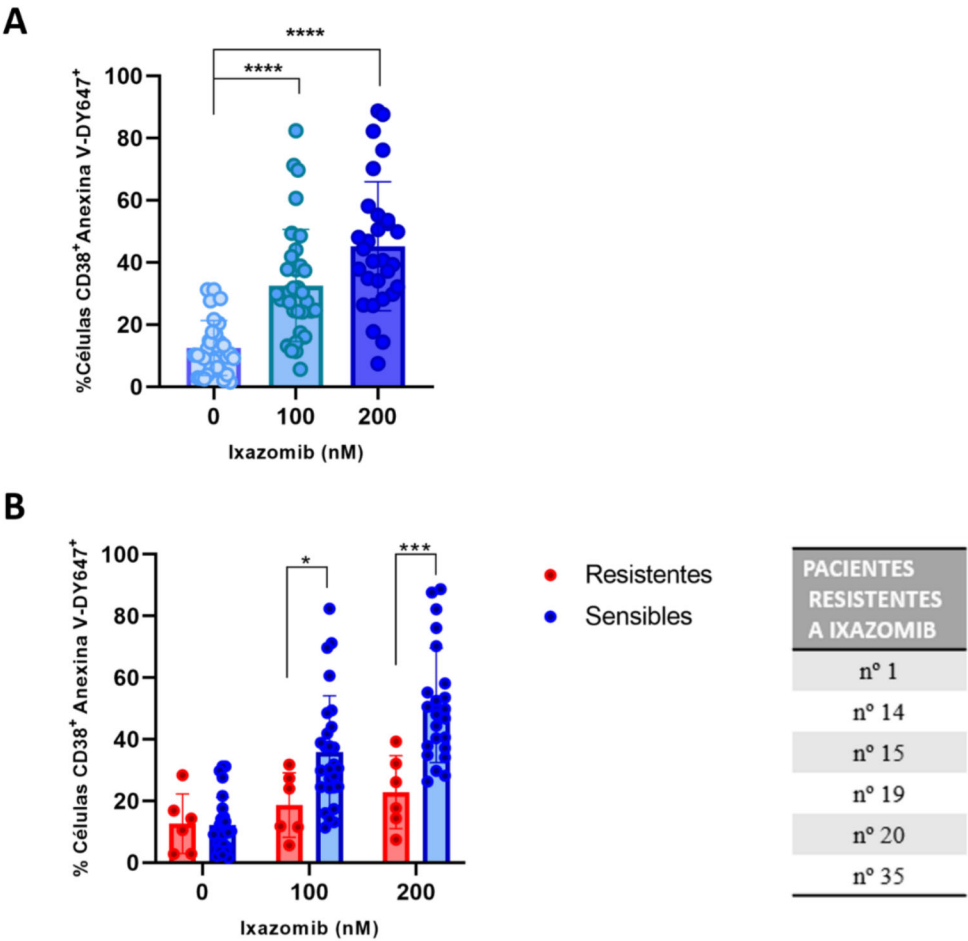


Figura 4.36. Sensibilidad a ixazomib en muestras de MM *ex vivo*. Se evaluó la sensibilidad a ixazomib en células mononucleadas de médula ósea aisladas de pacientes con MM. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** Resultados de la sensibilidad de las 37 muestras a diferentes dosis de ixazomib, como se indica en la gráfica. El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** Estratificación de los pacientes en función de la sensibilidad ante ixazomib. Se consideran resistentes a los pacientes que presentan un efecto a ixazomib en muerte específica por debajo del primer cuartil en ambas dosis, y, todos los que se encuentran por encima de este cuartil son considerados sensibles. El análisis estadístico se realizó mediante análisis *two-ANOVA* con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes).

Tabla 4.7. Características clínicas de las muestras *ex vivo* de pacientes. Se refleja para cada muestra el diagnóstico, el tipo, las alteraciones genéticas y líneas de tratamiento previo que presentan. **BJ:** Bence-Jones; **GMSI:** Gammapatía monoclonal de significado incierto; **LCP:** plasmocitoma; **SMD:** mieloma múltiple latente o *smoldering multiple myeloma*; -: sin datos; **R:** resistente; **S:** sensible.

	DIAGNÓSTICO	TIPO	ALTERACIONES	LÍNEAS DE TRATAMIENTO PREVIAS	IXAZOMIB
1	LCP/MM	IgG K	t(4;14)	2	R
2	LCP/MM	-	p53 t(11;14)	0	S
3	MM + SMD	BJ	p53 t(11;14)	0	S
4	MM + SMD	BJ	p53 t(11;14)	1	S
5	MM	IgG K	Normal	0	S
6	LCP/MM	BJ	t(14;20)	0	S
7	MM	IgG L	Ganancia 1q	0	S
8	GMSI -> MM	IgG K	t(6;14)	0	S
9	MM	IgG K	Normal	1	S
10	MM	IgG L	Ganancia 1q	1	S
11	MM	IgG K	t(4;14) Ganancia 1q	2	S
12	MM	IgG K	Normal	1	S
13	MM	IgG L	Normal	0	S
14	MM	-	Normal	1	R
15	MM	BJ	p53	1	R
16	MM	IgG K	Normal	0	S
17	MM	IgG L	t(14;16) MAF Ganancia 1q	0	S
18	GMSI	-	Normal	0	S
19	GMSI	IgG L	14q32	0	R
20	MM	BJ	p53 Ganancia 1q	2	R
21	GMSI	IgA	Normal	0	S
22	MM	-	-	0	S
23	GMSI	-	-	0	S
24	MM	IgG K	Ganancia 1q	0	S
25	GMSI	-	-	0	S
26	MM	-	-	0	S
27	MM	IgG K	14q32	0	S
28	MM	IgG K	Normal	0	S
29	MM	IgG K	Normal	3	S
30	MM	IgG K	Normal	2	S
31	MM	IgA L	Normal	0	S
32	MM	IgA K	Ganancia 1q	0	S
33	MM	IgG L	Normal	0	S
34	SMD	IgG L	Normal	0	S
35	MM	IgG K	Ganancia 1q	0	R
36	MM	IgG K	Normal	0	S
37	MM	IgG K	Normal	0	S

Para analizar si existía una correlación entre el perfil citogenético y la sensibilidad a ixazomib se dividieron las muestras en función de si presentan alguna anomalía citogenética (**Tabla 4.7**) en dos grupos: no alterados (n=15) y alterados (n=16). El tratamiento de muestras *ex vivo* con ixazomib depende de la dosis administrada incrementando su efecto a mayor dosis, pero no depende de la citogenética que presentan los pacientes como se muestra en la **Figura 4.37A**, a pesar de observarse una pequeña diferencia significativa en la dosis de 100 nM siendo más significativo en las muestras sin anomalías génicas que en el grupo con alteraciones. También se observa que la media de muerte celular es menor en el grupo de muestras procedentes de pacientes con alteraciones genéticas. Además, la desviación del tratamiento en los diferentes grupos es grande, debido a que cada muestra responde de una manera diferente ya que hay muchos factores que implican un comportamiento como son edad, sexo, tratamientos previos, alteraciones genéticas, etc. ante el tratamiento con fármacos, pero sobre todo destaca que con alteraciones genéticas dicha dispersión es aún mayor. Con la información que disponemos no podemos establecer rangos de probabilidad en función del tipo de alteración presente.

Por otra parte, como se observa en la **Figura 4.37**, parece que el número de líneas previas de tratamiento sí correlaciona con la sensibilidad a ixazomib, ya que en el grupo de muestras resistentes el número de líneas previas de tratamiento era significativamente mayor que en el grupo de muestras sensibles a ixazomib. Se desconoce cuáles son los tratamientos previos, por lo que no podemos explicar la razón de la resistencia a ixazomib.

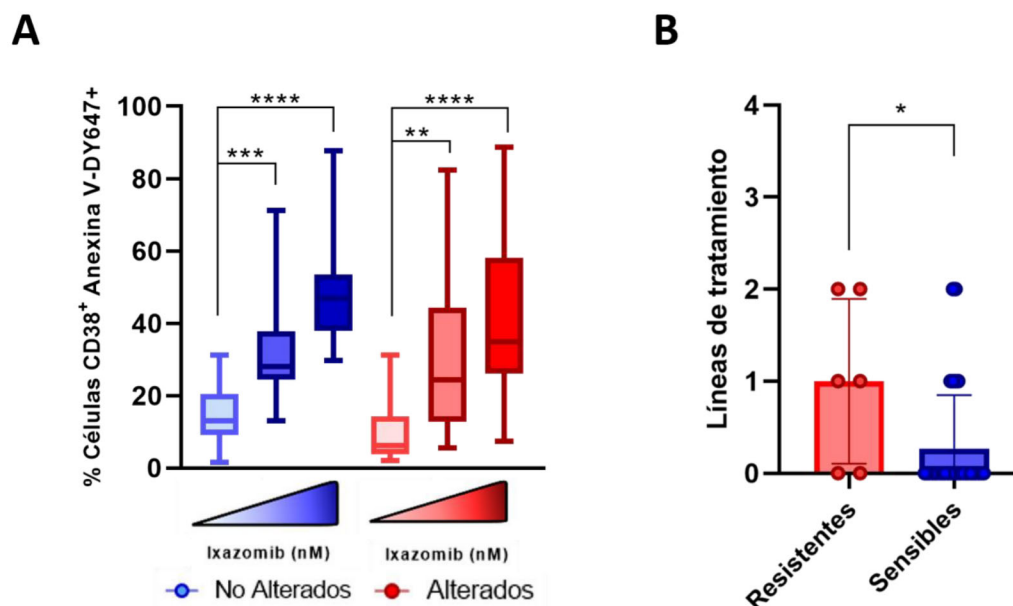


Figura 4.37. Correlación entre la citogenética (A) y líneas de tratamiento previas (B) en la sensibilidad a ixazomib en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** Respuesta *ex vivo* a ixazomib en los grupos de pacientes estratificados en función de si presentan o no alteraciones genéticas. El análisis estadístico se realizó comparando en cada grupo entre las diferentes condiciones respecto al control. Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** Número de tratamientos previos que se han dado en relación con la resistencia a ixazomib. Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ y ns= no significativo.

La traslocación t(11;14) es de las más difíciles de tratar en MM, en un trabajo realizado por Touzeau se propone como tratamiento eficaz el empleo del mimético BH3 ABT-199 en estos casos (Touzeau et al., 2014). Por tanto, se decidió estudiar la sensibilidad de las muestras ante el tratamiento con miméticos BH3 específicos de BCL-2 (ABT-199), BCL-X_L (A-1155463) y MCL-1 (S63845) en las 37 muestras.

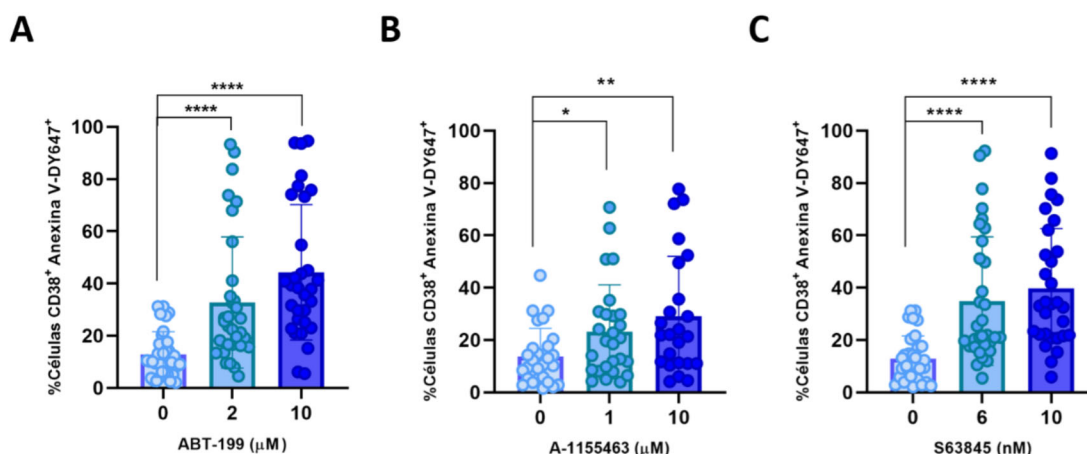


Figura 4.38. Sensibilidad a los miméticos BH3 ABT-199 (A), A-1155463 (B) y S63845 (C) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de cada mimético BH3 durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En la **Figura 4.38** se recoge la sensibilidad de las muestras *ex vivo* probadas (**Tabla 4.7**) a los miméticos BH3. El tratamiento de estas muestras con miméticos BH3 depende de la dosis administrada incrementando su efecto ligeramente a mayor dosis. Además, según los resultados observados, el inhibidor de BCL-2 (ABT-199) y el inhibidor de MCL-1 (S63845) parecen generar un nivel mayor de toxicidad que el inhibidor de BCL-X_L. Podemos destacar, que hay 8 muestras que presentan una alta sensibilidad a los tres miméticos BH3 (nº2, nº3, nº5, nº9, nº11, nº19 y nº20) sin características en común (**Tabla 4.7**).

Tras el análisis global del efecto de los miméticos se procedió a identificar aquellas muestras de pacientes que son resistentes a cada mimético BH3 (según la muerte específica). Estos resultados se recogen en la **Figura 4.39**. En ella se muestra como la diferencia del efecto tóxico entre las muestras resistentes y las sensibles es significativa, independientemente de la dosis empleada de cualquiera de los 3 miméticos BH3.

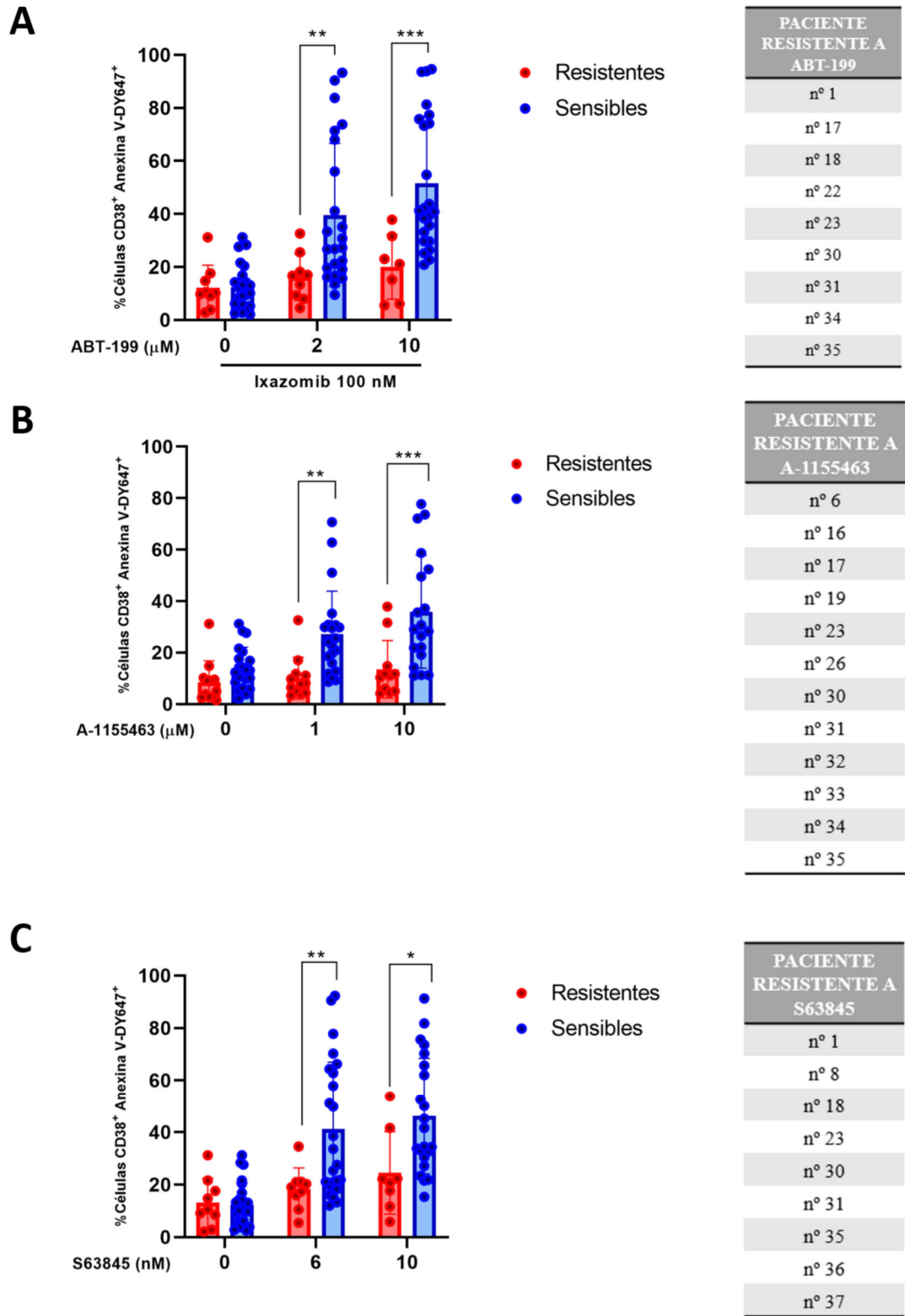


Figura 4.39. Estratificación en función a la sensibilidad de los miméticos BH3 ABT-199 (A), A-1155463 (B) y S63845 (C) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó mediante análisis *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes).

Además, de las 37 muestras analizadas 9 muestras fueron resistentes a ABT-199, 12 muestras a A-1155463 y 9 muestras a S63845. Las muestras n°23, n°30, n°31 y n°35 son resistentes al efecto de cualquiera de los tres miméticos probados, y su genética variada, aunque predominan los de genética no alterada (**Tabla 4.7**) por lo que parece implicar que la citogenética no influye en la resistencia a los miméticos BH3. En la **Figura 4.40A-C** se analiza en mayor profundidad la relación de la citogenética de las muestras en la sensibilidad a los tres miméticos estudiados.

Al centrarnos en analizar las muestras de pacientes que son resistentes a ABT-199 observamos que ninguna posee la traslocación t(11;14), y, aquellos pacientes que sí la poseen (del n°2 al n°4) presentaron la mayor muerte apoptótica por ABT-199 observada (en torno al 90%). Este dato corrobora lo explicado en el estudio de Touzeau *et al.* 2014

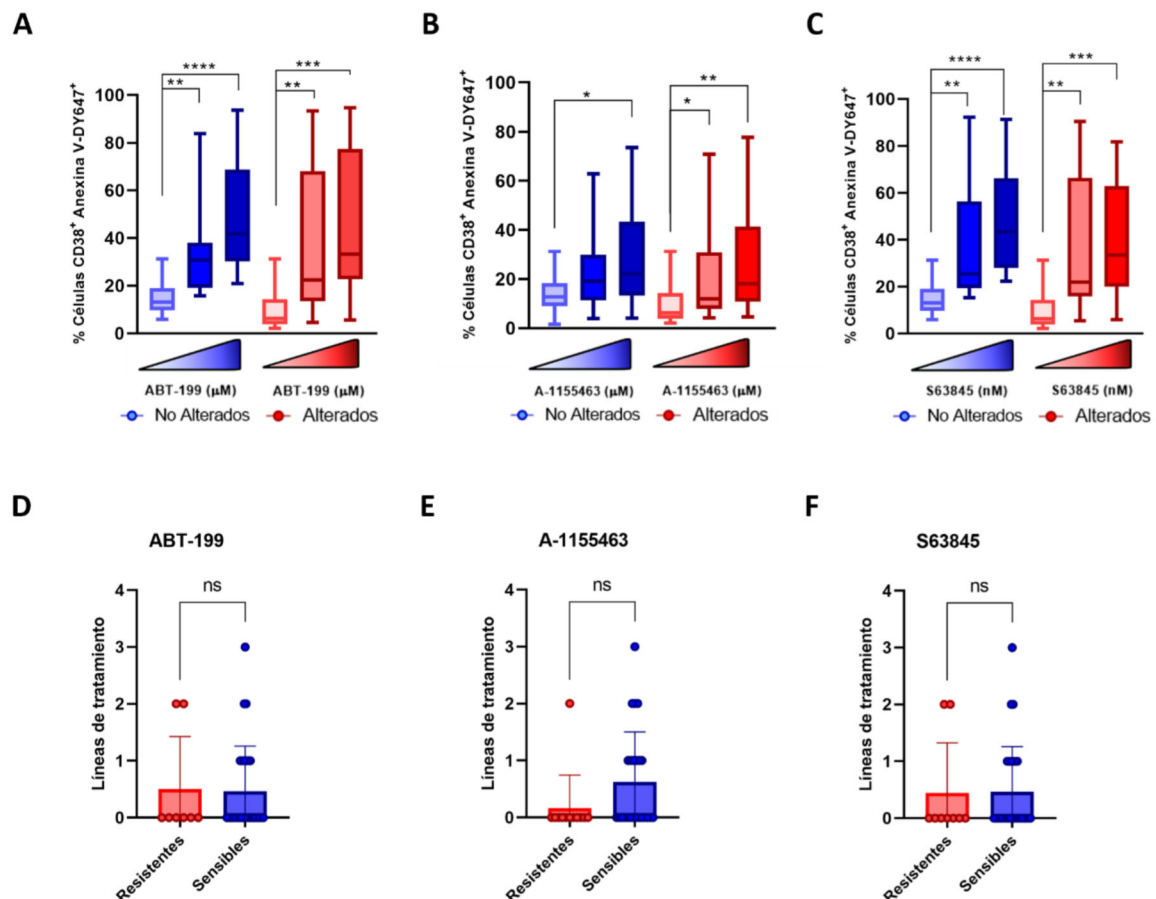


Figura 4.40. Correlación de la citogenética (A-C) y líneas de tratamiento previas (D-E) en la sensibilidad a miméticos BH3 en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A-C)** El análisis estadístico se realizó comparando en cada grupo entre las diferentes condiciones respecto al control. Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(D-E)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes) de manera lineal o en barras.

Anteriormente se ha comentado brevemente que la citogenética parece no influir en la sensibilidad o resistencia a los miméticos BH3. Esta hipótesis se confirma en general para los tres miméticos BH3 en la **Figura 4.40A-C**. Destaca la dosis baja del inhibidor A-1155463 (1 μ M) donde se observa cierta diferencia entre el grupo que presenta anomalías génicas respecto a los que tienen una genética normal, siendo las muestras correspondientes a pacientes con alteraciones genéticas los que parecen ser más sensibles a la dosis más baja de A-1155463. Además, la heterogeneidad presente en las muestras resistentes de cada mimético es tan alta que con la información que disponemos no podemos establecer rangos de probabilidad a la sensibilidad del mimético en función de la alteración génica.

Por otra parte, la **Figura 4.40D-E** muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de líneas de tratamiento recibidas entre los grupos de muestras resistentes y sensibles a cada uno de los miméticos, en contraste con lo observado en el caso de ixazomib (**Figura 4.37**). En el caso del inhibidor de BCL-X_L se aprecia una tendencia en el grupo sensible a presentar mayor número de líneas de tratamiento, pero no llega a ser estadísticamente significativo.

Tanto ixazomib como los miméticos BH3 presentan resistencia en algunas de las muestras analizadas, por tanto, se analizó la predisposición de las muestras resistentes o sensibles a ixazomib al efecto de los miméticos BH3, como se recoge en la **Figura 4.41**. El efecto causado por los miméticos BH3 no presenta ninguna diferencia significativa en su acción en muestras de pacientes resistentes o sensibles al ixazomib (**Figura 4.41A**). Ni tampoco depende de la dosis que se administre de mimético BH3. Sin embargo, se observa mayor número de muestras resistentes a los miméticos BH3 en el grupo resistente a ixazomib (**Figura 4.41B**), pero habría que comprobar este hecho con un número mayor de pacientes. Por otra parte, parece que hay tendencia en las muestras sensibles a ixazomib a ser algo menos sensibles a A-1155463, aunque no es estadísticamente significativo.

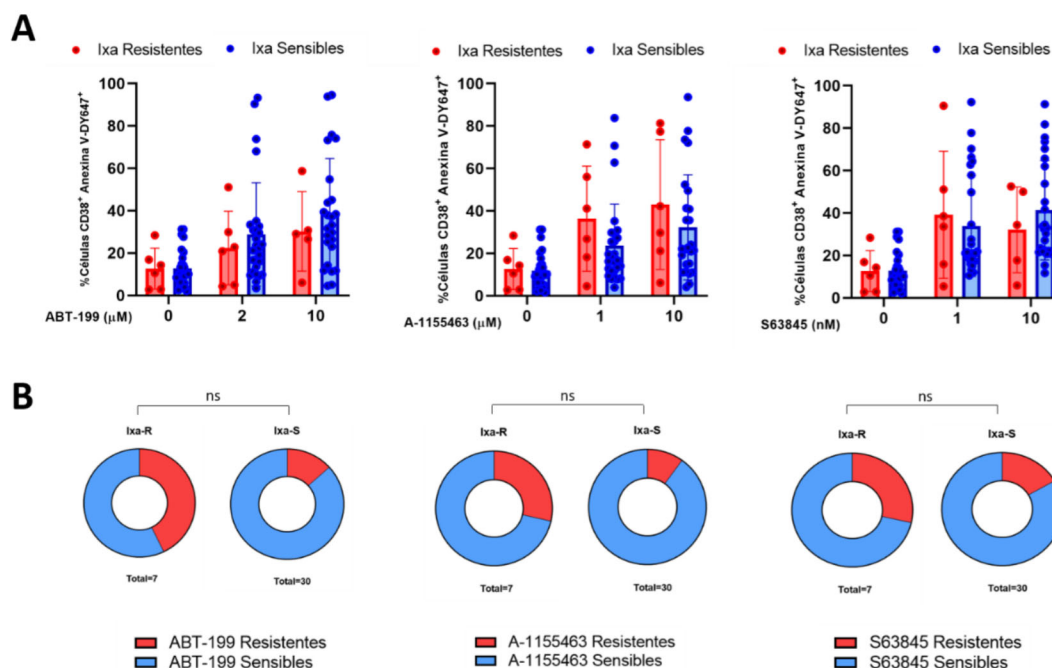


Figura 4.41. Efecto de los miméticos BH3 en relación a la sensibilidad a ixazomib en células de mieloma *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células con diferentes dosis de ixazomib y el mimético BH3 correspondiente durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se analizaron los valores correspondientes obtenidos en las células de control y la muerte celular específica en la cohorte de respondedores. El análisis estadístico se realizó mediante *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$; y mediante test de Fisher en la parte inferior donde ns= no significativo.

En general, las muestras *ex vivo* son más sensibles al efecto de ABT-199, seguido de S63845 y, por último, A-1155463. A pesar de mostrar sensibilidad a los miméticos BH3 existen resistencias que podrían solventarse al combinar dichos miméticos con ixazomib como se estudió en apartados anteriores de esta tesis en líneas establecidas de mieloma.

Los resultados con líneas celulares establecidas (**Apartado 4.3**) indican que en la línea U266 se produce cierta sinergia entre ABT-199 e ixazomib. Con esta idea se probó esta combinación en las muestras *ex vivo* de los pacientes (**Figura 4. 42**).

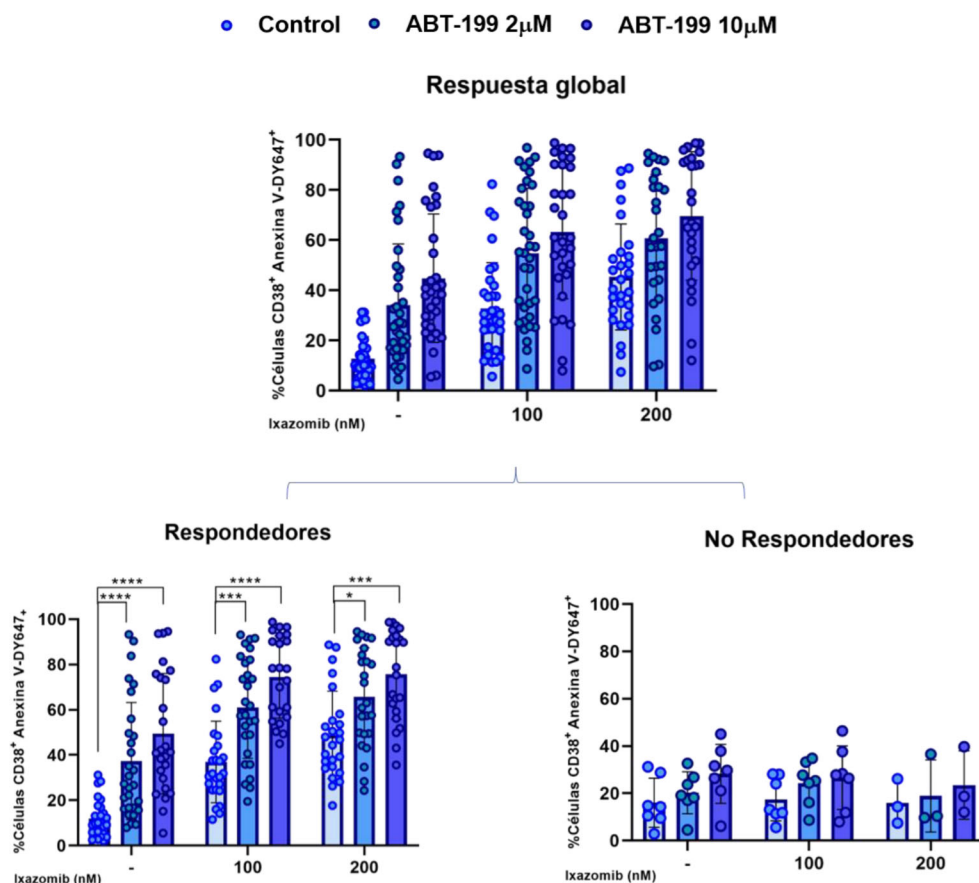


Figura 4. 42. Sensibilidad a la combinación de ixazomib con el mimético BH3 (ABT-199) en células de mieloma *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y ABT-199 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se observa la muerte global de las 37 muestras de pacientes y a su vez se estratifican en respondedores y no respondedores. Se consideran no respondedores a los pacientes que presentan una muerte celular específica inducida por la combinación del inhibidor de proteasoma y el mimético BH3 por debajo del primer cuartil; todos los que se encuentran por encima de este cuartil son considerados respondedores. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el estudio *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En la **Figura 4. 42** se recogen los resultados obtenidos de la respuesta *ex vivo* a la combinación del mimético BH3 ABT-199, inhibidor de BCL-2, con ixazomib de manera global y segregada en pacientes respondedores o no respondedores, estableciendo el corte de los no respondedores en el primer cuartil de la combinación de la dosis más baja de ixazomib (100 nM) y la combinación con ambas dosis del mimético BH3. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas para las dos concentraciones de los compuestos analizadas, si nos fijamos en el grupo de respondedores.

Sólo las células de mieloma de 7 pacientes (**Tabla 4.8**) no respondieron a esta combinación y en el resto de muestras analizadas, se observó un incremento de la muerte celular de manera significativa respecto a la muerte inducida solo por el IP.

Tabla 4.8. Pacientes no respondedores a la combinación de ABT-199 e ixazomib. Se refleja en ella las muestras de pacientes resistentes a la combinación de ABT-199 e ixazomib que se encuentran en el primer cuartil de la combinación de 100 nM de ixazomib y cada una de las dosis del mimético BH3.

PACIENTES NO RESPONDEDORES
nº 1
nº 15
nº 30
nº 31
nº 32
nº 35

Al igual que en el tratamiento con ixazomib y con los miméticos BH3 solos, en esta combinación se analizó la posible relación con las alteraciones presentes en las muestras de pacientes (**Figura 4.43**).

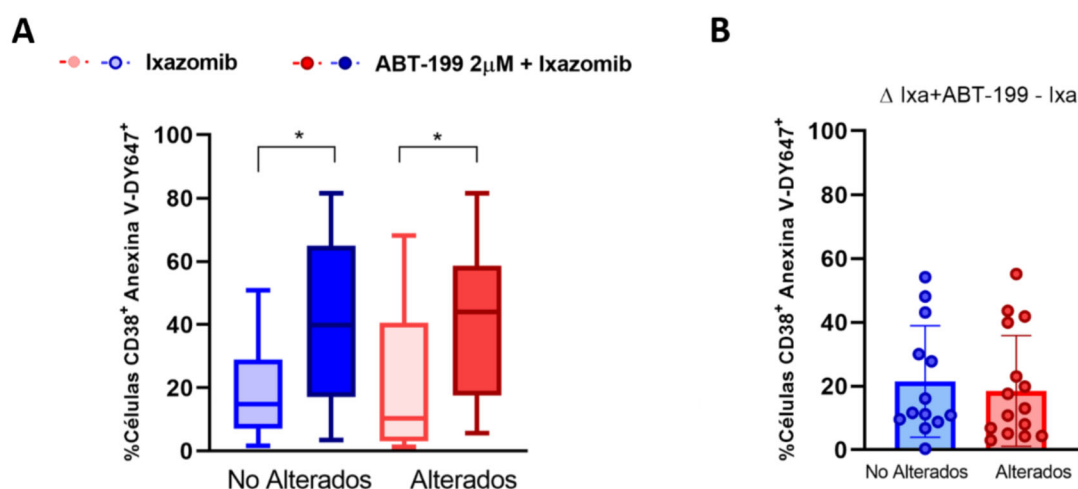


Figura 4.43. Correlación entre la citogenética y la respuesta a la combinación de ABT-199 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético ABT-199 (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó comparando las diferentes condiciones respecto al control en cada grupo (alterados y no alterados). Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes) de manera lineal o en barras.

Según la clasificación en alterados o no alterados (**Figura 4.43A**), por la citogenética de las muestras, vemos como en ambos grupos se observa un aumento significativo y similar del efecto citotóxico de la combinación del mimético BH3 e ixazomib. Además, se observa que el efecto aditivo de ABT-199 no depende de las alteraciones genéticas que existan en la muestra (**Figura 4.43B**).

Por otra parte, al analizar la respuesta a la combinación de ABT-199 e ixazomib en los grupos de muestras sensibles y resistentes a ixazomib se observa que el porcentaje de muerte es menor en el grupo que es resistente a ixazomib, como esperábamos, pero ABT-199 produce un incremento similar en ambos grupos, ligeramente inferior en el grupo de pacientes resistentes a ixazomib, respecto al efecto individual de ixazomib (**Figura 4.44**).

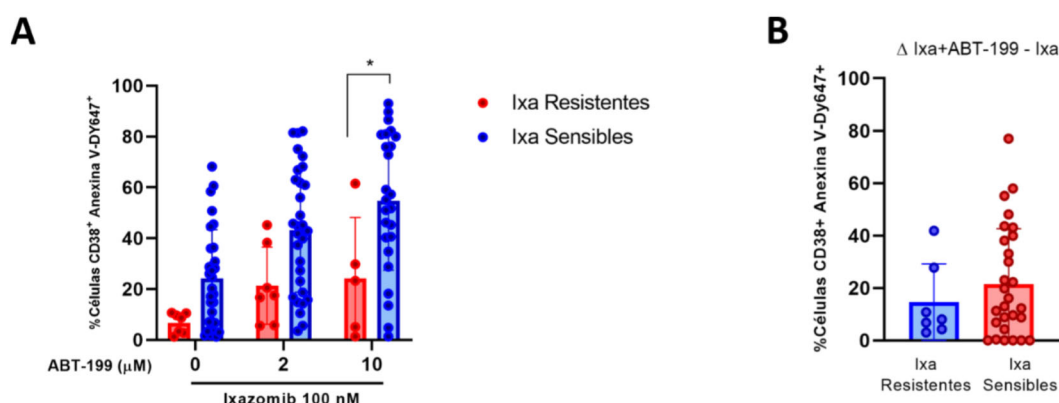


Figura 4.44. Correlación entre la resistencia a ixazomib y la combinación de ABT-199 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético ABT-199 y su relación con la resistencia a ixazomib (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y del mimético BH3 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *two*-ANOVA con posprueba de Tukey en las diferentes condiciones entre ixazomib resistentes y sensibles donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes a ixazomib) de manera lineal o en barras.

La siguiente combinación estudiada fue con el inhibidor de BCL-X_L (A-1155463) e ixazomib, los resultados se muestran en la **Figura 4.45**.

La combinación del mimético BH3 A-1155463, inhibidor de BCL-X_L, junto a ixazomib (**Figura 4.45**) depende de las dosis de ixazomib, puesto que a mayor dosis del

IP mayor porcentaje de muerte celular en las muestras, al igual que ocurría con ABT-199 (Figura 4. 42).

Los resultados obtenidos revelaron que 12 de las muestras analizadas eran resistentes al mimético A-155463 (Figura 4.39). En cambio, al combinar dicho fármaco con ixazomib, se observan únicamente 5 pacientes no respondedores (Tabla 4.9), mientras en el resto de muestras se observó un aumento de la muerte celular en la combinación con A-1155463.

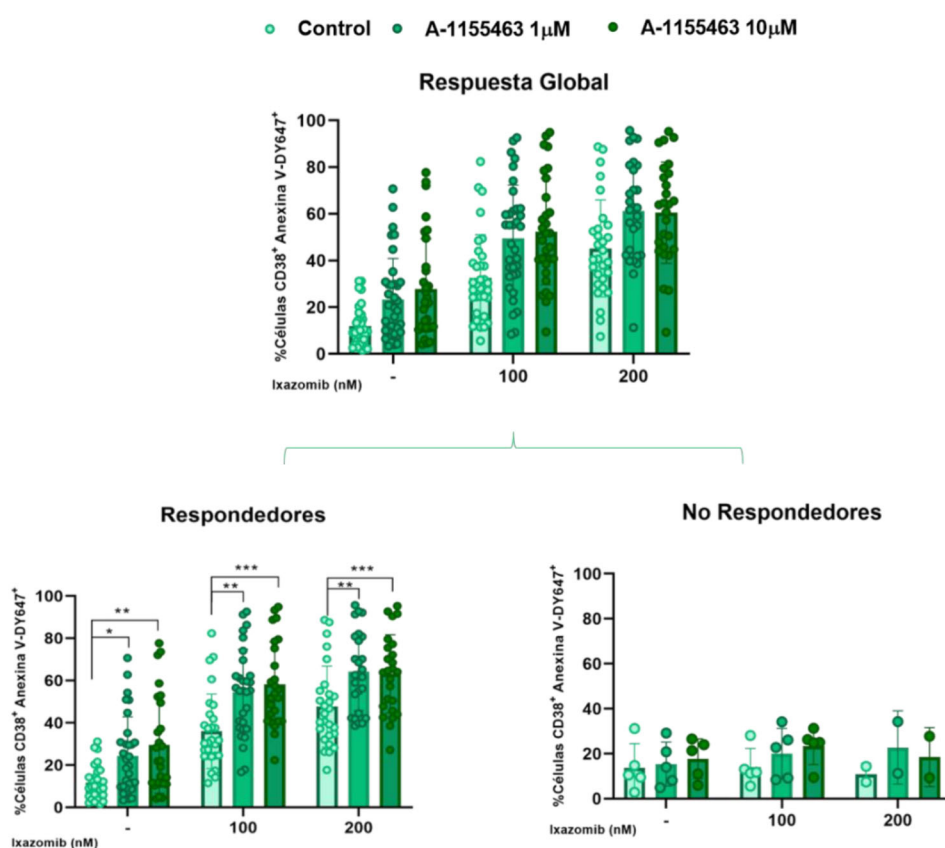


Figura 4.45. Sensibilidad a la combinación de ixazomib con el mimético BH3 (A-1155463) en células de mieloma *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y A-1155463 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Annexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se observa la muerte global de las 37 muestras de pacientes y a su vez se estratifican en respondedores y no respondedores. Se consideran no respondedores a los pacientes que presentan una muerte celular inducida por la combinación del inhibidor de proteasoma y el mimético BH3 por debajo del primer cuartil; todos los que se encuentran por encima de este cuartil son considerados respondedores. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el estudio *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Tabla 4.9. Pacientes no respondedores a la combinación de A-1155463 e ixazomib. Se refleja en ella las muestras de pacientes resistentes a la combinación de A-1155463 e ixazomib que se encuentran en el primer cuartil de la combinación de 100 nM de ixazomib y cada una de las dosis del mimético BH3.

PACIENTES NO RESPONDEDORES	
	n° 1
	n° 30
	n° 31
	n° 32
	n° 35

Al igual que lo visto hasta ahora, la combinación del mimético BH3 A-1155463 e ixazomib no parece depender de la citogenética (**Figura 4.46**). Tanto el grupo que no presenta alteraciones génicas como el grupo con alteraciones génicas presentan un incremento de muerte celular idéntico. En cambio, a diferencia de la combinación de ABT-199 e ixazomib, el incremento de la muerte celular con la combinación de A-1155463 e ixazomib no alcanza ni el 20 % de muerte celular.

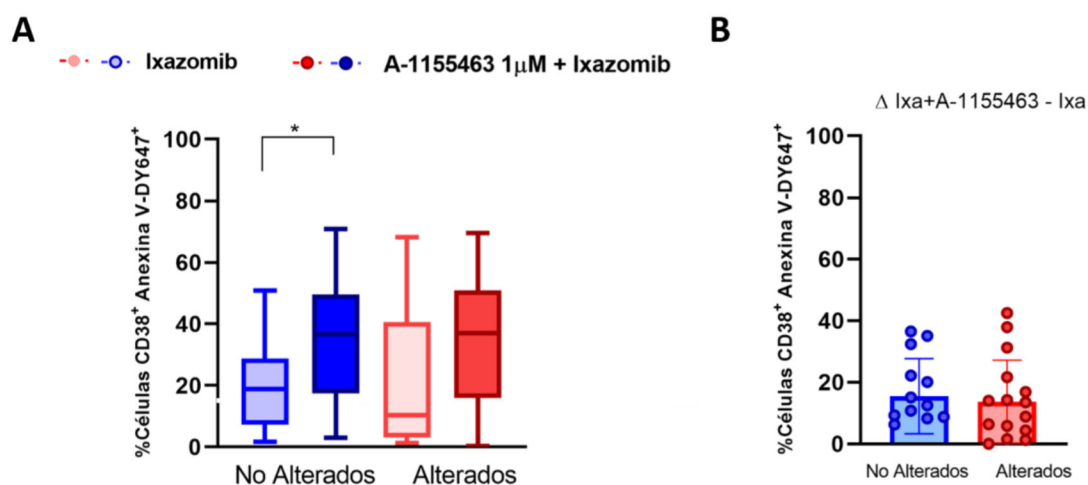


Figura 4.46. Correlación entre la citogenética y la respuesta a la combinación de A-1155463 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético A-1155463 (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó comparando las diferentes condiciones respecto al control en cada grupo (alterados y no alterados). Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes) de manera lineal o en barras.

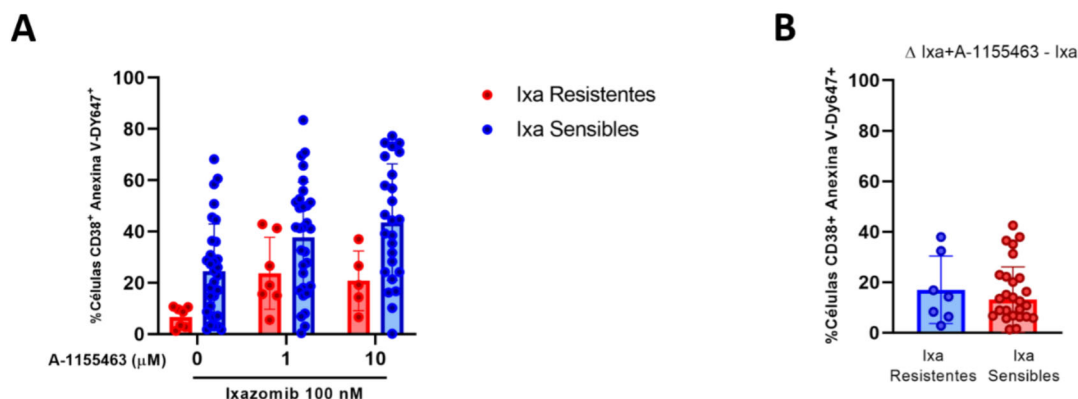


Figura 4.47. Correlación entre la resistencia a ixazomib y la combinación de A-1155463 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético A-1155463 y su relación con la resistencia a ixazomib (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y del mimético BH3 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Annexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *two*-ANOVA con posprueba de Tukey en las diferentes condiciones entre ixazomib resistentes y sensibles donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes) de manera lineal o en barras.

La resistencia a ixazomib no influye en la muerte inducida por la combinación del mimético A-1155463 e ixazomib (**Figura 4.47^a**). Además, al igual que en la combinación de ABT-199 e ixazomib, el efecto aditivo de A-1155463 es similar entre las muestras resistentes y sensibles a ixazomib (**Figura 4.47B**).

Si comparamos la combinación de ABT-199 e ixazomib respecto a A-1155463 e ixazomib en los grupos resistentes y sensibles a ixazomib, el efecto ocasionado en los pacientes sensibles es mayor en la combinación del IP con ABT-199 que con A-1155463.

Y, por último, se trataron las muestras *ex vivo* de mieloma con los fármacos S63845 e ixazomib simultáneamente como se recoge en la **Figura 4.48**.

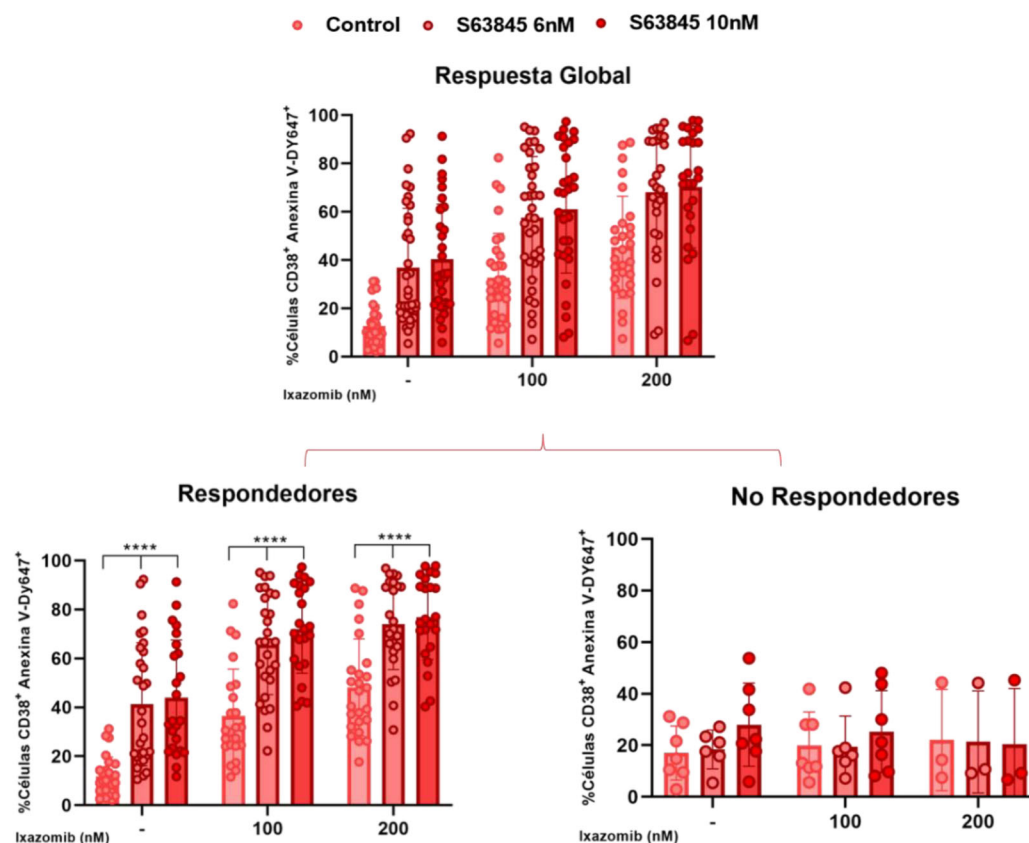


Figura 4.48. Sensibilidad a la combinación de ixazomib con el mimético BH3 (S63845) en células de mieloma *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y S63845 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se observa la muerte global de las 37 muestras de pacientes y a su vez se estratifican en respondedores y no respondedores. Se consideran no respondedores a los pacientes que presentan una muerte celular inducida por la combinación del inhibidor de proteasoma y el mimético BH3 por debajo del primer cuartil; todos los que se encuentran por encima de este cuartil son considerados respondedores. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante el estudio *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En la **Figura 4.48** observamos el estudio global y la segregación en muestras de pacientes respondedores y no respondedores del tratamiento con S63845, aplicando el mismo criterio para la clasificación que en los casos anteriores. En el grupo de respondedores, los resultados obtenidos muestran diferencias significativas al mismo nivel para las dos concentraciones de los compuestos analizadas.

Al igual que sucedía en las combinaciones anteriores, el grupo de no respondedores no presenta cambios significativos en el tratamiento con S63845 e ixazomib. Este último grupo, está compuesto por 7 pacientes (**Tabla 4.10**), como en el caso de la combinación de ABT-199 e ixazomib (**Tabla 4.8**), con la discrepancia de una de las muestras en la combinación que estamos estudiando ahora (el n°25).

Tabla 4.10. Pacientes no respondedores a la combinación de S63845 e ixazomib. Se refleja en ella las muestras de pacientes resistentes a la combinación de S63845 e ixazomib que se encuentran en el primer cuartil de la combinación de 100 nM de ixazomib y cada una de las dosis del mimético BH3.

PACIENTES NO RESPONDEDORES	
n° 1	
n° 25	
n° 30	
n° 31	
n° 32	
n° 35	

Esta combinación guarda cierta similitud con la combinación de ABT-199 e ixazomib en la relación de la citogenética. Las muestras de pacientes con alteraciones genéticas confirmadas muestran un incremento de muerte celular mayor, pero no estadísticamente significativo respecto al grupo de muestras sin alteraciones genéticas (**Figura 4.49**). Este dato podría indicar como el efecto aditivo de S63845 depende, en cierta medida, de las alteraciones genéticas que existan en la muestra (**Tabla 4.7**).

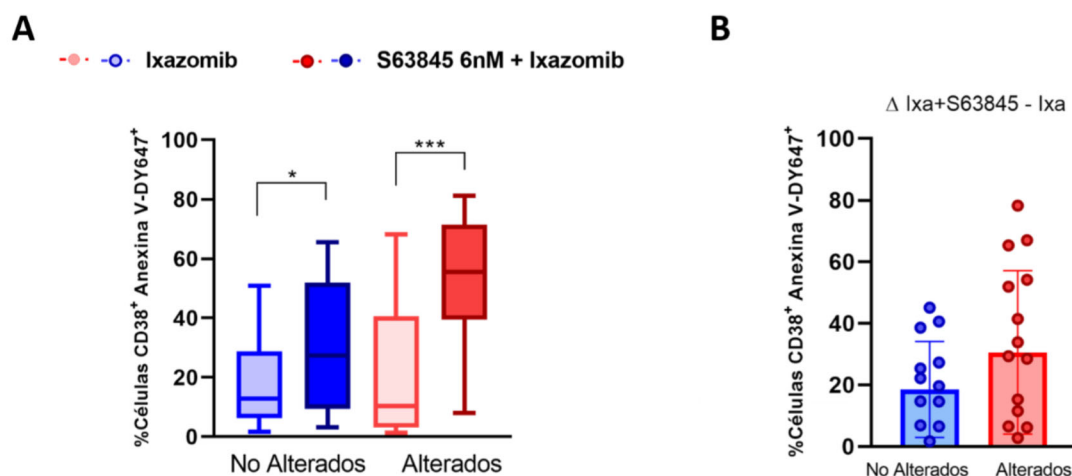


Figura 4.49. Correlación entre la citogenética y la respuesta a la combinación de S63845 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético S63845 (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib durante 16 h y se marcaron con anti-CD38-FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó comparando las diferentes condiciones respecto al control en cada grupo (alterados y no alterados). Para ello se empleó el análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t-test* para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes) de manera lineal o en barras.

Por otra parte, la muerte celular inducida por la combinación de ixazomib (100 nM) y S63845 (10 nM) es significativamente mayor en el grupo de pacientes sensibles a

ixazomib (**Figura 4.50A**), pero las diferencias observadas en los dos grupos en el efecto aditivo de S63845 no son significativas estadísticamente como sucedía con los dos miméticos anteriores (**Figura 4.50B**).

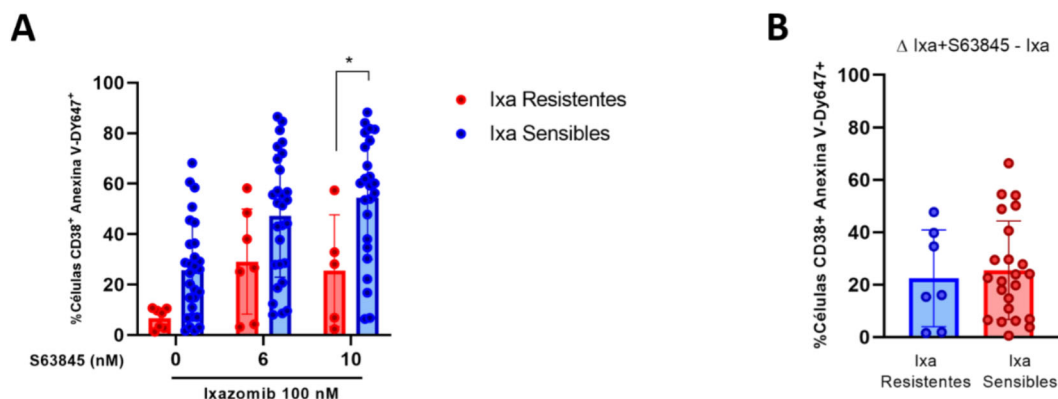


Figura 4.50. Correlación entre la resistencia a ixazomib y la combinación de S63845 e ixazomib (A) y muerte causada por la adición del mimético S63845 y su relación con la resistencia a ixazomib (B) en muestras de MM *ex vivo*. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células por condición con diferentes dosis de ixazomib y del mimético BH3 durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-DY647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. **(A)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *two*-ANOVA con posprueba de Tukey en las diferentes condiciones entre ixazomib resistentes y sensibles donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ **(B)** El análisis estadístico se realizó mediante análisis *t*-test para datos no apareados donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$, comparando los datos globales entre cada grupo (sensibles o resistentes a ixazomib) de manera lineal o en barras.

Las gráficas que se recogen a continuación se han realizado para determinar si el efecto de las combinaciones es aditivo o sinérgico. Si comparamos la combinación de S63845 e ixazomib respecto a A-1155463 o ABT-199 en los grupos resistentes y sensibles, el efecto ocasionado en los pacientes sensibles es igual o similar en las combinaciones del IP con S63845 o ABT-199 que con A-1155463, donde es menor. En cuanto a la sinergia, se observa en todos los casos un efecto aditivo a la concentración de 100 nM de ixazomib con el mimético BH3 correspondiente, mientras que a la dosis de 200 nM del IP en algunos casos llega a ocurrir un efecto antagónico.

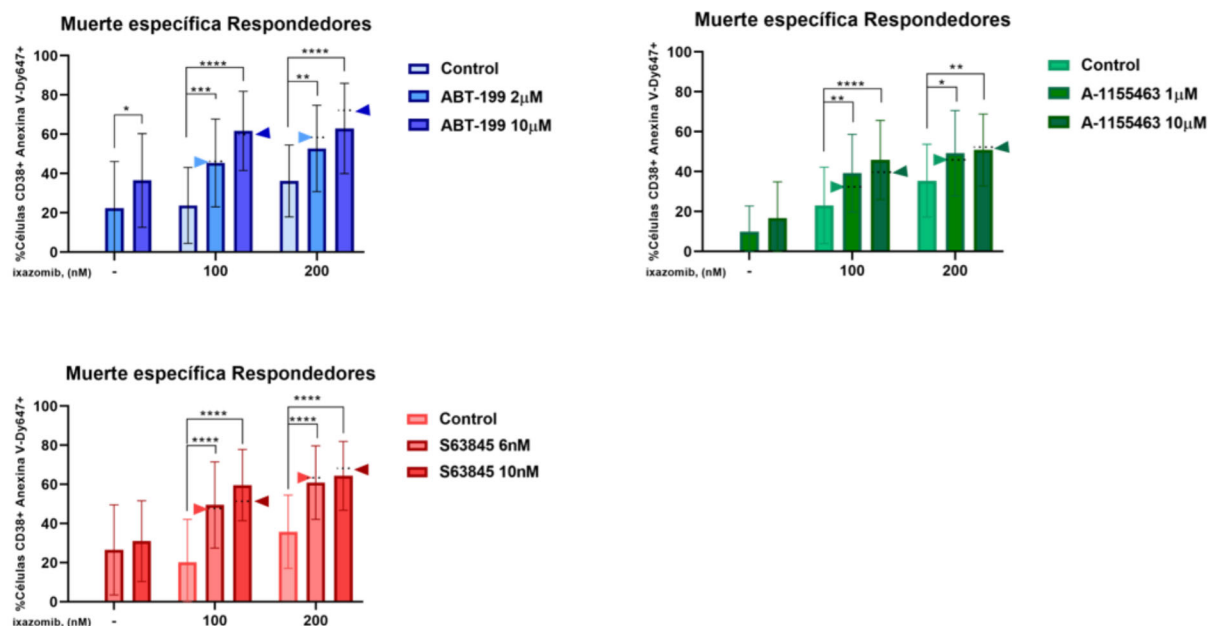


Figura 4.51. Normalización de la tasa de muerte celular obtenida en los pacientes respondedores en cada combinación de ixazomib con un mimético BH3. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la **sección 3.6.1**. A continuación, se incubaron 5×10^5 células con diferentes dosis de ixazomib y el mimético BH3 correspondiente durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38-FITC y Anexina V-Dy647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se analizaron los valores correspondientes obtenidos en las células de control y la muerte celular específica en la cohorte de respondedores. Las puntas de flecha indican el valor de muerte celular que corresponde a un efecto aditivo, es decir, la suma de las tasas de muerte celular individuales para cada combinación. El análisis estadístico se realizó mediante *t*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

En resumen, centrándonos en la **Figura 4.51**, la combinación de miméticos BH3 e ixazomib, en general, muestran aditividad en el efecto citotóxico ocasionado por los fármacos en conjunto en muestras *ex vivo* de pacientes. Por otra parte, el efecto que se produce con las combinaciones de los miméticos BH3 presentan un efecto aditivo a la dosis baja del IP probado, mientras que a la dosis alta (200 nM) se produce un efecto antagónico. En la combinación ABT-199 e ixazomib sólo 8 muestras parecen presentar sinergia (nº2, nº6, nº9, nº10, nº12, nº19, nº28 y nº36), para la combinación A-1155463 presentan sinergia 6 muestras (nº2, nº6, nº12, nº14, nº19 y nº34), y en la combinación S63845 sólo 9 muestras (nº1, nº2, nº4, nº6, nº10, nº12, nº34, nº35 y nº36) (**Figura 4.52**). De todos ellos solo 3 pacientes presentan un efecto sinérgico en las 3 combinaciones (nº2, nº6 y nº12) aunque no se pueden establecer ninguna concordancia de comportamiento en función de características comunes.

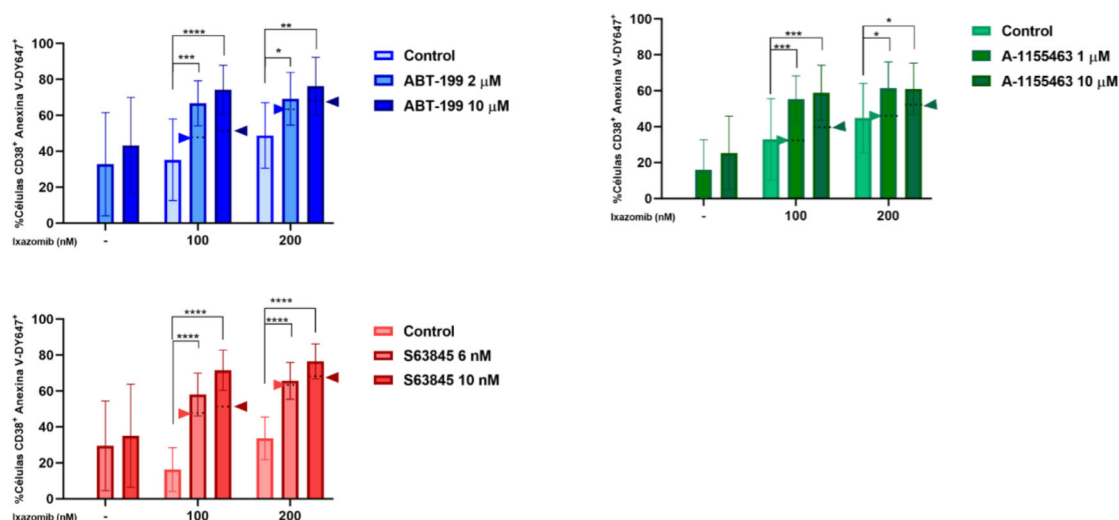


Figura 4.52. Sinergia en muestras de paciente *ex vivo* tratadas con cada combinación de ixazomib con un mimético BH3. Las células se obtuvieron mediante Ficoll-Paque como se describe en la sección 3.6.1. A continuación, se incubaron 5×10^5 células con diferentes dosis de ixazomib y el mimético BH3 correspondiente durante 16 h. Posteriormente se marcaron con anti-CD38- FITC y Anexina V-Dy647 para determinar la muerte celular mediante citometría de flujo. Se analizaron los valores correspondientes obtenidos en las células de control y la muerte celular específica en la cohorte de respondedores. Las puntas de flecha indican el valor de muerte celular que corresponde a un efecto aditivo, es decir, la suma de las tasas de muerte celular individuales para cada combinación. El análisis estadístico se realizó mediante *two*-ANOVA con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Por último, se muestra una tabla resumen de la resistencia y sensibilidad a cada fármaco y combinación de fármacos por el número de muestra (**Tabla 4.11**). Destaca la muestra n°35 por ser resistente a todos los fármacos y su combinación. Esta muestra tiene la ganancia 1q, contradiciendo la sensibilidad mostrada por mielomas con esta alteración genética al tratamiento con inhibidores de MCL-1 (Slomp et al., 2019). Realmente se precisa de un mayor número de muestras para esclarecer como actúan las células de mieloma múltiple a estos tratamientos.

En resumen, los datos obtenidos muestran como posible vía alternativa a recidivas en algunos pacientes la administración conjunta de miméticos BH3 e ixazomib, aunque se precisa de más estudios preclínicos y clínicos con este tipo de compuestos. Por otra parte, las sinergias observadas en el estudio de las combinaciones de miméticos BH3 e ixazomib en líneas de mieloma establecidas no parecen extrapolarse a muestras *ex vivo* de pacientes, salvo en algunos pacientes en concreto.

Tabla 4.11. Respuesta *ex vivo* a miméticos BH3 e ixazomib, solos o en combinación, de las muestras de MM. Se refleja para cada muestra la resistencia o sensibilidad a los fármacos probados. **R**: resistente; **S**: sensible; -: sin clasificar por falta de datos sobre alguna dosis.

	IXAZOMIB	ABT-199	A-1155463	S63845	ABT-199 IXAZOMIB	A-1155463 IXAZOMIB	S63845 IXAZOMIB
1	R	R	S	R	R	R	R
2	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S
4	S	R	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	R	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	R	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S
14	R	S	S	S	S	S	S
15	R	S	S	S	R	S	S
16	S	S	R	S	S	S	S
17	S	S	R	S	S	S	S
18	-	R		R	-	-	-
19	R	S	R	S	-	-	S
20	R	S	S	S	S	S	S
21	-	R	S	S	-	-	-
22	S	R	S	R	-	-	-
23	S	R	R	R	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S
26	S	S	R	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S
29	R	S	S	S	S	S	S
30	-	R	R	R	R	R	R
31	-	R	R	R	R	R	R
32	-	S	R	S	R	R	R
33	S	S	R	S	-	S	-
34	S	S	R	S	S	S	S
35	R	R	R	R	R	R	R
36	S	S	S	R	S	S	S
37	S	S	S	R	S	S	R

4.5 FUTURA EXTRAPOLACIÓN DE LA BÁSICA A LA CLÍNICA.

PRUEBAS PREVIAS Y MODELOS ORTOTÓPICO.

Los resultados obtenidos con las combinaciones de miméticos BH3 e ixazomib, sugieren que dichas combinaciones se podrían extrapolar a la clínica en las recidivas de pacientes o como primer tratamiento. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos *in vitro* en modelos *in vivo* se han realizado experimentos en un modelo ortotópico de mieloma en ratón. Dicho modelo se ha utilizado por una parte para evaluar el efecto antitumoral de las combinaciones de ixazomib con miméticos BH3 y por otra para explorar el potencial inmunogénico de las células tratadas con ixazomib.

4.5.1. Efecto de ixazomib y miméticos BH3 en líneas celulares establecidas de mieloma múltiple de ratón.

Anteriormente en este trabajo hemos demostrado que ixazomib induce apoptosis en células de mieloma humano *in vitro*, además de la dependencia de la activación de caspasa-3 y 8 para el desarrollo de esta muerte celular. Antes de pasar a la clínica los datos obtenidos de las combinaciones de ixazomib junto a los miméticos BH3, debemos probar en un modelo murino si son eficaces. Se desconoce cómo se comportan las células de ratón ante estos fármacos por lo que en primer lugar se estudió si en la línea de mieloma de ratón MOPC315.BM, Z-VAD-fmk ejerce el mismo papel protector ante la acción de ixazomib. Como se observa en la **Figura 4.53** la apoptosis inducida por ixazomib solo es proporcional al aumento de la dosis siendo prácticamente inexistente a dosis inferiores de 50 nM y alcanzando el 100% a 100 nM. En comparación con las líneas de mieloma humanas (**Figura 4.3**) la línea MOPC315.BM de ratón es más sensible, asemejándose a la línea U266. Por otro lado, el uso de Z-VAD-fmk combinado con ixazomib resulta más tóxico a dosis inferiores a 75 nM del IP. A partir de 75 nM del IP, Z-VAD-fmk inhibe parcialmente la apoptosis inducida por ixazomib en esta línea celular. Este resultado es contradictorio con lo visto en las líneas humanas de mieloma establecidas donde a mayor dosis mayor efecto protector ante la apoptosis inducida por el IP (**Figura 4.5**).

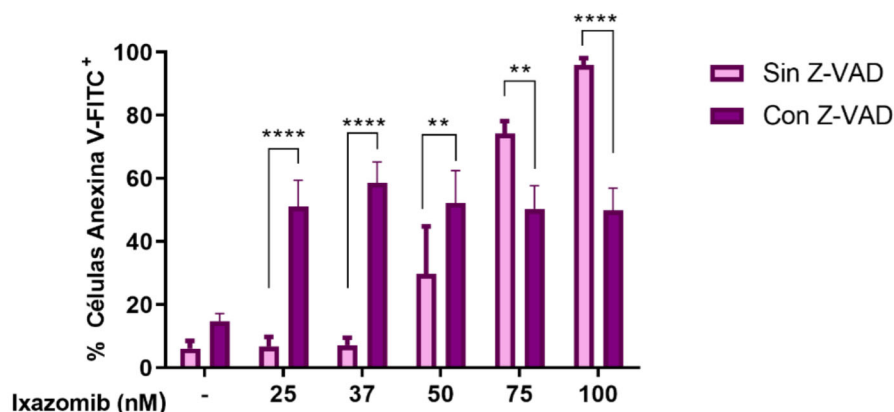


Figura 4.53. Efecto en la línea de mieloma múltiple de ratón MOPC315.BM del tratamiento con ixazomib en presencia de Z-VAD-fmk. La concentración de Z-VAD-fmk fue de 50 μ M y diferentes dosis de ixazomib (0 a 100 nM). En este ensayo se sembraron 2×10^5 células por condición de tratamiento durante 24 h y se marcaron para un posterior análisis mediante citometría de flujo con Annexina V-FITC. Los resultados son la media \pm SD de cada marcaje de $n=3$ y su análisis estadístico mediante *t-test* respecto la situación sin Z-VAD-fmk con ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$.

Los resultados de la línea MOPC315.BM sugieren que el inhibidor de caspasas produce un aumento de estrés celular ocasionado por la inhibición de la respuesta a proteínas mal plegadas, activando otras vías de manera insuficiente para mantener la supervivencia celular. Esta potenciación por parte de Z-VAD-fmk a bajas dosis debe ser objeto de estudios que ahonden en mayor profundidad, puesto que una posible razón es que al inhibir las caspasas, concretamente la caspasa -8, se esté activando la necroptosis como se ha visto en artículos publicados anteriormente (Fritsch et al., 2019; Groborz et al., 2020; Metzsig et al., 2016; J. E. Morgan et al., 2018).

A continuación, una vez establecido el efecto de ixazomib se estudió la acción de los miméticos BH3 como tratamiento único o en combinación con el IP. Los resultados se recogen en la **Figura 4.54**.

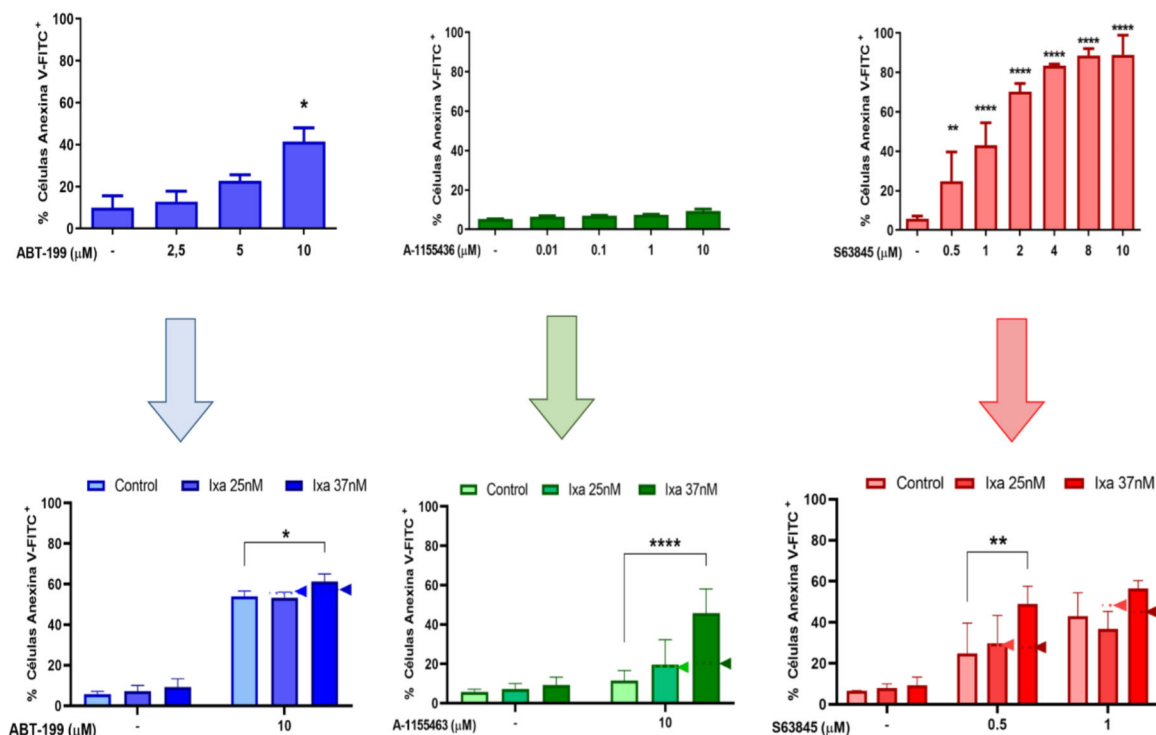


Figura 4.54. Sensibilidad de las células MOPC315.BM a miméticos BH3 (parte superior) y efecto de los mismos sobre la sensibilidad a ixazomib (parte inferior). Se sembraron 2×10^5 células por condición de tratamiento durante 24 h con dosis crecientes de cada mimético en la parte superior de la gráfica y con una dosis de cada uno con 2 dosis (25 nM y 37 nM) de ixazomib parte inferior de la imagen. Posteriormente se marcaron para un análisis mediante citometría de flujo con Anexina V-FITC. Los resultados son la media \pm SD de $n=3$ en todos los casos y su análisis estadístico mediante *t-test* no apareado respecto la situación sin ixazomib con ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$. El análisis estadístico se realizó mediante *two-ANOVA* con posprueba de Tukey donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

Ante el tratamiento con miméticos BH3, la línea MOPC315.BM presenta sensibilidad al inhibidor de BCL-2, ABT-199. La inducción de apoptosis por parte de este mimético incrementa al aumentar la dosis del fármaco llegando a alcanzar más del 40% de muerte celular con una concentración 10 μ M. En cambio, estas células muestran poca sensibilidad a la inhibición de BCL-X_L, incluso a 10 μ M. La mayor sensibilidad a miméticos BH3 en la línea MOPC315.BM es provocada por la inhibición de MCL-1, por el inhibidor específico S63845.

Por otro lado, cuando se combina ABT-199 junto a ixazomib no se potencia el efecto que induce el mimético BH3 por sí solo. En líneas de mieloma humanas (**Apartado 4.3**) la combinación de ABT-199 e ixazomib únicamente presentó sinergia en U266 (**Figura 4.21**).

Sin embargo, al adicionar ixazomib junto con A-1155463 en el tratamiento durante 24 h se produce una sinergia aumentando la muerte de manera significativa con la mayor dosis de ixazomib empleada (37 nM) que por sí sola no induce apoptosis. Esta combinación en líneas de mieloma múltiple humanas también genera buenos resultados (Figura 4.22). Y, por último, la sensibilidad observada por el mimético BH3 S63845 aumenta de manera significativa cuando se adiciona como tratamiento al ixazomib a la dosis de 37 nM. Anteriormente hemos observado que esta combinación es la más eficaz en células de mieloma múltiple humano (Figura 4.23).

La línea MOPC315.BM responde mejor a la combinación de A-1155463 e ixazomib o al tratamiento con el inhibidor MCL-1 sólo o con el IP, por lo que se decidió analizar el efecto de combinar ambos miméticos (Figura 4.55).

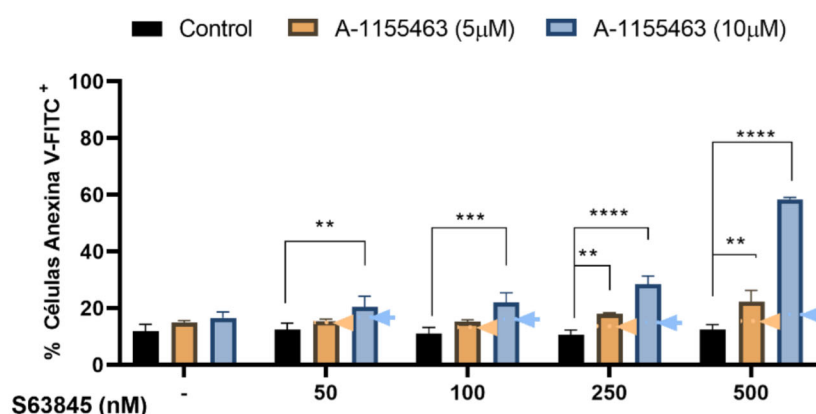


Figura 4.55. Combinación de A-1155463 y S63845 en la línea MOPC315.BM de mieloma múltiple de ratón. Se sembraron 3×10^5 células por condición de tratamiento durante 24 h con dosis crecientes de S63845 y 5 µM o 10 µM de A-1155463. Posteriormente se marcaron para un análisis mediante citometría de flujo con Anexina V-FITC. Las flechas indican el efecto tóxico aditivo de los fármacos juntos. Los resultados son la media \pm SD de $n=2$ en todos los casos y su análisis estadístico mediante *two-ANOVA* con posprueba de Dunnett donde ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$.

La mayor inducción de apoptosis se obtiene con la combinación de 10 µM de A-1155463 junto a 0,5 µM de S63845 superando el 60% de muerte celular.

4.5.2. Combinación de miméticos BH3 con el inhibidor de proteasoma ixazomib como tratamiento en modelo ortotópico de mieloma.

El ensayo realizado en las muestras *ex vivo* ha demostrado que la combinación de A-1155463 junto a ixazomib es la más efectiva seguida por la combinación con el inhibidor de MCL-1 (S63845). Basándonos en estos resultados se utilizó un modelo de mieloma *in vivo* para ver el resultado de estas combinaciones.

Como observamos en la **Figura 4.56A** el crecimiento del tumor es similar en todos los grupos de tratamiento hasta aproximadamente una semana posterior al inicio del suministro de los fármacos, sobre todo en los grupos que tienen como tratamiento uno de los miméticos BH3 solo o en combinación con el inhibidor de proteasoma. El grupo tratado con ixazomib solo y el grupo tratado con el mimético S63845 e ixazomib muestran un crecimiento menor del tumor sobre todo a los 42 días. En artículos ya publicados se demuestra que ixazomib reduce el crecimiento del tumor en ratones (Chauhan, Tian, Zou, et al., 2011; Liu et al., 2018; Richardson et al., 2015).

Inicialmente se observó una mayor supervivencia en el grupo tratado con A-1155463, pero a partir del día 42 la mortalidad en este grupo igualó a la de los otros grupos (**Figura 4.56B**). Esto puede ser debido a que el tratamiento se inició cuando el desarrollo tumoral ya estaba avanzado, a que la administración de las dosis seleccionadas pueda estar resultando tóxicas o que las dosis seleccionadas fueran insuficientes, ya que se escogieron dosis bajas para estudiar la posible sinergia entre los fármacos.

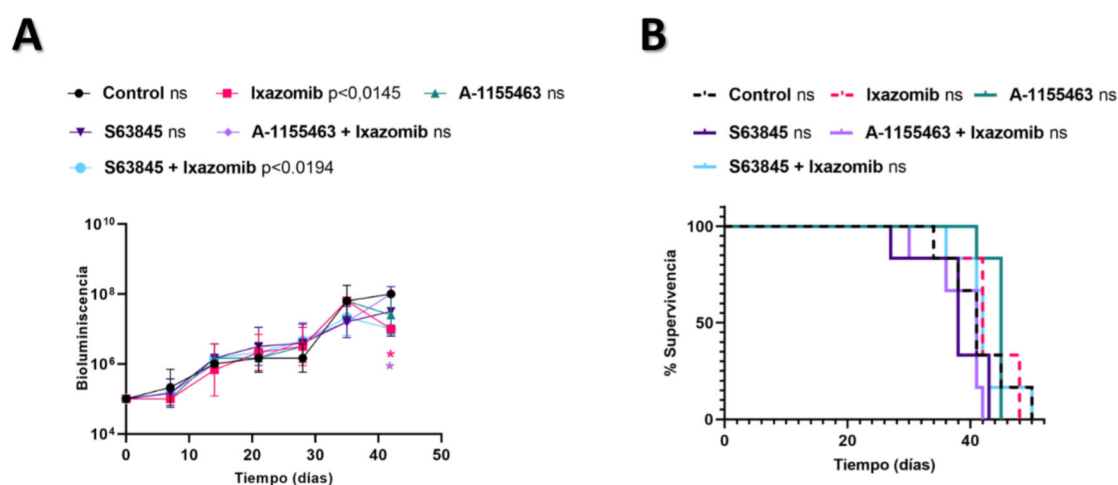


Figura 4.56. Modelo ortotópico de mieloma múltiple y su tratamiento con ixazomib y miméticos BH3. Distribución de 6 individuos correspondientes a un experimento en 6 grupos: control, tratados con ixazomib (7 mg/Kg), tratados con A-1155463 (7 mg/Kg), tratados con S63845 (7,5 mg/Kg), tratados con A-1155463 (7 mg/Kg) e ixazomib (7 mg/Kg) y, por último, tratados con S63845 (7,5 mg/Kg) e ixazomib (7 mg/Kg). **(A)** Análisis del desarrollo del tumor mediante la medición de la bioluminiscencia al inyectar luciferina en los ratones. Análisis estadístico mediante *two-ANOVA* con posprueba de Dunnett donde ** $p < 0,05$. **(B)** Curva de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento con $n=6$ individuos por cada uno de ellos. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba de Mantel-Cox (Log-rank), ningún grupo significativo (ns).

4.5.3. Vacunación con células de ratón pretratadas con inhibidores de proteasoma en modelo ortotópico.

Ante los resultados de inmunogenicidad obtenidos en el **apartado 4.3.**, donde se induce la exposición de calreticulina ante el tratamiento con ixazomib solo o en combinación con los miméticos BH3, y los antecedentes descritos en el trabajo de Ahmed & Tait, 2020 donde se demuestra que la inyección subcutánea de células tumorales moribundas sometidas a ICD provoca efectos contra el cáncer *in vivo*, se evaluó si la muerte inducida por ixazomib resulta inmunogénica en un modelo ortotópico murino (**Figura 4.57**). Para ello, a los ratones BALB/c se les inyectaron subcutáneamente células tumorales tratadas con ixazomib y Z-VAD-fmk o carfilzomib y Z-VAD-fmk con una muerte celular superior al 90%. Se realizaron dos vacunaciones separadas por una semana cada una de ellas. Tras una semana se inyectaron por vía intravenosa las células MOPC315.BM-Luc2-ZsGreen para generar y seguir el desarrollo tumoral del mieloma. Además, a un grupo de animales sin vacunar y a otro grupo de vacunados con células tratadas con carfilzomib y Z-VAD-fmk se les inyectó 2 veces por semana 100 µg de un anticuerpo αPD1.

Los resultados obtenidos indican que una vacunación previa con células de mieloma tratadas con inhibidores de proteasoma (carfilzomib o ixazomib) en combinación con un inhibidor de caspasas (Z-VAD-fmk) no retrasa el desarrollo de mieloma en este modelo ni aumenta la supervivencia. Las curvas de supervivencia de los grupos carfilzomib + Z-VAD-fmk y los tratados sólo con αPD1 corrieron casi en paralelo con el grupo control. Cabe destacar la toxicidad del grupo que fue vacunado con células de MM tratadas con ixazomib + Z-VAD-fmk, siendo el primero en presentar bajas, aunque finalmente los últimos individuos fueron sacrificados casi al mismo tiempo que en el grupo control. Aunque como se muestra en la **Figura 4.57** el grupo vacunado con células de mieloma tratadas con carfilzomib + Z-VAD-fmk y posteriormente tratado con αPD1 mostró una tendencia de crecimiento tumoral retardado en mitad del experimento, finalmente los ratones fueron sacrificados unos días antes que el grupo control. En general, las pequeñas diferencias observadas entre los diferentes grupos resultaron no significativas estadísticamente.

A su vez se ha estudiado la expresión de células implicadas en la respuesta inmune como son linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, células NKs y el porcentaje de células de mieloma inducido en el bazo, médula ósea y tumores extramedulares generados en cada

animal. Como se observa en la **Figura 4.57** los porcentajes de células en cada órgano y grupo de tratamiento presentan una alta variabilidad. En la médula ósea el grupo vacunado con células tratadas con ixazomib en combinación con Z-VAD-fmk el porcentaje de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, NKs y mieloma es menor que en el resto de grupos del ensayo, seguido del grupo vacunado con carfilzomib + Z-VAD-fmk y posteriormente tratado con α PD1. Los grupos control, control con posterior tratamiento con α PD1 y el grupo vacunado con carfilzomib y Z-VAD-fmk presentan una expresión superior a los dos grupos anteriores y entre ellos similares de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, NKs y mieloma.

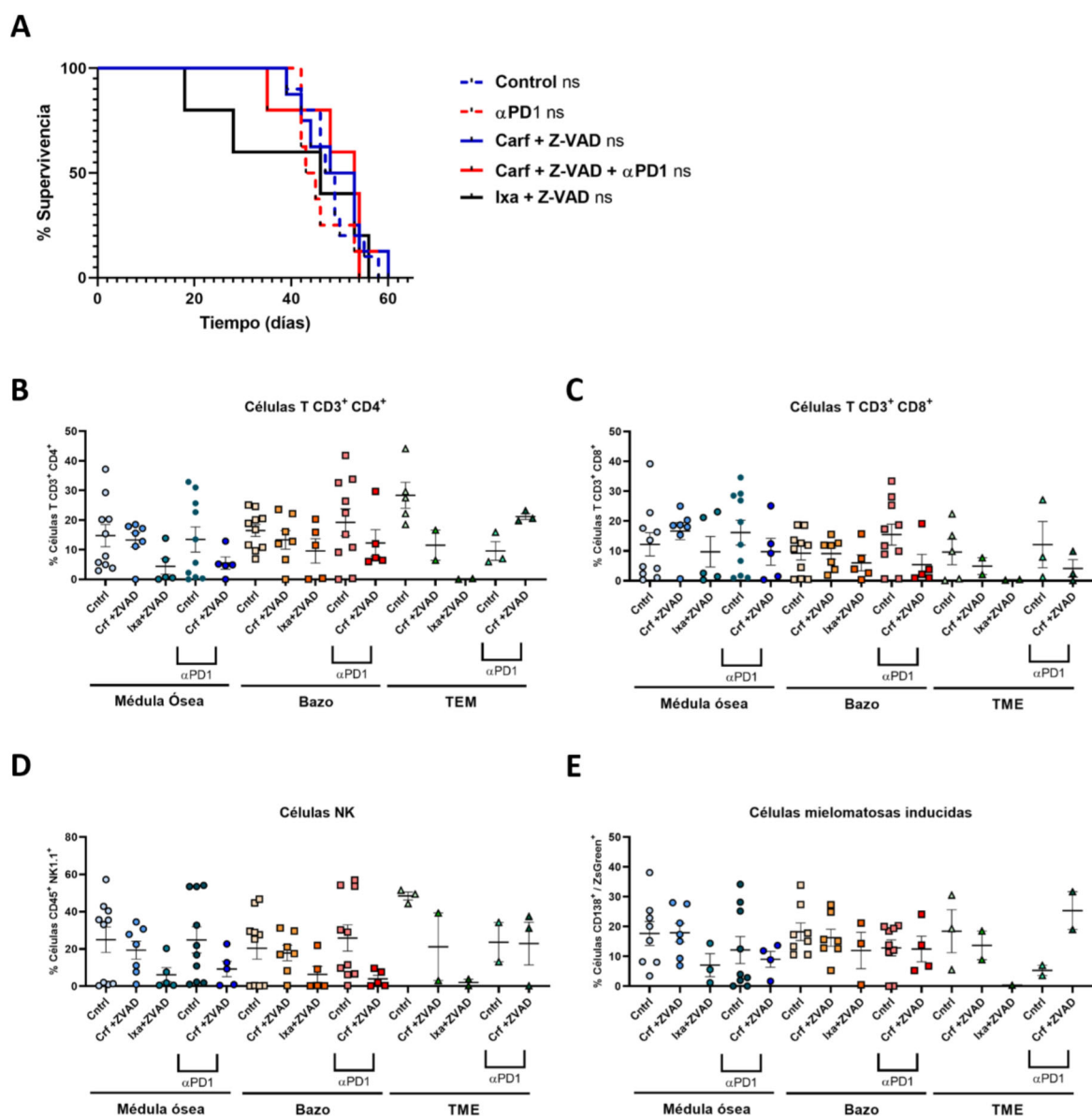


Figura 4.57. Modelo ortotópico de vacunación con células de mieloma tratadas con inhibidores de proteasoma. Distribución de individuos $n=5$ de dos experimentos independientes en 5 grupos: control, control con α PD1, vacunación con células tratadas con carfilzomib y Z-VAD-fmk, vacunación con células tratadas con carfilzomib, Z-VAD-fmk y α PD1; y, por último, vacunación con células tratadas con ixazomib y Z-VAD-fmk. **(A)** Curva de supervivencia de los diferentes grupos de tratamiento con $n=5$ individuos por cada uno de ellos. **(B)** Cantidad de linfocitos T $CD4^+$ presentes en bazo, médula ósea y tumores extramedulares de los diferentes individuos y grupos. **(C)** Cantidad de linfocitos T $CD8^+$ presentes en bazo, médula ósea y tumores extramedulares de los diferentes individuos y grupos. **(D)** Cantidad de células NK presentes en bazo, médula ósea y tumores extramedulares de los diferentes individuos y grupos. **(E)** Cantidad de células mielomatosas inducidas presentes en bazo, médula ósea y tumores extramedulares de los diferentes individuos y grupos. Análisis estadístico de las partes B, C, D y E mediante *one-way* ANOVA y posterior análisis de Tukey donde las diferencias observadas no son estadísticamente significativas en ningún caso.

En el bazo, resalta la expresión de linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$ y NKs en el grupo sin vacunar, pero con posterior tratamiento con α PD1, siendo superior al resto de grupos. El grupo vacunado con ixazomib y Z-VAD-fmk presenta los porcentajes más bajos de dichas células. A pesar de que ixazomib induce la expresión de CRT en células de mieloma múltiple de manera que se correlaciona con la inmunogenicidad de dichas células, la presencia de este DAMP por sí solo no es suficiente para provocar respuestas inmunes contra el cáncer (Fucikova et al., 2016). Algunos estudios han demostrado que se necesita más de un DAMP para activar la respuesta inmunitaria, entre ellos ATP, HMGB1, $IFN\alpha$, IL-1 y IL-6 por tanto puede que ixazomib no esté provocando ninguna secreción de estos DAMPs y por ello no se esté dando una activación de la respuesta inmunitaria adecuada (Ahmed & Tait, 2020; Galluzzi et al., 2017). El resto de grupos tienen una expresión similar entre ellos e intermedia entre los 2 grupos anteriores. En cuanto al porcentaje de células de mieloma es similar en todos los grupos.

Por otro lado, se han generado más tumores extramedulares en el grupo control. Este grupo tiene los porcentajes más altos de infiltración de linfocitos T $CD4^+$ y células NKs en los tumores extramedulares. Seguido del grupo vacunado con células tratadas con carfilzomib y Z-VAD-fmk. El grupo que mayor número de células mielomatosas presenta en los tumores extramedulares es el grupo vacunado con células tratadas con carfilzomib y Z-VAD-fmk y posteriormente tratado con α PD1. El grupo vacunado con células tratadas con ixazomib y Z-VAD-fmk posee el menor porcentaje de linfocitos T $CD4^+$, $CD8^+$, NKs y células de mieloma infiltradas en los tumores extramedulares.

La inhibición de caspasas puede conllevar a la activación de mecanismos alternativos como puede ser la autofagia o la necroptosis, y por tanto promover la supervivencia celular. Aunque las células inyectadas presentaban más de un 97% de

mortalidad, la fracción celular residual viva puede ser capaz mediante dichos mecanismos de sobrevivir y reproducirse estableciendo el tumor en el individuo de manera subcutánea, antes de inyectar por intravenosa las células MOPC315.BM vivas para la generación del modelo ortotópico. En el trabajo del Dr. Alfonso Serrano, se observó que el tratamiento previo de las células con el inhibidor de proteasoma carfilzomib en combinación con Z-VAD-fmk y el inhibidor de autofagia CLQ promovía una ligera protección y retraso en el crecimiento tumoral, además de demostrar que la necroptosis no es un mecanismo principal de muerte cuando se inhibe la acción de caspasas (Serrano del Valle, 2020). Por tanto, habría sido una buena idea añadir un inhibidor de autofagia en el modelo estudiado en este trabajo. Además, el inhibir caspasas favorece la integridad celular y los DAMPs celulares al retrasar la muerte celular *in vitro*, favoreciendo que mueran *in vivo* y así generar mayor respuesta inmunitaria. Esta información contrarresta lo observado en nuestro modelo ortotópico, lo que puede ser debido a los ajustes de protocolo que se realizaron después del modelo de vacunación establecido por el Dr. Alfonso Serrano. Al aumentar la dosis de fármacos inhibidores de proteasoma en las células puede que conlleve a que la fracción de células vivas realicen una necrosis secundaria *in vitro* impidiendo su muerte *in vivo* y perdiendo todas estas señales y por tanto el potencial inmunogénico de la vacuna (Serrano del Valle, 2020).

Por otro lado, existen varios estudios que han demostrado que la vacunación con células cancerosas moribundas aumenta la infiltración de células T y NK en el microambiente tumoral (Kepp et al., 2011; Martins et al., 2012; Michaud et al., 2011). En nuestro modelo solo algunos grupos muestran un incremento débil de dichas células en el microambiente del tumor, por tanto, es posible que la respuesta que se está dando es más de tolerancia que inmunogénica.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que una vacunación previa con células tratadas con inhibidores de proteasoma de segunda generación y Z-VAD-fmk no resulta en un beneficio significativo, ni en supervivencia, ni activando al sistema inmunitario previamente para combatir el desarrollo del cáncer de mieloma.



DISCUSIÓN GENERAL

El mieloma múltiple es un cáncer hematológico que representa el 10% de las neoplasias sanguíneas y el 1% de todos los tumores, además de ser incurable. Se caracteriza por la proliferación descontrolada de células B plasmáticas que se acumulan en la médula ósea. Las interacciones de estas células malignas con el microambiente de la médula ósea determinan la progresión del mieloma en los diferentes estadios de la enfermedad.

Las células malignas de mieloma múltiple son grandes productoras de inmunoglobulinas, por lo que precisan de un buen funcionamiento del proteasoma para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas, y, por tanto, evitar así la apoptosis. Por este motivo se han desarrollado fármacos inhibidores del proteasoma para tratar de combatir esta enfermedad.

En general los inhibidores de proteasoma se unen a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma 26S impidiendo así la acción quimiotripsina y su correcto funcionamiento. El primer inhibidor de proteasoma aprobado para la clínica fue bortezomib, quien se une de manera reversible al proteasoma y muestra un efecto antitumoral eficaz, pero presenta resistencias (Chen et al., 2011). Posteriormente, se ha desarrollado y empleado en clínica el carfilzomib. Este inhibidor de proteasoma difiere de bortezomib en que su unión al proteasoma es de manera irreversible, pero también genera resistencias (Parlati et al., 2009). Por último, se ha desarrollado ixazomib, sobre el que se ha centrado este trabajo. Ixazomib se une, al igual que bortezomib, de manera reversible al proteasoma, además, es el primer IP que se administra por vía oral (Muz et al., 2016).

Estudiar los mecanismos moleculares de muerte celular desencadenados por la quimioterapia ayuda a entender las bases moleculares sobre las que actúa y a localizar posibles dianas para evitar recidivas o solventarlas. Por tanto, todo el desarrollo de esta tesis ha versado sobre el estudio del inhibidor de proteasoma ixazomib. El objetivo principal ha sido caracterizar el mecanismo por el que induce muerte celular, y su posible empleo como tratamiento en combinación con miméticos BH3.

Nuestros resultados han evidenciado en mayor o menor medida la sensibilidad de diferentes líneas celulares de mieloma a ixazomib en función de las alteraciones genéticas que presentan, como defendieron con anterioridad en otros estudios (Chauhan, Tian, Zhou, et al., 2011; Manier et al., 2017). Además, han corroborado la inducción de apoptosis por parte de ixazomib en todas las células de mieloma puesto que exponen

fosfatidilserina, depende de las caspasas para desencadenar el proceso de muerte celular y presentan caída del potencial mitocondrial. Los resultados de este trabajo muestran la resistencia a ixazomib por parte de células tratadas previamente con bortezomib, contraindicando el empleo de ixazomib en recidivas al tratamiento con bortezomib en mieloma múltiple. Este último resultado contrasta con el estudio de Chauhan *et al.* 2011 donde demuestran como ixazomib induce apoptosis en células de MM resistentes a terapias convencionales o a bortezomib. Es más lógico que aquellas células resistentes a bortezomib resistan a la acción de ixazomib, puesto que ambos compuestos presentan similitud en el modo de unión a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma; en cambio, si se tratan con carfilzomib que se une de manera irreversible si se vea un efecto tóxico. Por tanto, los resultados mostrados en el estudio de Chauhan *et al.* 2011 no coinciden con lo observado.

Esta tesis no solo ha corroborado la inducción de apoptosis por parte de ixazomib, sino también aporta datos acerca del mecanismo por el que se induce dicha apoptosis. Los resultados muestran que ixazomib desencadena la activación de caspasas, y, por tanto, una apoptosis dependiente de las proteínas de la familia BCL-2 (BAX y BAK). Es decir, ixazomib induce apoptosis a través de la vía intrínseca, provocando un cambio conformacional en BAK y BAX. Este mecanismo había sido descrito con anterioridad para otros inhibidores de proteasoma revelando un signo de identidad para este tipo de fármacos (Muz *et al.*, 2016; Tundo *et al.*, 2020). Pero, este trabajo ha demostrado también la capacidad de ixazomib de inducir muerte apoptótica independiente de la activación de BAK y BAX, por lo que ha abierto la posibilidad de que ixazomib también induzca apoptosis extrínseca. Los resultados han demostrado el papel de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por ixazomib, otorgando validez a la teoría expuesta por Hellwig *et al.* 2021 para bortezomib. Esta teoría se basa en la activación de los receptores de muerte (DR4 o DR5) por la acumulación de proteínas mal plegadas favoreciendo la formación del complejo DR5-caspasa-8, resultando en la activación de caspasa-8 quien activa a caspasa-3 o tBID. Sólo con los resultados obtenidos no es suficiente para determinar si esta hipótesis es válida, convendría indagar más en este aspecto con otros estudios independientes a esta tesis.

La resistencia a la apoptosis es un *hallmark* del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). La supervivencia celular es un equilibrio entre señales de supervivencia y de muerte. Las células tumorales, para sobrevivir a las señales de muerte sobreexpresan

proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 (Letai, 2008). Las proteínas de la familia BCL-2 son clave para la regulación de la vía intrínseca de muerte celular apoptótica siendo fundamental su balance para determinar la muerte (proteínas pro-apoptóticas) o supervivencia de las células (proteínas anti-apoptóticas). Como se observa en la **Figura 5.1**, cuando se activa la vía intrínseca se producen cambios en la red de interacciones de la familia BCL-2 que llevan a la activación de BAK y BAX, y, por tanto, a la permeabilización de la membrana mitocondrial.

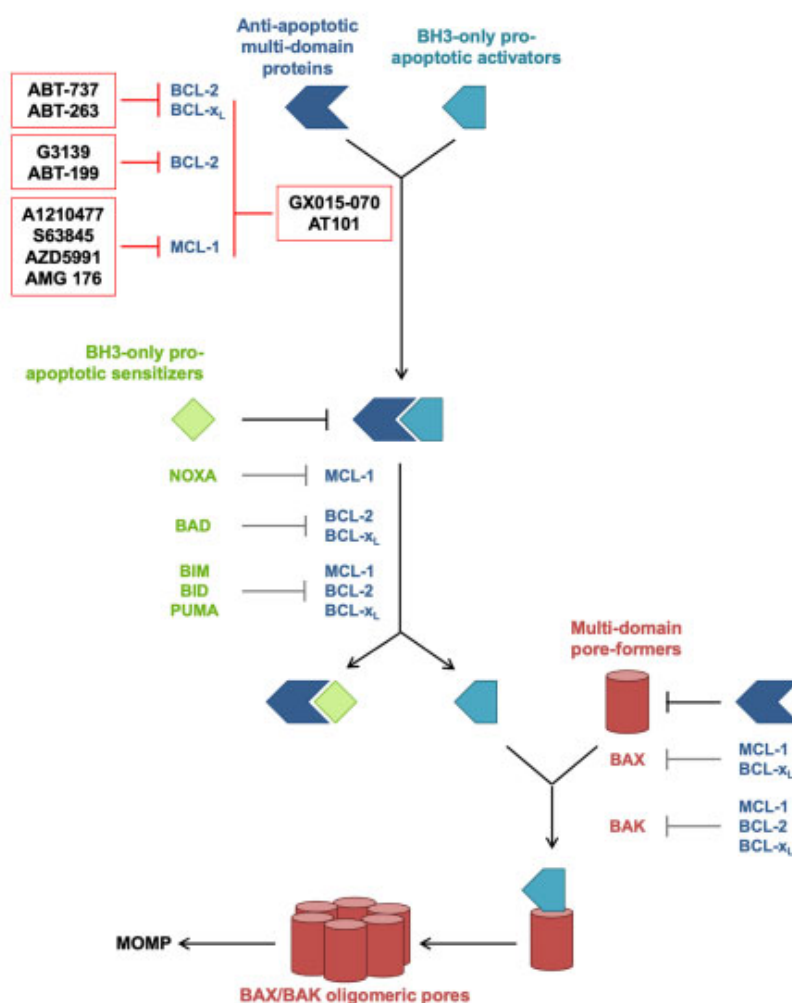


Figura 5.1. Interacciones entre las proteínas de la familia BCL-2 en la permeabilización de la membrana mitocondrial. La interacción dinámica entre los miembros de la familia BCL-2 pro-apoptóticos y anti-apoptóticos está influenciada por sus afinidades de unión y abundancias relativas, así como por el tratamiento con inhibidores de moléculas pequeñas. Imagen tomada de *Lernoux, Schnekenburger, Dicato, & Diederich, 2021*.

Como se ha indicado con anterioridad, la apoptosis provocada por ixazomib depende en parte de las proteínas BAK y BAX de la familia BCL-2. El tratamiento con

ixazomib determina un aumento de las proteínas pro-apoptóticas (principalmente NOXA y PUMA, seguidas de BIM) y, en menor medida y según la línea celular, de las proteínas anti-apoptóticas (sobre todo MCL-1). De acuerdo a los datos publicados sobre su mecanismo de acción, NOXA contribuiría a la neutralización o inhibición de MCL-1, disociando el complejo MCL-1-BIM, permitiendo así la acción de BIM sobre BAX y BAK para su activación, y la permeabilización mitocondrial. Este comportamiento parece ser similar al observado con el inhibidor de proteasoma bortezomib en el estudio de Gomez-Bougie *et al.* 2007. Nuestros resultados muestran como la ausencia de BIM favorece cambios en el comportamiento de las células al efecto citotóxico de ixazomib, volviéndolas menos sensibles. Estas evidencias justifican el papel de BIM en la muerte inducida por los inhibidores de proteasoma.

Además, se ha observado también este cambio de sensibilidad ante ixazomib, en líneas celulares de mieloma con sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas BCL-X_L y MCL-1. Por tanto, cualquier cambio en las proteínas de la familia BCL-2 podría implicar cambios en la sensibilidad ante ixazomib.

En la actualidad, todos los inhibidores de proteasoma a pesar de ser muy eficaces han terminado generando resistencias, por lo que es necesario buscar estrategias para mejorar la efectividad de estos inhibidores, por ejemplo, mediante la combinación con otros fármacos. Dado que la vía intrínseca se activa por inhibidores de proteasoma, la combinación con miméticos BH3 que bloqueen a las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 podría ser una aproximación útil. A día de hoy, existen diferentes ensayos clínicos en los que combinan un mimético BH3 con inhibidores de proteasoma o administran el mimético BH3 en aquellos pacientes con recidivas, cuyo primer tratamiento ha sido con inhibidores de proteasoma. Entre ellos destaca la combinación de carfilzomib con dexametasona y ABT-199 el cual está en fase de reclutamiento (Abuelgasim *et al.*, 2020). También se han visto buenos resultados al combinar ABT-199 con bortezomib (Bahlis *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2020). Es interesante estudiar *in vitro* la posible sinergia y los factores que determinan la respuesta ante la combinación de miméticos BH3 e IPs.

Nuestros resultados muestran una mejora en el tratamiento de células de mieloma cuando además de tratarlas con ixazomib se combina con un mimético BH3, pero la respuesta depende de la línea celular y su dependencia hacia las proteínas anti-

apoptóticas. Antes de los resultados obtenidos, se esperaba que la inhibición de MCL-1 potenciara el efecto citotóxico de ixazomib, puesto que MCL-1 parece ser el eje principal en la gran mayoría de mielomas múltiples para la supervivencia (Derenne et al., 2002; Gong et al., 2016; Zhang et al., 2002), pero solo ha potenciado la muerte celular en las líneas NCI-H929 y RPMI8226 (**Figura 4.23**) a pesar de demostrarse que S63845 es eficaz en líneas con traslocaciones t(11;14), t(4;14) o con mutaciones en p53 (Kotschy et al., 2016). En cambio, si apoyan el efecto de venetoclax en aquellos mielomas que presentan la traslocación t(11;14), como es la línea U266, donde la inhibición de BCL-2 aumenta la muerte celular causada por el IP de manera muy significativa (**Figura 4.21**). Por otra parte, la combinación con mejores resultados ha sido la inhibición de BCL-X_L junto al tratamiento con ixazomib (**Figura 5.**).

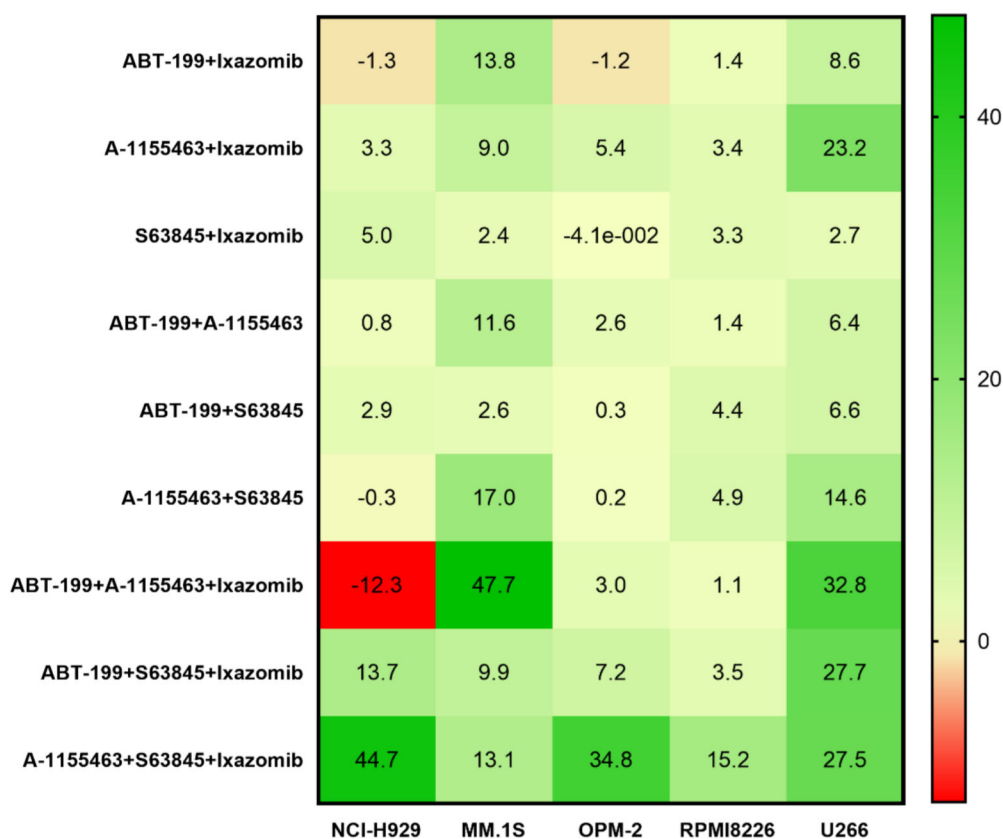


Figura 5.2. Resumen sensibilidad de las líneas de MM a miméticos BH3, inhibidores de proteasoma y combinaciones de ambos a 24 h. Según los índices de Bliss calculados, a mayor intensidad de color rojo mayor resistencia y a mayor intensidad de verde mayor sensibilidad.

La inhibición de BCL-X_L potencie el efecto de ixazomib sorprende, puesto que en trabajos anteriores, se ha demostrado que los cánceres hematopoyéticos como leucemias

y mielomas tienden a sobreexpresar las proteínas BCL-2 y MCL-1 (Anstee et al., 2019; Reed, 2008). Con los resultados obtenidos en esta tesis se demuestra que BCL-X_L podría tener un papel importante en la supervivencia en el mieloma que se desconoce. El mayor inconveniente que deriva de este resultado, es que en la actualidad no se dispone de inhibidores de BCL-X_L en desarrollo debido a que la inhibición de esta proteína conlleva como efecto secundario una trombocitopenia, como se vio con navitoclax o ABT-737. Aunque hay que destacar el inhibidor A-1155463, a pesar de que genera trombocitopenia, este efecto secundario es reversible (Tao et al., 2014), por lo que no se puede descartar que tal vez en algunos casos, el tratamiento con este fármaco podría ser una alternativa, siempre y cuando se realizase un correcto control de este efecto secundario.

Las sinergias observadas en las líneas de mieloma establecidas con el tratamiento conjunto de miméticos BH3 e ixazomib no parecen extrapolarse a muestras *ex vivo* de pacientes. A diferencia de las sinergias observadas en líneas establecidas, en las muestras *ex vivo* solo alcanzamos un efecto aditivo. Además, mientras que en las líneas establecidas parecía tener un papel importante la proteína BCL-X_L favoreciendo la muerte celular con la inhibición dual de dicha proteína y MCL-1, en muestras *ex vivo* cobra importancia la proteína MCL-1 seguida de BCL-2. Esta diferencia puede ser debida a diferentes factores como la presencia de alteraciones genéticas o el microambiente de la médula ósea que permite un intercambio de mayor información que un cultivo *in vitro* (Hideshima et al., 2007).

Además, existen diferentes alteraciones que han demostrado en estudios anteriores que predisponen con mayor sensibilidad a determinados inhibidores de proteínas anti-apoptóticas. Por ejemplo, la traslocación t(11;14) determina una mayor sensibilidad a la inhibición de BCL-2 (Premkumar et al., 2021), o la amplificación 1q21 (donde se localiza MCL-1) sensibiliza al tratamiento con S63845 (Slomp et al., 2019). Los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que la traslocación t(11;14) predispone a una mayor sensibilidad a la inhibición de BCL-2 como hemos observado tanto en la línea U266 como en las muestras *ex vivo* (nº2 al nº4, **Tabla 4.7**) de pacientes.

En muestras *ex vivo* que presentaban la amplificación 1q21, resultaron en pacientes sensibles al tratamiento con el inhibidor de MCL-1, a excepción de una muestra con dicha alteración genética que resultó ser resistente. El paciente resistente con esta alteración puede ser que no responda al tratamiento con el inhibidor de MCL-1 porque a

pesar de tener sobre expresada dicha proteína, puede depender de BCL-2 o BCL-X_L, de hecho, es resistente al tratamiento con cualquiera de los miméticos BH3 (**Figura 4.39**). Esta última muestra, correlaciona al no ser tan sensible al inhibidor de MCL-1 con lo visto en la línea establecida MM.1S. La línea MM.1S también presenta la amplificación 1q21, por lo que se espera sobreexpresarse la proteína MCL-1 y sea sensible a la inhibición de dicha proteína por parte del fármaco S63845, pero en esta tesis se ha observado que el tratamiento con S63845 no ha sido tan efectivo como con cualquiera de los miméticos BH3 que inhibe a BCL-2 o BCL-X_L (**Figuras 21 -23**), además de la dependencia de MM.1S de la proteína BCL-X_L más que MCL-1 (**Figura 4.7**). Por tanto, la amplificación 1q21 si correlaciona con la respuesta al mimético BH3, pero existen excepciones.

Por otra parte, en estudios *in vivo* en un modelo murino ortotópico de mieloma múltiple, tratado con ixazomib sólo o en combinación de los miméticos BH3 (A-1155463 o S63845), la administración conjunta de ixazomib con inhibidores de BCL-X_L y MCL-1 no presenta diferencias con el grupo control. Este resultado no concuerda con todos los datos observados en líneas celulares y en células de pacientes *ex vivo*, aunque puede ser debido a las dificultades que surgieron durante el desarrollo del ensayo *in vivo*. Sería preciso ampliar estos estudios y optimizar las condiciones para poder sacar conclusiones coherentes.

Otra posible estrategia a estudiar podría ser la combinación con fármacos que actúen sobre las vías que regulan la homeostasis celular como la autofagia. Existen trabajos anteriores que demuestran como la inhibición de la autofagia puede potenciar la citotoxicidad de los inhibidores de proteasoma (Baranowska et al., 2016; Jarauta et al., 2016; Kawaguchi et al., 2011). Aunque también pueden mostrar un efecto antagónico (Hoang et al., 2009). Por otra parte, los ensayos clínicos existentes que combinan bortezomib con hidroxiclороquina o cloroquina con bortezomib y ciclofosfamida han obtenido buenos resultados, y han demostrado la viabilidad de esta posible alternativa (Montanari et al., 2014; Vogl et al., 2014).

Las células malignas de mieloma producen proteína M en alta cantidad, por lo que si se inhibe el proteasoma con ixazomib, la acumulación de dichas proteínas mal plegadas desencadena estrés celular. En este punto las células son capaces de activar otras rutas para aliviar el estrés celular, entre ellas, la autofagia. Por tanto, la autofagia puede ser uno de los mecanismos que confiere resistencia a los inhibidores de proteasoma. En este

trabajo se observa que la autofagia no es un mecanismo de resistencia a los inhibidores de proteasoma, puesto que una autofagia deficiente (como en la línea MM.1S shATG5) dota de mayor resistencia a ixazomib. Además, observamos también que el efecto potenciador de la cloroquina en la combinación con el IP parece deberse a un mecanismo independiente de la inhibición de la autofagia.

La inhibición de este mecanismo puede favorecer a su vez el efecto de los inhibidores de proteasoma. Gracias al empleo de diferentes inhibidores de autofagia se ha corroborado que el tratamiento simultaneo con inhibidores del flujo autofágico (como puede ser cloroquina) e inhibidores de ixazomib se potencia la muerte celular en células de mieloma múltiple, mientras que la inhibición de la ATPasa p97, implicada en autofagia, apenas muestra sinergia con ixazomib. Estos resultados muestran la complejidad de la autofagia.

A la hora de dirigir una terapia contra un tumor se puede realizar de diferentes maneras, una de ellas es abarcar diferentes puntos clave de la ruta de la apoptosis, o buscar una activación del sistema inmunitario para generar ICD. La muerte inmunogénica hace referencia a la muerte celular que induce la activación del sistema inmune. Los resultados de este trabajo demuestran la capacidad de ixazomib de inducir la exposición de calreticulina en las células de mieloma. Esta exposición podría aumentar la interacción con los receptores de la superficie de las células DC favoreciendo la fagocitosis de las células apoptóticas, y, por tanto, la eliminación por parte del sistema inmunitario del individuo. Este dato corrobora lo observado con carfilzomib en la tesis realizada con anterioridad en este laboratorio por el Dr. Alfonso Serrano del Valle (Serrano del Valle, 2020). Algunos autores han propuesto que el tratamiento con fármacos que inducen ICD podría tener un efecto activador del sistema inmune frente al desarrollo tumoral, actuando a modo de “vacuna”. Esta idea se ha explorado usando modelos animales de vacunación con células muertas por acción de agentes inductores de ICD, y posterior inducción de tumores mediante inyección subcutánea (Beck et al., 2018). En otros estudios, una vacunación de ratones con células tratadas con taxanos o alcaloides evitaron una exposición tumoral posterior (Senovilla et al., 2013). Por ejemplo, el lentinan favorece la ICD en ratones vacunados evitando la aparición de cáncer de hígado (W. Wang et al., 2021). También se ha visto como una vacunación con paraproteína secretada de mieloma M315 otorgó inmunidad contra una nueva exposición tumoral (Lynch et al., 1972).

En este estudio hemos evaluado el potencial inmunogénico de ixazomib en un modelo ortotópico de mieloma. Tras el estudio de esta hipótesis en animales, sólo la vacunación de los individuos con células de mieloma múltiple muertas, tratadas con IP de segunda generación junto con inhibidores de caspasas y cloroquina, favorece un ligero retraso del crecimiento tumoral. Es decir, la vacunación profiláctica con células de MM tratadas con IP no ofrece una protección inmunitaria considerable contra la exposición de células tumorales de MM. Este resultado podría corroborar la idea de que la ICD por sí sola no es suficiente para revertir completamente el microambiente tumoral inmunosupresor, sino que lo interesante es generar vacunas de células dendríticas (Montico et al., 2018); pero la activación de ICD por parte de vacunas DC se ve reducida si los ROS asociados a las células tumorales y las señales de peligro se bloquean de manera individual o concomitante, además de si el sistema inmunitario adaptativo, concretamente las T CD8⁺, se agotaron (Garg et al., 2016). Este último aspecto puede haber ocurrido en nuestro modelo puesto que administramos una alta cantidad de células tumorales muertas que podría haber conllevado al agotamiento de las células T.

Por otro lado, puede ser debido al microambiente inmunosupresor del tumor, lo cual no ayuda a la activación del sistema inmune. También puede ser debido al modelo en concreto, tanto el modelo de Beck como el nuestro, son diferentes a los modelos en los que se han inducido tumores subcutáneos, además de ser más cercanos al desarrollo tumoral espontáneo. Por tanto, es importante considerar tanto el anfitrión como el microambiente a la hora de considerar la activación de ICD, por ejemplo, el modelo empleado en este trabajo MOPC315.BM afecta a bazo y médula ósea, lo cual puede explicar la baja respuesta inmunitaria observada en los ratones vacunados (Di Rosa & Gebhardt, 2016; Di Rosa & Pabst, 2005).

A pesar de los avances sobre la generación de ICD, aún existen múltiples problemas experimentales que deben mejorarse para el desarrollo de un correcto protocolo de vacunación (Binsfeld et al., 2014; Tatsuno et al., 2021).

Ante los resultados de este trabajo, se aprecia la complejidad que presenta el mieloma múltiple, tanto en alteraciones genéticas, comportamiento ante diferentes tratamientos o mecanismos de supervivencia. Para poder proporcionar un tratamiento eficaz al paciente se requiere de un mayor estudio de todos los aspectos que rodean el

comportamiento celular, incluido el microambiente tumoral, así como un análisis de las proteínas de la familia BCL-2 que predominen.



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Ixazomib induce muerte por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple establecidas NCI-H929, MM.1S, OPM-2, RPMI8226 y U266. Además, dicha apoptosis se realiza por vía intrínseca a través de la activación de caspasas, cuya activación se ve reducida en presencia de Z-VAD-fmk.
2. A dosis bajas, ixazomib genera un aumento de la actividad del proteasoma en la línea OPM-2.
3. Ixazomib no presenta efecto en células resistentes a bortezomib debido a que la naturaleza de los compuestos es muy similar. En cambio, carfilzomib si es capaz de superar la resistencia a bortezomib.
4. Ixazomib aumenta la expresión de las proteínas pro-apoptóticas NOXA, BIM y PUMA, y según la línea, la expresión de MCL-1, BCL-2 o BCL-X_L. Dicho aumento se ve reducido en presencia de un inhibidor de caspasas.
5. El déficit de BIM proporciona protección ante el efecto citotóxico de ixazomib en líneas de mieloma múltiple NCI-H929, MM-1S, OPM-2, RPMI8226 y U266.
6. La ausencia de BAK y BAX protege parcialmente a las células de mieloma frente al efecto citotóxico de ixazomib. Ante la ausencia de dichas proteínas y el bloqueo de la vía intrínseca, ixazomib es capaz de activar la vía extrínseca de la apoptosis como consecuencia del tratamiento mediante la activación de los receptores de muerte (DR4 o DR5) por la acumulación de proteínas mal plegadas.
7. La sobreexpresión de BCL-X_L o MCL-1 reduce considerablemente el efecto tóxico de ixazomib.
8. La inhibición de la autofagia potencia la acción de ixazomib principalmente cuando se inhibe el flujo autofagosómico con la adición de cloroquina más que con fármacos que inhiben la AAA ATPasa p97.
9. La combinación de ABT-199 e ixazomib presenta cierta sinergia en las células MM.1S y U266, mientras que la combinación de S63845 e ixazomib es efectiva en MM.1S, RPMI8226 y U266. Por último, la combinación de A-1155463 e ixazomib tiene buenos resultados en las líneas NCI-H929, MM.1S, OPM-2, RPMI8226 y U266.
10. El tratamiento de las células de mieloma con S63845 implica una acumulación de la proteína MCL-1, además de un aumento de PUMA.

11. La combinación de ABT-199, A-1155463 e ixazomib presenta sinergia en las líneas MM.1S y U266.
12. La combinación de ABT-199, S63845 e ixazomib presenta principalmente sinergia en la línea U266 y NCI-H929, mientras que en el resto de líneas se observa un efecto aditivo. Esta combinación disminuye la expresión tanto de las proteínas anti-apoptóticas (sobre todo MCL-1) como pro-apoptóticas.
13. La combinación de A-1155463, S63845 e ixazomib presenta sinergia en todas las líneas de MM establecidas estudiadas *in vitro*. Esta combinación implica el aumento de la expresión de las proteínas BIM y NOXA, y disminuye la expresión de MCL-1, BCL-2 y PUMA.
14. La ausencia de BIM tiene diferente repercusión en la muerte causada por las combinaciones de ixazomib y miméticos BH3, dependiendo de la línea celular y de los compuestos.
15. Los miméticos BH3 no aumentan el efecto de ixazomib sobre la exposición de la calreticulina.
16. La ausencia de BAX y BAK dificulta la traslocación de CRT a nivel basal y sobre todo ante la acción de la cloroquina.
17. Los resultados obtenidos en las líneas *in vitro* muestran resultados positivos sobre la combinación A-1155463 e ixazomib, mientras que en las muestras *ex vivo* de pacientes de MM los mejores resultados son con ixazomib y ABT-199 o S63845.
18. El tratamiento con ixazomib y miméticos BH3 solos o en combinación no disminuye el desarrollo tumoral, en general, en modelos *in vivo* en las condiciones empleadas en este trabajo.
19. Una vacunación previa con células tratadas con inhibidores de proteasoma de segunda generación (carfilzomib o ixazomib) y Z-VAD-fmk no resulta en un beneficio significativo, ni en supervivencia, ni activando al sistema inmunitario previamente para combatir el desarrollo del mieloma múltiple en un modelo murino de mieloma.



BIBLIOGRAFÍA

1. Abramson, H. N. (2018). The Multiple Myeloma Drug Pipeline — 2018: A Review of Small Molecules and Their Therapeutic Targets. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 18(9), 611–627. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.06.015>
2. Abu-Alfa, A. K., & Younes, A. (2009). Tumor Lysis Syndrome and Acute Kidney Injury: Evaluation, Prevention, and Management. *American Journal of Kidney Diseases*, 55(5), S14–S17. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.03.001>
3. Abuelgasim, K. A., Alherz, N., Alhejazi, A., & Damraj, M. (2020). Venetoclax in combination with carfilzomib and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma harboring t(11,14)(q13;q32): Two case reports and a review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13256-020-02376-y>
4. Adachi, M., & Imai, K. (2002). The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. *Cell Death and Differentiation*, 9(11), 1240–1247. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401097>
5. Adams, J. M., & Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 27–36. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161>
6. Afreen, S., Bohler, S., Müller, A., Demmerath, E. M., Weiss, J. M., Jutzi, J. S., Schachtrup, K., Kunze, M., & Erlacher, M. (2020). BCL-XL expression is essential for human erythropoiesis and engraftment of hematopoietic stem cells. *Cell Death and Disease*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2203-z>
7. Ahmed, A., & Tait, S. W. G. (2020). Targeting immunogenic cell death in cancer. *Molecular Oncology*, 14(12), 2994–3006. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12851>
8. Al-Salama, Z. T., Garnock-Jones, K. P., & Scott, L. J. (2017). Ixazomib: A Review in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Targeted Oncology*, 12(4), 535–542. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0504-7>
9. Alagpulinsa, D. A., Szalat, R. E., Poznansky, M. C., & Shmookler Reis, R. J. (2020). Genomic Instability in Multiple Myeloma. *Trends in Cancer*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.006>
10. Algarín, E. M., Díaz-Tejedor, A., Mogollón, P., Hernández-García, S., Corchete, L. A., San-Segundo, L., Martín-Sánchez, M., González-Méndez, L.,

- Schoumacher, M., Banquet, S., Kraus-Berthier, L., Kloos, I., Derreal, A., Halilovic, E., Maacke, H., Gutiérrez, N. C., Mateos, M. V., Paíno, T., Garayoa, M., & Ocio, E. M. (2020). Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica*, 105(3), E116–E120. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212308>
11. Algarín, E. M., Quwaider, D., Campos-laborie, F. J., Días-Tejedor, A., Mogollón, P., Vuelta, E., Martín-Sánchez, M., San-Segundo, L., González-Méndez, L., Gutierrez, N. C., García-Sanz, R., Paino, T., De Las Rivas, J., Ocio, E. M., & Garayoa, M. (2021). Stroma-Mediated Resistance to S63845 and Venetoclax through MCL-1 and BCL-2 Expression Changes Induced by miR-193b-3p and miR-21-5p Dysregulation in Multiple Myeloma. *Cells*, 10(3), 559.
12. Allen, E. A., & Baehrecke, E. H. (2020). Autophagy in animal development. *Cell Death and Differentiation*, 27(3), 903–918. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0497-0>
13. Allmeroth, K., Horn, M., Kroef, V., Miethe, S., Müller, R. U., & Denzel, M. S. (2021). Bortezomib resistance mutations in PSMB5 determine response to second-generation proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leukemia*, 35(3), 887–892. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0989-4>
14. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81334-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3)
15. Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3(8), 917–921. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002916101/>
16. American Cancer Society. (2021). *Cancer Statics Center*. <https://cancerstatisticscenter.cancer.org>
17. Ando, M., Hoyos, V., Yagy, S., Tao, W., Ramos, C. A., Dotti, G., Brenner, M. K., & Bouchier-Hayes, L. (2014). Bortezomib sensitizes non-small cell lung cancer to mesenchymal stromal cell-delivered inducible caspase-9-mediated cytotoxicity. *Gene Therapy*, 21(9), 472–482. <https://doi.org/10.1038/cgt.2014.53>
18. Andreu Fernández, V. (2015). *Characterizing BCL-2 family protein domains in membranes: Insertion, interaction and apoptotic modulation roles*. Universitat de Valencia.

19. Anstee, N. S., Bilardi, R. A., Ng, A. P., Xu, Z., Robati, M., Vandenberg, C. J., & Cory, S. (2019). Impact of elevated anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 on the development and treatment of MLL-AF9 AML in mice. *Cell Death and Differentiation*, 26(7), 1316–1331. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0209-1>
20. Antignani, A., Sarnovsky, R., & FitzGerald, D. J. (2014). ABT-737 promotes the dislocation of ER luminal proteins to the cytosol, including *Pseudomonas* exotoxin. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(6), 1655–1663. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0998>.
21. Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19(3–4), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.001>
22. Augello, G., Modica, M., Azzolina, A., Puleio, R., Cassata, G., Emma, M. R., Di Sano, C., Cusimano, A., Montalto, G., & Cervello, M. (2018). Preclinical evaluation of antitumor activity of the proteasome inhibitor MLN2238 (ixazomib) in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0195-0>
23. Auner, H. W., Moody, A. M., Ward, T. H., Kraus, M., Milan, E., May, P., Chaidos, A., Driessen, C., Cenci, S., Dazzi, F., Rahemtulla, A., Apperley, J. F., Karadimitris, A., & Dillon, N. (2013). Combined Inhibition of p97 and the Proteasome Causes Lethal Disruption of the Secretory Apparatus in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE*, 8(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074415>
24. Azmi, A. S., Uddin, M. H., & Mohammad, R. M. (2021). The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(3), 152–169. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00442-4>
25. Badros, A. Z., Vij, R., Martin, T., Zonder, J. A., Kunkel, L., Wang, Z., Lee, S., Wong, A. F., & Niesvizky, R. (2013). Carfilzomib in multiple myeloma patients with renal impairment: Pharmacokinetics and safety. *Leukemia*, 27(8), 1707–1714. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.29>
26. Bahlis, N. J., Baz, R., Harrison, S. J., Quach, H., Ho, S.-J., Vangsted, A. J., Plesner, T., Moreau, P., Gibbs, S. D., Coppola, S., Yang, X., Al Masud, A., Ross, J. A., Bueno, O., & Kaufman, J. L. (2021a). Phase I Study of Venetoclax Plus Daratumumab and Dexamethasone, With or Without Bortezomib, in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma With and Without t(11;14).

- Journal of Clinical Oncology*, 39(32), 3602–3612.
<https://doi.org/10.1200/jco.21.00443>
27. Bajpai, R., Sharma, A., Achreja, A., Edgar, C. L., Wei, C., Siddiqua, A. A., Gupta, V. A., Matulis, S. M., McBrayer, S. K., Mittal, A., Rupji, M., Barwick, B. G., Lonial, S., Nooka, A. K., Boise, L. H., Nagrath, D., & Shanmugam, M. (2020). Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15051-z>
28. Balsas Clavería, 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.
29. Balsas, P., Galán-Malo, P., Marzo, I., & Naval, J. (2012). Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM β 5 overexpression and polyploidy. *Leukemia Research*, 36(2), 212–218.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.09.011>
30. Balsas, P., López-Royuela, N., Galán-Malo, P., Anel, A., Marzo, I., & Naval, J. (2009). Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 77(5), 804–812.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.024>
31. Band, M., Joel, A., Hernandez, A., & Avivi, A. (2009). Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *The FASEB Journal*, 23(7), 2327–2335.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-122978>
32. Baou, M., Kohlhaas, S. L., Butterworth, M., Vogler, M., Dinsdale, D., Walewska, R., Majid, A., Eldering, E., Dyer, M. J. S., Cohen, G. M., & Cohen, G. M. (2010). Original Articles Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Hematologica*, 95(9), 1510–1518. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.022368>
33. Baranowska, K., Misund, K., Starheim, K. K., Holien, T., Johansson, I., Darvekar, S., Buene, G., Waage, A., Bjørkøy, G., & Sundan, A. (2016). Hydroxychloroquine potentiates carfilzomib toxicity towards myeloma cells. *Oncotarget*, 7(43), 70845–70856. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12226>
34. Bataille, R., & Harousseau, J.-L. (1997). Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 1657–1664.

-
35. Beck, L. De, Melhaoui, S., Veirman, K. De, Menu, E., Bruyne, E. De, & Vanderkerken, K. (2018). Epigenetic treatment of multiple myeloma mediates tumor intrinsic and extrinsic immunomodulatory effects. *OncolImmunology*, 7(10), 1–13. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1484981>
36. Bedoui, S., Herold, M. J., & Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0270-8>
37. Beltrán Visiedo, M. (2018). *Apoptosis inducida por el inhibidor del proteasoma Ixazomib en células de mieloma humano*. Universidad de Zaragoza.
38. Berdeja, J. G., Gregory, T. K., Faber, E. A., Hart, L. L., Mace, J. R., Arrowsmith, E. R., Flinn, I. W., & Matous, J. V. (2021). A phase I/II study of the combination of panobinostat and carfilzomib in patients with relapsed or relapsed/refractory multiple myeloma: Final analysis of second dose-expansion cohort. *American Journal of Hematology*, 96(4), 428–435. <https://doi.org/10.1002/ajh.26088>
39. Berenson, J. R., Hilger, J. D., Yellin, O., Dichmann, R., Patel-Donnelly, D., Boccia, R. V., Bessudo, A., Stampleman, L., Gravenor, D., Eshaghian, S., Nassir, Y., Swift, R. A., & Vescio, R. A. (2014). Replacement of bortezomib with carfilzomib for multiple myeloma patients progressing from bortezomib combination therapy. *Leukemia*, 28(7), 1529–1536. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.27>
40. Besse, A., Besse, L., Kraus, M., Mendez-Lopez, M., Bader, J., Xin, B. T., de Bruin, G., Maurits, E., Overkleeft, H. S., & Driessen, C. (2019). Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma: Head-to-Head Comparison of Currently Available Proteasome Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 26(3), 340–351.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.11.007>
41. Bhatia, K., Rahman, S., Ali, M., & Raisuddin, S. (2006). In vitro antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. *Redox Report*, 11(6), 273–279. <https://doi.org/10.1179/135100006X155030>
42. Bianchi, G., & Munshi, N. C. (2015). Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*, 125(1), 3049–3058. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-568881>.BLOOD
43. Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., Palladini, G., Giuliani, N., Anderson,

- K. C., Sitia, R., & Cenci, S. (2009). The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*, *113*(13), 3040–3049. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-172734>
44. Bianchi, G., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2017). Perspectives Promising therapies in multiple myeloma. *Blood*, *126*(3), 300–311. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-575365.300>
45. Billard, C. (2013). BH3 mimetics: Status of the field and new developments. *Molecular Cancer Therapeutics*, *12*(9), 1691–1700. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0058>
46. Billen, L. P., Shamas-Din, A., & Andrews, D. W. (2008). Bid: A Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, *27*, S93–S104. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.47>
47. Binsfeld, M., Fostier, K., Muller, J., Baron, F., Schots, R., Beguin, Y., Heussyuan, R., & Caers, J. (2014). Cellular immunotherapy in multiple myeloma: Lessons from preclinical models. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1846*(2), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.001>
48. Blalock, W. L., Weinstein-Opppenheimer, C., Chang, F., Hoyle, P. E., Wang, X. Y., Algate, P. A., Franklin, R. A., Oberhaus, S. M., Steelman, L. S., & McCubrey, J. A. (1999). Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: Possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia*, *13*(8), 1109–1166. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401493>
49. Blimark, C., Holmberg, E., Mellqvist, U., Landgren, O., Björkholm, M., Hultcrantz, M., Kjellander, C., Turesson, I., & Kristinsson, S. Y. (2015). *Plasma Cell Disorders Articles Multiple myeloma and infections : a population-based study on 9253 multiple myeloma patients*. *100*(1), 107–113. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.107714>
50. Bliss, C. I. (1939). The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Annals of Applied Biology*, *26*(3), 585–615. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>
51. Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., & Sperandio, S. (2003). A Unified Model for Apical Caspase Activation the cellular effects that distinguish apoptosis from other. *Molecular Cell*, *11*, 529–541.
52. Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(6), 725–731.

- <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.009>
53. Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., & Kroemer, G. (2005). Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 1025–1040. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.3.1025-1040.2005>
 54. Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50), 6434–6451. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>
 55. Bruns, I., Cadeddu, R., Brueckmann, I., Fröbel, J., Geyh, S., Fischer, J. C., Roels, F., Wilk, C. M., Schildberg, F. A., Zilkens, C., Jäger, M., Steidl, U., Zohren, F., Fenk, R., Kobbe, G., Brors, B., Czibere, A., Schroeder, T., Trumpp, A., & Haas, R. (2012). *Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells*. 120(13), 2620–2630. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347484>
 56. Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2005). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (J. E. Davies (ed.); 11th ed., pp. 1322–1332). New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division.
 57. Campbell, K. J., & Tait, S. W. G. (2018). *Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. figure 1*, 1–11.
 58. Cang, S., Iragavarapu, C., Savooji, J., Song, Y., & Liu, D. (2015). ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *Journal of Hematology and Oncology*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0224-3>
 59. Cao, B., Li, J., Zhou, X., Juan, J., Han, K., Zhang, Z., Kong, Y., Wang, J., & Mao, X. (2014). Clotrimazole induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by disrupting the mTOR signaling pathway. *Scientific Reports*, 4(Mm), 8–10. <https://doi.org/10.1038/srep05749>
 60. Caravita, T., de Fabritiis, P., Palumbo, A., Amadori, S., & Boccadoro, M. (2006). Bortezomib: Efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(7), 374–387. <https://doi.org/10.1038/ncponc0555>
 61. Cejalvo, M. J., & Rubia, J. De. (2017). Expert Review of Hematology Which therapies will move to the front line for multiple myeloma ? *Expert Review of Hematology*, 10, 383–392. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1317589>

62. Chang, C.-L., Hsu, Y.-T., Wu, C.-C., Yang, Y.-C., Wang, C., Wu, T.-C., & Hung, C.-F. (2012). Immune Mechanism of the Antitumor Effects Generated by Bortezomib. *The Journal of Immunology*, 189(6), 3209–3220. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103826>
63. Chauhan, D., Pandey, P., Hideshima, T., Treon, S., Raje, N., Davies, F. E., Shima, Y., Tai, Y.-T., Rosen, S., Avraham, S., Kharbanda, S., & Anderson, K. C. (2000). SHP2 Mediates the Protective Effect of Interleukin-6 Against Dexamethasone-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *J. Biol. Chem*, 1–33. [10.1074/jbc.M003428200](https://doi.org/10.1074/jbc.M003428200)
64. Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., Richardson, P., & Anderson, K. C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clinical Cancer Research*, 17(16), 5311–5321. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0476>
65. Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., & Anderson, K. C. (2007). A novel Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, 26(16), 2374–2380. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210028>
66. Chaundhary, A. K., Yadav, N., Bhat, T. A., O'Malley, J., Kumar, S., & Chandra, D. (2016). A potential role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in mitochondrial membrane permeabilization and its implication in cancer therapy. *Drug Discov Today*, 21(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.014>
67. Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., & P. Dou, Q. (2011). Bortezomib as the First Proteasome Inhibitor Anticancer Drug: Current Status and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 11(3), 239–253. <https://doi.org/10.2174/156800911794519752>
68. Chen, H., Ning, X., & Jiang, Z. (2017). Caspases control antiviral innate immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 14(9), 736–747. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.44>
69. Chen, J., Kos, R., Garssen, J., & Redegeld, F. (2019). Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target. *Cells*, 8(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells8121486>

-
70. Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17(3), 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.030>
71. Chen, S., Zhang, Y., Zhou, L., Leng, Y., Lin, H., Kmiecik, M., Pei, X. Y., Jones, R., Orlowski, R. Z., Dai, Y., & Grant, S. (2014). A Bim-targeting strategy overcomes adaptive bortezomib resistance in myeloma through a novel link between autophagy and apoptosis. *Blood*, 124(17), 2687–2697. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-564534>
72. Chen, Y., Hua, Y., Li, X., Arslan, I. M., Zhang, W., & Meng, G. (2020). Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy. *Frontiers in Pharmacology*, 11(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>
73. Chi, X., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2014). Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(9), 2100–2113. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.002>
74. Chiang, C.-W., Kanies, C., Kim, K. W., Fang, W. Bin, Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T., & Yang, E. (2003). Protein Phosphatase 2A Dephosphorylation of Phosphoserine 112 Plays the Gatekeeper Role for BAD-Mediated Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(18), 6350–6362. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.18.6350-6362.2003>
75. Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., & Green, D. . (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*, 309(5741), 1732–1735. <https://doi.org/10.1126/science.1114297>
76. Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., & Green, D. R. (2004). Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*, 303(5660), 1010–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>
77. Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). Post-transplant lymphoproliferative disorder in renal allograft recipients: Clinical experience and risk factor analysis in a single center. *Mol Cell*, 37(3), 299–310. <https://doi.org/10.1097/00007890-199307000-00016>
78. Chou, T. F., Brown, S. J., Minond, D., Nordin, B. E., Li, K., Jones, A. C., Chase, P., Porubsky, P. R., Stoltz, B. M., Schoenen, F. J., Patricelli, M. P., Hodder, P.,

- Rosen, H., & Deshaies, R. J. (2011). Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 4834–4839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015312108>
79. Chylinski, K., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5), 726–737.
80. Concannon, C. G., Koehler, B. F., Reimertz, C., Murphy, B. M., Bonner, C., Thurow, N., Ward, M. W., Villunger, A., Strasser, A., Ko, D., & Prehn, J. H. M. (2007). Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells : predominant role of the p53 / PUMA pathway. *Oncogen*, 26, 1681–1692. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209974>
81. Costa, G., Engle, R. L., Schilling, A., Carbone, P., Kochwa, S., Nachman, R. ., & Glidewell, O. (1973). [OBJ:OBJ]Melphalan and Prednisone: An Effective Combination for the Treatment of Multiple Myeloma[OBJ:OBJ]. *The American Journal of Medicine*, 54(5), 589–599. http://ac.els-cdn.com/0002934373901162/1-s2.0-0002934373901162-main.pdf?_tid=27a91ee282a46135d2c8fc5a9751af42&acdnt=1341755358_71b236010719dc47b86c293f5544d33f%5Cnpapers2://publication/uuid/F147D8E5-B39D-42CC-AF79-0D78F78B04BB
82. Costa, L. J., Davies, F. E., Monohan, G. P., Kovacsovics, T., Burwick, N., Jakubowiak, A., Kaufman, J. L., Hong, W. J., Dail, M., Salem, A. H., Yang, X., Masud, A. A., Munasinghe, W., Ross, J. A., Bueno, O. F., Kumar, S. K., & Stadtmauer, E. A. (2021). Phase 2 study of venetoclax plus carfilzomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood Advances*, 5(19), 3748–3759. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020004146>
83. Cottini, F., & Anderson, K. (2015). Novel therapeutic targets in multiple myeloma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 13(4), 237–248. <https://doi.org/10.3109/9781420045116.005>
84. Cragg, M. S., Harris, C., Strasser, A., & Scott, C. L. (2009). Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 321–326. <https://doi.org/10.1038/nrc2615>
85. Craxton, A., Butterworth, M., Harper, N., Fairall, L., Schwabe, J., Ciechanover, A., & Cohen, G. M. (2012). NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded

- by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1. *Cell Death and Differentiation*, 19(9), 1424–1434. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.16>
86. Cufi, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C., Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., López-Bonet, E., Martín-Castillo, B., Joven, J., & Menéndez, J. A. (2013). The anti-malarial chloroquine overcomes Primary resistance and restores sensitivity to Trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Scientific Reports*, 3, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep02469>
 87. de Almagro, M. C., & Vucic, D. (2015). Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.002>
 88. De Raeve, H. R., & Vanderkerken, K. (2005). The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histology and Histopathology*, 20(4), 1227–1250. <https://doi.org/10.14670/HH-20.1227>
 89. Degli Esposti, M., Ferry, G., Masdehors, P., Boutin, J. A., Hickman, J. A., & Dive, C. (2003). Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15749–15757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209208200>
 90. Degtarev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53 REV. ISS. 7), 8543–8567. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207107>
 91. Del Bufalo, D., Trisciuglio, D., Scarsella, M., Zangemeister-Wittke, U., & Zupi, G. (2003). Treatment of melanoma cells with a bcl-2/bcl-xL antisense oligonucleotide induces antiangiogenic activity. *Oncogene*, 22(52), 8441–8447. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206999>
 92. Dengler, M. A., Robin, A. Y., Gibson, L., Westphal, D., Dewson, G., Adams, J. M., Dengler, M. A., Robin, A. Y., Gibson, L., Li, M. X., Sandow, J. J., & Iyer, S. (2019). Article BAX Activation : Mutations Near Its Proposed Non- canonical BH3 Binding Site Reveal Allosteric Changes Controlling Mitochondrial Association Article BAX Activation : Mutations Near Its Proposed Non-canonical BH3 Binding Site Reveal Allosteric Chan. *CellReports*, 27(2), 359–373.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.040>
 93. Dengler, M. A., Teh, C. E., Thijssen, R., Gangoda, L., Lan, P., Herold, M. J., Gray, D. H., Kelly, G. L., Roberts, A. W., & Adams, J. M. (2020). Potent efficacy of MCL-1 inhibitor-based therapies in preclinical models of mantle cell

- lymphoma. *Oncogene*, 39(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1122-x>
94. Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
95. Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
96. Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., & Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*, 100(1), 194–199. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.1.194>
97. Derman, B. A., Chiu, B. C., Jasielec, J., & Langerman, S. S. (2020). Racial differences in treatment and outcomes in multiple myeloma : a multiple myeloma research foundation analysis. *Blood Cancer Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00347-6>
98. Deshaies, R. J. (2014). Proteotoxic crisis , the ubiquitin-proteasome system , and cancer therapy. *BMC Biology*, 12(94), 1–14.
99. Deveraux, Q. L., & Reed, J. C. (1999). IAP family proteins - Suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, 13(3), 239–252. <https://doi.org/10.1101/gad.13.3.239>
100. Di Lernia, G., Leone, P., Solimando, A. G., Buonavoglia, A., Saltarella, I., Ria, R., Ditunno, P., Silvestris, N., Crudele, L., Vacca, A., & Racanelli, V. (2020). Bortezomib Treatment Modulates Autophagy in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 552. <https://doi.org/10.3390/jcm9020552>
101. Di Rosa, F., & Gebhardt, T. (2016). Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells. *Frontiers in Immunology*, 7(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00051>
102. Di Rosa, F., & Pabst, R. (2005). The bone marrow: A nest for migratory memory T cells. *Trends in Immunology*, 26(7), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.04.011>
103. Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

104. Dilosa, R. M., Maeda, K., Masuda, A., Szakal, A. K., & Tew, J. G. (1991). Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow . *Journal of Immunology*, 146(12), 4071–4077.
105. Dimopoulos, M. A., Laubach, J. P., Echeveste Gutierrez, M. A., Grzasko, N., Hofmeister, C. C., San-Miguel, J. F., Kumar, S., Labotka, R., Lu, V., Berg, D., Byrne, C., Teng, Z., Liu, G., van de Velde, H., & Richardson, P. G. (2019). Ixazomib maintenance therapy in newly diagnosed multiple myeloma: An integrated analysis of four phase I/II studies. *European Journal of Haematology*, 102(6), 494–503. <https://doi.org/10.1111/ejh.13231>
106. Dimopoulos, M., Kastritis, E., Rosinol, L., Blade, J., & Ludwig, H. (2008). Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22, 1485–1493. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.131>
107. Doherty, J., & Baehrecke, E. H. (2018). Life, death and autophagy. *Nature Cell Biology*, 20(10), 1110–1117. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0201-5>
108. Earnshaw, W. ., Martins, L. ., & Kauffmann, S. . (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383–424.
109. Eba, H. P., Sayar, H., Juckett, M., Lahn, M., Andre, V., Callies, S., Schmidt, S., Kadam, S., Brandt, J. T., Van Bockstaele, D., & Andreeff, M. (2013). Safety and Pharmacokinetics of the Antisense Oligonucleotide (ASO) LY2181308 as a Single-Agent or in Combination with Idarubicin and Cytarabine in Patients with Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML) Harry. *Invest New Drugs*, 31(4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-9935-x>.Safety
110. Elkholi, R., Floros, K. V., & Chipuk, J. E. (2011). The role of BH3-only proteins in tumor cell development, signaling, and treatment. *Genes and Cancer*, 2(5), 523–537. <https://doi.org/10.1177/1947601911417177>
111. Ellis, R. E., Yuan, J., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663–698. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.003311>
112. Etchin, J., Sun, Q., Kentsis, A., Farmer, A., Zhang, Z. C., Sanda, T., Mansour, M. R., Barcelo, C., McCauley, D., Kauffman, M., Shacham, S., Christie, A. L., Kung, A. L., Rodig, S. J., Chook, Y. M., & Look, A. T. (2013). Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells. *Leukemia*, 27(1), 66–74. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.219>

113. Fennell, D. A., Chacko, A., & Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*, 27(9), 1189–1197. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210744>
114. Fisher Scientific. (2020). *Chemical Structure Search*. <https://www.fishersci.es/es/es/search/chemical/substructure.html>
115. Fitzmaurice, C., Abate, D., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdel-Rahman, O., Abdelalim, A., Abdoli, A., Abdollahpour, I., Abdulle, A. S. M., Abebe, N. D., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abualhasan, A., Adedeji, I. A., Advani, S. M., Afarideh, M., Afshari, M., Aghaali, M., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-Adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology*, 5(12), 1749–1768. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2996>
116. Fladmark, K. E., Brustugun, O. T., Hovland, R., Bøe, R., Gjertsen, B. T., Zhivotovsky, B., & Døskeland, S. O. (1999). Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death and Differentiation*, 6(11), 1099–1108. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400590>
117. Fletcher, J. I., & Huang, D. C. S. (2008). *Controlling the cell death mediators Bax and Bak : puzzles and conundrums Controlling the cell death mediators Bax and Bak. 4101*. <https://doi.org/10.4161/cc.7.1.5178>
118. Fritsch, M., Günther, S. D., Schwarzer, R., Albert, M. C., Schorn, F., Werthenbach, J. P., Schiffmann, L. M., Stair, N., Stocks, H., Seeger, J. M., Lamkanfi, M., Krönke, M., Pasparakis, M., & Kashkar, H. (2019). Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784), 683–687. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>
119. Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*, 147(4), 742–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>
120. Fucikova, J., Becht, E., Iribarren, K., Goc, J., Remark, R., Damotte, D., Alifano, M., Devi, P., Biton, J., Germain, C., Lupo, A., Fridman, W. H., Dieu-Nosjean, M. C., Kroemer, G., Sautès-Fridman, C., & Cremer, I. (2016). Calreticulin expression in human non-small cell lung cancers correlates with increased accumulation of antitumor immune cells and favorable prognosis. *Cancer Research*, 76(7), 1746–1756. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1142>
121. Fundación Josep Carreras. (1988). *Mieloma múltiple*.

- <https://www.fcarreras.org/es/mieloma>
122. Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., & Carbone, D. P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine*, 2(10), 1096–1103.
 123. Gado, K., Domján, G., Hegyesi, H., & Falus, A. (2000). ROLE OF INTERLEUKIN-6 IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE MYELOMA. *Cell Biology*, 24(4), 195–209. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0497>
 124. Galán-Malo, P., Vela, L., Gonzalo, O., Calvo-Sanjuán, R., Gracia-Fleta, L., Naval, J., & Marzo, I. (2012). Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(3), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.021>
 125. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(2), 97–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
 126. Galluzzi, L., & Green, D. R. (2019). Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*, 177(7), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.026>
 127. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
 128. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
 129. Gandolfi, S., Laubach, J. P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K. C., &

- Richardson, P. G. (2017). *The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma*. 561–584.
130. Gao, F., Chen, D., Si, J., Hu, Q., Qin, Z., Fang, M., & Wang, G. (2015). The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway. *Human Molecular Genetics*, 24(9), 2528–2538. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv017>
131. Garg, A. D., Vandenberk, L., Koks, C., Verschuere, T., Boon, L., Van Gool, S. W., & Agostinis, P. (2016). Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma. *Science Translational Medicine*, 8(328), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aae0105>
132. Gasiunas, G., Sinkunas, T., & Siksnyš, V. (2013). Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 449–465.
133. Gavriatopoulou, M., Chari, A., Chen, C., Bahlis, N., Vogl, D. T., Jakubowiak, A., Dingli, D., Cornell, R. F., Hofmeister, C. C., Siegel, D., Berdeja, J. G., Reece, D., White, D., Lentzsch, S., Gasparetto, C., Huff, C. A., Jagannath, S., Baz, R., Nooka, A. K., ... Dimopoulos, M. A. (2020). Integrated safety profile of selinexor in multiple myeloma: experience from 437 patients enrolled in clinical trials. *Leukemia*, 34(9), 2430–2440. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0756-6>
134. Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., & Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24–49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>
135. Ghobrial, I. (2020). BELLINI: a renaissance for an era of precision therapy in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 21(12), 1547–1549. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30587-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30587-8)
136. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
137. Gómez-Benito, M., Balsas, P., Carvajal-Vergara, X., Pandiella, A., Anel, A., Marzo, I., & Naval, J. (2007). Mechanism of apoptosis induced by IFN- α in human myeloma cells: Role of Jak1 and Bim and potentiation by rapamycin.

- Cellular Signalling*, 19(4), 844–854.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.10.009>
138. Gómez-Benito, M., Martínez-Lorenzo, M. J., 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. *Experimental Cell Research*, 313(11), 2378–2388. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.018>
 139. Gomez-Bougie, P., Bataille, R., & Amiot, M. (2004). The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *European Journal of Immunology*, 34(11), 3156–3164. <https://doi.org/10.1002/eji.200424981>
 140. Gomez-Bougie, P., Maiga, S., Tessoulin, B., Bourcier, J., Bonnet, A., Rodriguez, M. S., Le Gouill, S., Touzeau, C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., & Amiot, M. (2018). BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment. *Blood*, 132(25), 2656–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836718>
 141. Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., & Amiot, M. (2007). Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Research*, 67(11), 5418–5424. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4322>
 142. Gong, J. N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C. D., Garnier, J. M., Lin Khaw, S., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M. J., Roberts, A. W., & Huang, D. C. S. (2016). *Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: Pivotal role of MCL1*. 128(14), 1834–1844. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704908>
 143. Görgün, G. T., Samur, M. K., Cowens, K. B., Paula, S., Bianchi, G., Anderson, J. E., White, R. E., Singh, A., Ohguchi, H., Suzuki, R., Kikuchi, S., Harada, T., Hideshima, T., Tai, Y.-T., Laubach, J. P., Raje, N., Magrangeas, F., Minvielle, S., Avet-Loiseau, H., ... Anderson, K. C. (2015). Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade Induced Immune Response in Multiple Myeloma. *Physiology & Behavior*, 21(20), 4607–4618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0200.Lenalidomide>
 144. Graupner, V., Alexander, E., Overkamp, T., Rothfuss, O., De Laurenzi, V., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., & Essmann, F. (2011).

- Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level. *Cell Death and Differentiation*, 18(7), 1130–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.179>
145. Groborz, K., Gonzalez Ramirez, M. L., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Drag, M., & Poręba, M. (2020). Exploring the prime site in caspases as a novel chemical strategy for understanding the mechanisms of cell death: a proof of concept study on necroptosis in cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 27(2), 451–465. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0364-z>
146. Gu, Y., Barwick, B. G., Shanmugam, M., Hofmeister, C. C., Kaufman, J., Nooka, A., Gupta, V., Dhodapkar, M., Boise, L. H., & Lonial, S. (2020). Downregulation of PA28 α induces proteasome remodeling and results in resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 10(12). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00393-0>
147. Gugliotta, G., Sudo, M., Cao, Q., Lin, D. C., Sun, H., Takao, S., Le Moigne, R., Rolfe, M., Gery, S., Müschen, M., Cavo, M., & Koeffler, H. P. (2017). Valosin-Containing Protein/p97 as a Novel Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia (United States)*, 19(10), 750–761. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.08.001>
148. Gump, J. M., & Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: What is the connection? *Trends in Cell Biology*, 21(7), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.007>
149. Gupta, N., Hanley, M. J., Xia, C., Labotka, R., Harvey, R. D., & Venkatakrishnan, K. (2019). Clinical Pharmacology of Ixazomib: The First Oral Proteasome Inhibitor. *Clinical Pharmacokinetics*, 58(4), 431–449. <https://doi.org/10.1007/s40262-018-0702-1>
150. Hahn, T., J. Polanczyk, M., Borodovsky, A., V. Ramanathapuram, L., T. Akporiaye, E., & J. Ralph, S. (2013). Use of Anti-Cancer Drugs, Mitocans, to Enhance the Immune Responses against Tumors. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(3), 357–376. <https://doi.org/10.2174/1389201011314030010>
151. Han, J., Goldstein, L. A., Hou, W., Gastman, B. R., & Rabinowich, H. (2010). Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic bcl-2 members and bim. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22473–22483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081042>
152. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next

- generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
153. Hasinoff, B. B. (2018). Progress curve analysis of the kinetics of slow-binding anticancer drug inhibitors of the 20S proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 639, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.020>
 154. He, S., & Wang, X. (2018). RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature Immunology*, 19(9), 912–922. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0188-x>
 155. Heckman, C. A., Mehew, J. W., & Boxer, L. M. (2002). NF- κ b activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*, 21(24), 3898–3908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205483>
 156. Hellwig, C. T., Delgado, M. E., Skoko, J., Dyck, L., Hanna, C., Wentges, A., Langlais, C., Hagenlocher, C., Mack, A., Dinsdale, D., Cain, K., MacFarlane, M., & Rehm, M. (2021). Proteasome inhibition triggers the formation of TRAIL receptor 2 platforms for caspase-8 activation that accumulate in the cytosol. *Cell Death & Differentiation*, July. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00843-7>
 157. Heuck, C. J., Mehta, J., Bhagat, T., Gundabolu, K., Yu, Y., Khan, S., Chrysofakis, G., Schinke, C., Tariman, J., Vickrey, E., Pulliam, N., Nischal, S., Zhou, L., Bhattacharya, S., Meagher, R., Hu, C., Maqbool, S., Suzuki, M., Parekh, S., ... Singhal, S. B. (2015). Myeloma is characterized by stage specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *Journal of Immunology*, 190(6), 2966–2975. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202493>. Myeloma
 158. Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P., & Anderson, K. C. (2001). *The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma : therapeutic applications.*
 159. Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N. C., Mitsiades, N., & Anderson, K. C. (2003). Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101(4), 1530–1534. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2543>
 160. Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 585–598. <https://doi.org/10.1038/nrc2189>

161. Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2001). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, 20(42), 5991–6000. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204833>
162. Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C. S., & Day, C. L. (2007). Bim, Bad and Bmf: Intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 128–136. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401934>
163. Hinsley, S., Walker, K., Sherratt, D., Bailey, L., Reed, S., Flanagan, L., McKee, S., Brudenell Straw, F., Dawkins, B., Meads, D., Auner, H. W., Kaiser, M. F., Cook, M., Brown, S., & Cook, G. (2020). The MUK eight protocol: A randomised phase II trial of cyclophosphamide and dexamethasone in combination with ixazomib, in relapsed or refractory multiple myeloma (RRMM) patients who have relapsed after treatment with thalidomide, lenalidomide and a prote. *Trials*, 21(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04739-8>
164. Hoang, B., Benavides, A., Shi, Y., Frost, P., & Lichtenstein, A. (2009). Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), 1974–1984. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1177>
165. Hou, J., Wei, R., Qian, J., Wang, R., Fan, Z., Gu, C., & Yang, Y. (2019). The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma (Review). *Oncology Reports*, 42(4), 1272–1282. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7261>
166. Hsiao, C. C., Su, W. N., Forooghian, F., Bader, S., Rempel, J., HayGlass, K. T., Gilman, A., & Schultz, K. R. (2002). Evaluation for synergistic suppression of T cell responses to minor histocompatibility antigens by chloroquine in combination with tacrolimus and a rapamycin derivative, SDZ-RAD. *Bone Marrow Transplantation*, 30(12), 905–913. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703727>
167. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.
168. Huang, D. C. S., & Strasser, A. (2000). BH3-only proteins - Essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103(6), 839–842. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00187-2)
169. Hurchla, M. A., Garcia-Gomez, A., Hornick, M. C., Ocio, E. M., Li, A., Blanco, J. F., Collins, L., Kirk, C. J., Piwnica-Worms, D., Vij, R., Tomasson, M. H., Pandiella, A., San Miguel, J. F., Garayoa, M., & Weilbaecher, K. N. (2013). The

- epoxyketone-based proteasome inhibitors carfilzomib and orally bioavailable oprozomib have anti-resorptive and bone-anabolic activity in addition to anti-myeloma effects. *Leukemia*, 27(2), 430–440. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.183>
170. Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., & Ichijo, H. (2002). Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 43730–43734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207951200>
 171. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., & Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388(6638), 190–195. <https://doi.org/10.1038/40657>
 172. Iskandarani, A., Bhat, A. A., Siveen, K. S., Prabhu, K. S., Kuttikrishnan, S., Khan, M. A., Krishnankutty, R., Kulinski, M., Nasr, R. R., Mohammad, R. M., & Uddin, S. (2016). Bortezomib-mediated downregulation of S-phase kinase protein-2 (SKP2) causes apoptotic cell death in chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0823-y>
 173. Jackson, D. A., & ElSawa, S. F. (2015). Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. *Biomolecules*, 5(1), 20–40. <https://doi.org/10.3390/biom5010020>
 174. Jagannathan, S., Vad, N., Vallabhapurapu, S., Vallabhapurapu, S., Anderson, K. C., & Driscoll, J. J. (2015). MiR-29b replacement inhibits proteasomes and disrupts aggresome+autophagosome formation to enhance the antimyeloma benefit of bortezomib. *Leukemia*, 29(3), 727–738. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.279>
 175. Janku, F., McConkey, D. J., Hong, D. S., & Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8(9), 528–539. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.71>
 176. Jaramillo, F., Useche, E., García, J., Rosales, M., Manzi, E., Estacio, M., & Rosales, J. (2018). Trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas en pacientes con diagnóstico de mieloma múltiple, experiencia en 9 años. *Revista Colombiana de Cancerología*, 22(4), 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2018.10.001>

177. Jarauta, V. (2015). *Tesis. Interrelaciones entre apoptosis y autofagia. Aplicación al tratamiento de células de mieloma con el inhibidor del proteasoma carfilzomib*. Universidad de Zaragoza.
178. Jarauta, V., Jaime, P., Gonzalo, O., de Miguel, D., Ramírez-Labrada, A., Martínez-Lostao, L., Anel, A., Pardo, J., Marzo, I., & Naval, J. (2016). Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 382(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.019>
179. Jelinek, T., Kryukov, F., Rihova, L., & Hajek, R. (2015). Plasma cell leukemia: From biology to treatment. *European Journal of Haematology*, 95(1), 16–26. <https://doi.org/10.1111/ejh.12533>
180. Jette, C. A., Flanagan, A. M., Ryan, J., Pyati, U. J., Carbonneau, S., Stewart, R. A., Langenau, D. M., Look, A. T., & Letai, A. (2008). BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals. *Cell Death and Differentiation*, 15(6), 1063–1072. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.42>
181. Jin, S., DiPaola, R. S., Mathew, R., & White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of Cell Science*, 120(3), 379–383. <https://doi.org/10.1242/jcs.03349>
182. Jourdan, M., De Vos, J., Mechti, N., & Klein, B. (2000). Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: Interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death and Differentiation*, 7(12), 1244–1252. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400758>
183. Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation*, 24(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
184. Jung, S., Jeong, H., & Yu, S. W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(6), 921–930. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0455-4>
185. Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2805–2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
186. Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*,

- 25(1), 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
187. Kapoor, I., Bodo, J., Hill, B. T., Hsi, E. D., & Almasan, A. (2020). Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance. *Cell Death and Disease*, 11(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03144-y>
188. Kawaguchi, T., Miyazawa, K., Moriya, S., Ohtomo, T., Che, X. F., Naito, M., Itoh, M., & Tomoda, A. (2011). Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytocidal effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: Crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *International Journal of Oncology*, 38(3), 643–654. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.882>
189. Kepp, O., Galluzzi, L., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Michaud, M., Sukkurwala, A. Q., Menger, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2011). Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9273-4>
190. Khan, K. H., Blanco-Codeido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 90(3), 200–219. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.012>
191. Khan, N., & Kahl, B. (2018). *Targeting BCL-2 in Hematologic Malignancies*. 257–267.
192. Kimmelman, A. C., & White, E. (2017). Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*, 25(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>
193. Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R., & Kumar, S. (2007). ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia*, 21(7), 1549–1560. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404719>
194. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Arozana, A. A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., ... Zughaier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
195. Komatsu, M., & Ichimura, Y. (2010). Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1374–1378.

- <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.017>
196. Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G. L., Gong, J. N., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., ... Geneste, O. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538(7626), 477–482. <https://doi.org/10.1038/nature19830>
 197. Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., & Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3516–3520. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3516>
 198. Krajewski, S., Gascoyne, R. D., Zapata, J. M., Krajewska, M., Kitada, S., Chhanabhai, M., Horsman, D., Berean, K., Piro, L. D., Fugier-Vivier, I., Liu, Y. J., Wang, H. G., & Reed, J. C. (1997). Immunolocalization of the ICE/Ced-3-family protease, CPP32 (Caspase-3), in non-Hodgkin's lymphomas, chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood*, 89(10), 3817–3825. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.10.3817>
 199. Krejcik, J., Casneuf, T., Nijhof, I. S., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., Syed, K., Liu, K., Van De Donk, N. W. C. J., Weiss, B. M., Ahmadi, T., Lokhorst, H. M., Mutis, T., & Sasser, A. K. (2016). Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), 384–394. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-687749>
 200. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
 201. Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2), 280–293.
 202. Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., &

- Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 860–875. <https://doi.org/10.1038/nrc3380>
203. Kubiczekova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(6), 947–961. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12279>
204. Kuehl, W. M., & Bergsagel, P. L. (2002). Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 175–187. <https://doi.org/10.1038/nrc746>
205. Kuhn, D. J., Chen, Q., Voorhees, P. M., Strader, J. S., Shenk, K. D., Sun, C. M., Demo, S. D., Bennett, M. K., Van Leeuwen, F. W. B., Chanan-Khan, A. A., & Orlowski, R. Z. (2007). Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 110(9), 3281–3290. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-065888>
206. Kumar, S., Grzasko, N., Delimpasi, S., Jedrzejczak, W. W., Grosicki, S., Kyrtsolis, M., Spencer, A., Gupta, N., Teng, Z., Byrne, C., & Labotka, R. (2019). Phase 2 study of all-oral ixazomib, cyclophosphamide and low-dose dexamethasone for relapsed / refractory multiple myeloma. *British Journal of Hematology*, 184, 536–546. <https://doi.org/10.1111/bjh.15679>
207. Kumar, S., Harrison, S. J., Cavo, M., de la Rubia, J., Popat, R., Gasparetto, C., Hungria, V., Salwender, H., Suzuki, K., Kim, I., Punnoose, E. A., Hong, W. J., Freise, K. J., Yang, X., Sood, A., Jalaluddin, M., Ross, J. A., Ward, J. E., Maciag, P. C., & Moreau, P. (2020). Venetoclax or placebo in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (BELLINI): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(12), 1630–1642. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30525-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30525-8)
208. Kumar, S., Kaufman, J. L., Gasparetto, C., Mikhael, J., Vij, R., Pegourie, B., Benboubker, L., Facon, T., Amiot, M., Moreau, P., Punnoose, E. A., Alzate, S., Dunbar, M., Xu, T., Agarwal, S. K., Enschede, S. H., Leverson, J. D., Ross, J. A., Maciag, P. C., ... Touzeau, C. (2017). Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*, 130(22), 2401–2409. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788786>

209. Kumar, S., Rajkumar, V., Kyle, R. A., Van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M. V., Gay, F., & Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
210. Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., & Bolen, J. (2010). Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Research*, 70(5), 1970–1980. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2766>
211. Kvansakul, M., & Hinds, M. G. (2013). Structural biology of the Bcl-2 family and its mimicry by viral proteins. *Cell Death and Disease*, 4(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.436>
212. Kyle, R. A., Larson, D. R., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kumar, S., Cerhan, J. R., & Rajkumar, S. V. (2018). Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N England J Med*, 378(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
213. Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2008). Multiple myeloma. *Blood*, 111(6), 2962–2972.
214. LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252–6275. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.302>
215. Lam, M., Marsters, S., Ashkenazi, A., & Walter, P. (2020). Misfolded proteins bind and activate death receptor 5 to trigger apoptosis during unresolved endoplasmic reticulum stress. *ELife*, 9, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.52291>
216. Landgren, O., Graubard, B. I., Katzmann, J. A., Kyle, R. A., Ahmadizadeh, I., Clark, R., Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Greenberg, A. J., Therneau, T. M., Melton, L. J., Caporaso, N., Korde, N., Roschewski, M., Costello, R., McQuillan, G. M., & Rajkumar, S. V. (2014). Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: A population-based study of 12 482 persons from the national health and nutritional examination survey. *Leukemia*, 28(7), 1537–1542. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.34>
217. Laubach, J. P., Richardson, P. G., & Anderson, K. C. (2010). *The evolution and impact of therapy in multiple myeloma*. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9442-2>

-
218. Lazareth, A., Song, X.-Y., Coquin, A., Harel, S., Karlin, L., Belhadj, K., Roos-Weil, D., Frenzel, L., Tamburini, J., Macro, M., Chevret, S., Loiseau, H. A., Minvielle, S., Fermand, J. P., Soulier, J., Christophe Bories, J., & Arnulf, B. (2015). MB4-2 breakpoint in MMSET combined with del(17p) defines a subset of t(4;14) multiple myeloma with very poor prognosis Multiple. *Hematologica*, *100*(11), e471–e474. <https://doi.org/10.1119/1.1932666>
219. Le Moigne, R., Aftab, B. T., Djakovic, S., Dhimolea, E., Valle, E., Murnane, M., King, E. M., Soriano, F., Menon, M. K., Wu, Z. Y., Wong, S. T., Lee, G. J., Yao, B., Wiita, A. P., Lam, C., Rice, J., Wang, J., Chesi, M., Bergsagel, P. L., ... Rolfe, M. (2017). The p97 inhibitor CB-5083 is a unique disrupter of protein homeostasis in models of multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *16*(11), 2375–2386. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0233>
220. Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2007). Embedded together: The life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis*, *12*(5), 897–911. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0746-4>
221. Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, *29*(38), 5221–5230. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.283>
222. Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. (2018). Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3537471>
223. Leleu, X., Martin, T. G., Einsele, H., Lyons, R. M., Durie, B. G. M., Iskander, K. S., & Ailawadhi, S. (2019). Role of Proteasome Inhibitors in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, *19*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.08.016>
224. Lemieux, C., Muffly, L. S., Rezvani, A., Lowsky, R., Iberri, D. J., Craig, J. K., Frank, M. J., Johnston, L. J., Liedtke, M., Negrin, R., Weng, W. K., Meyer, E., Shizuru, J., Shiraz, P., Arai, S., Miklos, D. B., & Sidana, S. (2020). Outcomes with autologous stem cell transplant vs. non-transplant therapy in patients 70 years and older with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01026-7>
225. Leoni, L. M., Bailey, B., Reifert, J., Bendall, H. H., Zeller, R. W., Corbeil, J., Elliott, G., & Niemeyer, C. C. (2008). Bendamustine (Treanda) displays a distinct

- pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 309–317. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1061>
226. Lernoux, M., Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2021). Susceptibility of multiple myeloma to B-cell lymphoma 2 family inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 188(October 2020), 114526. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114526>
 227. Lessene, G., Czabotar, P. E., & Colman, P. M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 989–1000. <https://doi.org/10.1038/nrd2658>
 228. Letai, A. (2016). S63845, an MCL-1 Selective BH3 Mimetic: Another Arrow in Our Quiver. *Cancer Cell*, 30(6), 834–835. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.016>
 229. Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., & Korsmeyer, S. J. (2002). *Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis , serving as prototype cancer therapeutics*. 2(September), 183–192.
 230. Letai, A. G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc2297>
 231. Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., Tahir, S. K., Belmont, L. D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X. M., Lowes, K. N., Kovar, P., Chen, J., Jin, S., Smith, M., Xue, J., Zhang, H., Oleksijew, A., Magoc, T. J., ... Souers, A. J. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Science Translational Medicine*, 7(279), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4642>
 232. Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, 176(1), 11–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
 233. Levy, J. M. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
 234. Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase

- when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95–99. <https://doi.org/10.1038/35083620>
235. Li, M., Hou, Y., Wang, J., Chen, X., Shao, Z. M., & Yin, X. M. (2011). Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7327–7338.
 236. Li, Z., He, S., & Look, A. T. (2019). The MCL1-specific inhibitor S63845 acts synergistically with venetoclax/ABT-199 to induce apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*, 33(1), 262–266. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0201-2>
 237. Lin, L., & Baehrecke, E. H. (2015). Autophagy , cell death , and cancer. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(3).
 238. Liu, W., Chen, J., Tamayo, A. T., Ruan, C., Li, L., Zhou, S., Shen, C., Young, K. H., Westin, J., Davis, R. E., Hu, S., Medeiros, L. J., Ford, R. J., & Pham, L. V. (2018). Preclinical efficacy and biological effects of the oral proteasome inhibitor ixazomib in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 9(1), 346–360. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20378>
 239. Liu, W., Tang, X., Qi, X., Fu, X., Ghimire, S., & Ma, R. (2020). The Ubiquitin Conjugating Enzyme : An Important Ubiquitin Transfer Platform in Ubiquitin-Proteasome System. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2894–2910.
 240. Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., & Kappler, J. W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: Implications for Bim function. *Immunity*, 19(3), 341–352. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00234-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00234-6)
 241. Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., Qi, D., Lin, C., Tong, R., & Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(3), 771–786. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4244>
 242. Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S. W. G., Bouchier-hayes, L., Temirov, J., McCormick, L. L., Dillon, C. P., & Green, D. R. (2012). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. 44(4), 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.001.A>
 243. Logue, S. E., Elgendy, M., & Martin, S. J. (2009). Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nature*

- Protocols*, 4(9), 1383–1395. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.143>
244. Lomonosova, E., & C.Hinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: An overview. *Oncogene*, 27, S2–S19. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.39>
245. Lu, L., Payvandi, F., Wu, L., Zhang, L. H., Hariri, R. J., Man, H. W., Chen, R. S., Muller, G. W., Hughes, C. C. W., Stirling, D. I., Schafer, P. H., & Bartlett, J. B. (2009). The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvascular Research*, 77(2), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.08.003>
246. Luo, F., Lu, F. T., Qiu, M. Z., Zhou, T., Ma, W. J., Luo, M., Zeng, K. M., Luo, Q. Y., Pan, W. T., Zhang, L., Xia, Z. F., Zhang, Z. H., Cao, J. X., Zhao, H. Y., Zhang, L., & Yang, D. J. (2021). Gemcitabine and APG-1252, a novel small molecule inhibitor of BCL-2/BCL-XL, display a synergistic antitumor effect in nasopharyngeal carcinoma through the JAK-2/STAT3/MCL-1 signaling pathway. *Cell Death and Disease*, 12(8), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04042-7>
247. 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(4), 481–490. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81589-5)
248. Lynch, R. G., Graff, R. J., Sirisinha, S., Simms, E. S., & Eisen, H. N. (1972). Myeloma proteins as tumor-specific transplantation antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1540–1544. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1540>
249. Maas, C., De Vries, E., Tait, S. W. G., & Borst, J. (2011). Bid can mediate a pro-apoptotic response to etoposide and ionizing radiation without cleavage in its unstructured loop and in the absence of p53. *Oncogene*, 30(33), 3636–3647. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.75>
250. Maas, C., Verbrugge, I., De Vries, E., Savich, G., Van De Kooij, L. W., Tait, S. W. G., & Borst, J. (2010). Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type i tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death and Differentiation*, 17(10), 1613–1623. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.39>

-
251. Maltese, W. A., & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *American Journal of Pathology*, 184(6), 1630–1642. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.028>
252. Manasanch, E. E., & Orlowski, R. Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), 417–433. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.206>
253. Manier, S., Salem, K. Z., Park, J., Landau, D. A., Getz, G., & Ghobrial, I. M. (2017). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(2), 100–113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
254. Mao, X., Li, X., Sprangers, R., Wang, X., Venugopal, A., Wood, T., Zhang, Y., Kuntz, D. A., Coe, E., Trudel, S., Rose, D., Batey, R. A., Kay, L. E., & Schimmer, A. D. (2009). Clotrimazole inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Leukemia*, 23(3), 585–590. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.232>
255. Martins, I., Kepp, O., Galluzzi, L., Senovilla, L., Schlemmer, F., Adjemian, S., Menger, L., Michaud, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2010). Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05740.x>
256. Martins, I., Michaud, M., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Shen, S., Kepp, O., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy*, 8(3), 413–415. <https://doi.org/10.4161/auto.19009>
257. Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., Dejardin, E., & Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, 21(6), 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.009>
258. Mei, Y., Du, W., Yang, Y., & Wu, M. (2005). Puma-Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene*, 24(48), 7224–7237. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208873>
259. Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M.,

- Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., Jäck, H. M., & Voll, R. E. (2007). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Research*, 67(4), 1783–1792. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2258>
260. Merino, D., Kelly, G. L., Lessene, G., Wei, A. H., Roberts, A. W., & Strasser, A. (2018). BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell*, 34(6), 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.004>
261. Metzsig, M. O., Fuchs, D., Tagscherer, K. E., Gröne, H. J., Schirmacher, P., & Roth, W. (2016). Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- α -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- κ B. *Oncogene*, 35(26), 3399–3409. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.398>
262. Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., Rello-Varona, S., Tailler, M., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Ghiringhelli, F., Di Virgilio, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334(6062), 1573–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1208347>
263. Mihailidou, C., Papazian, I., & G, A. (2010). Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistr y CHOP-dependent Regulation of p21 / waf1 During ER Stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 761–766.
264. Miller, L. A., Goldstein, N. B., Johannes, W. U., Walton, C. H., Fujita, M., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2009). BH3 mimetic ABT-737 and a proteasome inhibitor synergistically kill melanomas through Noxa-dependent apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(4), 964–971. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.327>
265. Mirkes, P. E. (1985). Cyclophosphamide teratogenesis: A review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 5(2), 75–88. <https://doi.org/10.1002/tcm.1770050202>
266. Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728–741.
267. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
268. Montanari, F., Lu, M., Marcus, S., & Saran, A. (2014). A Phase II Trial of

- Chloroquine in Combination with Bortezomib and Cyclophosphamide in Patients with Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, 124(21), 5775–5775.
269. Montico, B., Nigro, A., Casolaro, V., & Dal Col, J. (2018). Immunogenic apoptosis as a novel tool for anticancer vaccine development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020594>
 270. Moquin, D. M., McQuade, T., & Chan, F. K. M. (2013). CYLD Deubiquitinates RIP1 in the TNF α -Induced Necrosome to Facilitate Kinase Activation and Programmed Necrosis. *PLoS ONE*, 8(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076841>
 271. Morales, A. A., Kurtoglu, M., Matulis, S. M., Liu, J., Siefker, D., Gutman, D. M., Kaufman, J. L., Lee, K. P., Lonial, S., & Boise, L. H. (2011). Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood*, 118(5), 1329–1339. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-327197>
 272. Moreau, P., Chanan-Khan, A., Roberts, A. W., Agarwal, A. B., Facon, T., Kumar, S., Touzeau, C., Punnoose, E. A., Cordero, J., Munasinghe, W., Jia, J., Salem, A. H., Freise, K. J., Levenson, J. D., Enschede, S. H., Ross, J. A., Maciag, P. C., Verdugo, M., & Harrison, S. J. (2017). Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood*, 130(22), 2392–2400. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-788323>
 273. Moreau, P., Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N. J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B. W., Jackson, S. R., Stoppa, A.-M., Simpson, D. R., Gimsing, P., Palumbo, A., Garderet, L., Cavo, M., Kumar, S., Touzeau, C., & Buadi, F. K. (2019). *Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma*. 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>
 274. Morgan, G. J., Davies, F. E., & Linet, M. (2002). Myeloma aetiology and epidemiology. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(5), 223–234. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00194-4](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00194-4)
 275. Morgan, J. E., Prola, A., Mariot, V., Pini, V., Meng, J., Hourde, C., Dumonceaux, J., Conti, F., Relaix, F., Authier, F. J., Tired, L., Muntoni, F., & Bencze, M. (2018). Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06057-9>
 276. Mortenson, M. M., Schlieman, M. G., Virudachalam, S., Lara, P. N., Gandara, D. G., Davies, A. M., & Bold, R. J. (2005). Reduction in BCL-2 levels by 26S

- proteasome inhibition with bortezomib is associated with induction of apoptosis in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 49(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.01.006>
277. Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2009). p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell*, 137(6), 1001–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023>
 278. Muenchow, A., Weller, S., Hinterleitner, C., Malenke, E., Bugl, S., Wirths, S., Müller, M. R., Schulze-Osthoff, K., Aulitzky, W. E., Kopp, H. G., & Essmann, F. (2020). The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death and Disease*, 11(8). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02910-2>
 279. Mukherjee, N., Skees, J., Todd, K. J., West, D. A., Lambert, K. A., Robinson, W. A., Amato, C. M., Coutts, K. L., Van Gullick, R., MacBeth, M., Nassar, K., Tan, A. C., Zhai, Z., Fujita, M., Bagby, S. M., Dart, C. R., Lambert, J. R., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2020). MCL1 inhibitors S63845/MIK665 plus Navitoclax synergistically kill difficult-to-treat melanoma cells. *Cell Death and Disease*, 11(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2646-2>
 280. Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., & Azab, A. K. (2016). Spotlight on ixazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 217–226. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S93602>
 281. National Library of Medicine. (2019). *Clinical trials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results%3Fterm=autophagy+and+cancer&Search=&Search=Search>
 282. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., & Miller, D. K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. In *Nature* (Vol. 376, Issue 6535, pp. 37–43). <https://doi.org/10.1038/376037a0>
 283. Nikesitch, N., Lee, J. M., Ling, S., & Roberts, T. L. (2018). Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clinical and Translational Immunology*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cti2.1007>

-
284. Niu, X., Brahmabhatt, H., Mergenthaler, P., Zhang, Z., Sang, J., Daude, M., Ehlert, F. G. R., Diederich, W. E., Wong, E., Zhu, W., Pogmore, J., Nandy, J. P., Satyanarayana, Maragani Jimmidi, R. K., Arya, P., Leber, B., Lin, J., Culmsee, C., Yi, J., & Andrews, D. W. (2017). *A Small-Molecule Inhibitor of Bax and Bak Oligomerization Prevents Genotoxic Cell Death and Promotes Neuroprotection*. 24(4), 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.011.A>
285. Niu, X., Zhao, J., Ma, J., Xie, C., Edwards, H., Wang, G., Caldwell, J. T., Xiang, S., Zhang, X., Chu, R., Wang, Z., Lin, H., Taub, J. W., & Ge, Y. (2016). Binding of released Bim to Mcl-1 is a mechanism of intrinsic resistance to ABT-199 which can be overcome by combination with daunorubicin or cytarabine in AML cells. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4440–4451. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3057.Binding>
286. Noguchi, M., Hirata, N., Tanaka, T., Suizu, F., Nakajima, H., & Chiorini, J. A. (2020). Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death and Disease*, 11(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2724-5>
287. O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., & Huang, D. C. S. (1998). Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO Journal*, 17(2), 384–395. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.384>
288. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., Van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, 13(1), 54–61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>
289. Obeid, M., Tufi, R., Endert, P. Van, Apetoh, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunological Reviews*, 22–34.
290. Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Lee, K. P., & Boise, L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, 107(12), 4907–4916. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3531>
291. Obrist, F., Manic, G., Kroemer, G., Vitale, I., & Galluzzi, L. (2015). Trial Watch: Proteasomal inhibitors for anticancer therapy. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(2), e974463. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.974463>

292. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2016). Noxa , a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *American Association for the Advancement of Science Stable*, 288(5468), 1053–1058. URL : <http://www.jstor.org/stable/3075110>
293. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, 288(May), 1053–1058.
294. Offidani, M., Corvatta, L., Caraffa, P., Gentili, S., Maracci, L., & Leoni, P. (2014). An evidence-based review of ixazomib citrate and its potential in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma. *Oncotarget* 7, 1793–1800.
295. Okushi, Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., & Dou, Q. P. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35(0), S78–S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>.Broad
296. Opdenbosch, N. Van, & Lamkanfi, M. (2019). Europe PMC Funders Group Caspases in cell death , inflammation and disease. *Immunity*, 50(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>.Caspases
297. Oyajobi, B. O. (2007). Multiple myeloma / hypercalcemia. *Arthritis Research & Therapy*, 6(S1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/ar2168>
298. Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., Van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D. B., & Kroemer, G. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO Journal*, 28(5), 578–590. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.1>
299. Pandit, B., & Gartel, A. L. (2011). Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells. *American Journal of Pathology*, 178(1), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.010>
300. Pang, Y. P., Dai, H., Smith, A., Meng, X. W., Schneider, P. A., & Kaufmann, S. H. (2012). Bak conformational changes induced by ligand binding: Insight into BH3 domain binding and bak homo-oligomerization. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00257>
301. Paquin, A., Visram, A., Kumar, S. K., Gertz, M. A., Cantwell, H., Buadi, F. K.,

- Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Dingli, D., Hwa, L., Fonder, A., Hobbs, M., Hayman, S. R., Lust, J. A., Russell, S. J., Leung, N., Kapoor, P., Go, R. S., Lin, Y., ... Rajkumar, S. V. (2020). Characteristics of exceptional responders to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 10(8). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00353-8>
302. Park, J., Park, E., Jung, C., Kang, S., Kim, B. G., Jung, Y., Kim, T. H., Lim, J., Lee, S., Min, C., & Won, K. (2016). Oral proteasome inhibitor with strong preclinical efficacy in myeloma models. *BMC Cancer*, 16(247), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2285-2>
303. Parlati, F., Lee, S. J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J. B., Micklem, D. R., Ruurs, P., Sylvain, C., Lu, Y., Shenk, K. D., Bennett, M. K., Dc, W., Parlati, F., Lee, S. J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J. B., ... Bennett, M. K. (2009). Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood Journal*, 114(16), 3439–3447. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-223677>
304. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
305. Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
306. Pérez-Galán, P., Roue, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., & Colomer, D. (2006). The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107(1), 257–264. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2091>
307. Perini, G. F., Ribeiro, G. N., Pinto Neto, J. V., Campos, L. T., & Hamerschlag, N. (2018). BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0608-2>
308. Piñon, J. D., Labi, V., Egle, A., & Villunger, A. (2008). Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene*, 27, S41–S52. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.42>
309. Pinto, V., Bergantim, R., Caires, H. R., Seca, H., Guimarães, J. E., & Vasconcelos, M. H. (2020). Multiple myeloma: Available therapies and causes of drug resistance. *Cancers*, 12(2), 1–32. <https://doi.org/10.3390/cancers12020407>

310. Ploner, C., Kofler, R., & Villunger, A. (2008). Noxa: At the tip of the balance between life and death. *Oncogene*, 27, S84–S92. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.46>
311. Podar, K., Gouill, S. L., Zhang, J., Opferman, J. T., Zorn, E., Tai, Y. T., Hideshima, T., Amiot, M., Chauhan, D., Harousseau, J. L., & Anderson, K. C. (2008). A pivotal role for Mcl-1 in Bortezomib-induced apoptosis. *Oncogene*, 27(6), 721–731. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210679>
312. Premkumar, V. J., Lentzsch, S., Pan, S., Bhutani, D., Richter, J., Jagannath, S., Liedtke, M., Jaccard, A., Wechalekar, A. D., Comenzo, R., Santhorawala, V., Royer, B., Rosenzweig, M., Valent, J., Schönland, S., Fonseca, R., Wong, S., & Kapoor, P. (2021). Venetoclax induces deep hematologic remissions in t(11;14) relapsed/refractory AL amyloidosis. *Blood Cancer Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00397-w>
313. Prukova, D., Andera, L., Nahacka, Z., Karolova, J., Svaton, M., Klanova, M., Havranek, O., Soukup, J., Svobodova, K., Zemanova, Z., Tuskova, D., Pokorna, E., Helman, K., Forsterova, K., Pacheco-Blanco, M., Vockova, P., Berkova, A., Fronkova, E., Trneny, M., & Klener, P. (2019). Cotargeting of BCL2 with venetoclax and MCL1 with S63845 is synthetically lethal in vivo in relapsed mantle cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 25(14), 4455–4465. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3275>
314. Punnoose, E. A., Levenson, J. D., Peale, F., Boghaert, E. R., Belmont, L. D., Tan, N., Young, A., Mitten, M., Ingalla, E., Darbonne, W. C., Oleksijew, A., Tapang, P., Yue, P., Oeh, J., Lee, L., Maiga, S., Fairbrother, W. J., Amiot, M., Souers, A. J., & Sampath, D. (2016). Expression profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 predicts pharmacological response to the BCL-2 selective antagonist venetoclax in multiple myeloma models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 1132–1144. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0730>
315. Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell*, 3(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80456-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80456-6)
316. Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., & Strasser, A. (2007). ER Stress Triggers

- Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337–1349.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>
317. Qin, J. Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B. K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P. M., Trent, J. M., Hendrix, M. J. C., Rizzo, P., Miele, L., & Nickoloff, B. J. (2005). Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Research*, 65(14), 6282–6293.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0676>
318. Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eeva-Liisa, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., & Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809–1820.
<https://doi.org/10.1172/jci200320039>
319. Radha, G., & Raghavan, S. C. (2017). BCL2: A promising cancer therapeutic target. *BBA- Reviews on Cancer*, 1868(1), 309–314.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.06.004>
320. Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C., & Debnath, J. (2010). ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell*, 142(4), 590–600.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.018>
321. Rajkumar, S. V., Kyle, R. A., Therneau, T. M., Melton, L. J., Bradwell, A. R., Clark, R. J., Larson, D. R., Plevak, M. F., Dispenzieri, A., & Katzmann, J. A. (2005). Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 106(3), 812–817. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1038>
322. Rajkumar, S. V., Landgren, O., & Mateos, M. V. (2015). Smoldering multiple myeloma. *Blood*, 125(20), 3069–3075. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-568899>
323. Ralhan, R., & Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), 1061–1075.
<https://doi.org/10.1517/13543776.17.9.1061>
324. Ramakrishnan, V., & Mager, D. E. (2018). Network-Based Analysis of Bortezomib Pharmacodynamic Heterogeneity in Multiple Myeloma Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(3), 734–751.
<https://doi.org/10.1124/jpet.118.247924>

325. Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C., Gootenberg, J. S., Trevino, A., Scott, D. a, Inoue, A., & Matoba, S. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, *154*(6), 1380–1389.
326. Rasola, A., & Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*, *12*(5), 815–833. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0723-y>
327. Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2017). Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, *22*(7), 898–919. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1375-1>
328. Reed, J. C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, *111*(7), 3322–3330. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-078162>
329. Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. D., & Cheng, E. H. Y. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science*, *330*(6009), 1390–1393. <https://doi.org/10.1126/science.1190217>
330. Reu, F., Valent, J., Malek, E., & Sobecks, R. M. (2015). A Phase I Study of Ixazomib in Combination with Panobinostat and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, *126*(23), 4221–221. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.4221.4221>
331. Ri, M., Iida, S., Nakashima, T., Miyazaki, H., Mori, F., Ito, A., Inagaki, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., Shiotsu, Y., & Ueda, R. (2010). Bortezomib-resistant myeloma cell lines: A role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress. *Leukemia*, *24*(8), 1506–1512. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.137>
332. Richardson, P. G., Hungria, V. T. M., Yoon, S. S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W. W., Guenther, A., Na Nakorn, T., Siritanaratkul, N., Schlossman, R. L., Hou, J., Moreau, P., Lonial, S., Lee, J. H., Einsele, H., Sopala, M., Bengoudifa, B. R., Corrado, C., ... San-Miguel, J. F. (2016). Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone in previously treated multiple myeloma: Outcomes by prior treatment. *Blood*, *127*(6), 713–721. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-665018>

-
333. Richardson, P. G., Moreau, P., Laubach, J. P., Gupta, N., Hui, A.-M., Anderson, K. C., San Miguel, J. F., & Kumar, S. (2015). Ixazomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(9), 1287–1298. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1065250>
334. Ritter, V., Krautter, F., Klein, D., Jendrossek, V., & Rudner, J. (2021). Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-263 overcomes hypoxia-driven radioresistance and improves radiotherapy. *Cell Death and Disease*, 12(7), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03971-7>
335. Rooswinkel, R. W., Van De Kooij, B., De Vries, E., Paauwe, M., Braster, R., Verheij, M., & Borst, J. (2014). Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood*, 123(18), 2806–2815. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519470>
336. Rosen, L., & Rosen, G. (2020). *American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/es/cancer/mieloma-multiple/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-sintomas.html>
337. Ross, J., Amiot, M., Chyla, B., Roberts-Rapp, L., Goswami, R., Yan, S., Huang, X., Bhatena, A., Enschede, S. H., Maciag, P., Humerickhouse, R. A., & McKeegan, E. (2015). Biomarker and Ex Vivo Sensitivity Analysis of Venetoclax (ABT-199/GDC-0199) in Combination with Bortezomib and Dexamethasone in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*, 126(23), 2975–2975. <https://doi.org/10.1182/blood.v126.23.2975.2975>
338. Rubinstein, A. D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S., & Kimchi, A. (2011). The autophagy protein atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 44(5), 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014>
339. Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443(7113), 780–786. <https://doi.org/10.1038/nature05291>
340. Russo, M., & Russo, G. L. (2018). Autophagy inducers in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 153(December 2017), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.007>
341. Saha, M. N., Jiang, H., & Chang, H. (2010). Molecular mechanisms of nutlin-induced apoptosis in multiple myeloma: Evidence for p53-transcription-dependent and -independent pathways. *Cancer Biology and Therapy*, 10(6), 567–

578. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.6.12535>
342. Samson, A. L., Zhang, Y., Geoghegan, N. D., Gavin, X. J., Davies, K. A., Mlodzianoski, M. J., Whitehead, L. W., Frank, D., Garnish, S. E., Fitzgibbon, C., Hempel, A., Young, S. N., Jacobsen, A. V., Cawthorne, W., Petrie, E. J., Faux, M. C., Shield-Artin, K., Lalaoui, N., Hildebrand, J. M., ... Murphy, J. M. (2020). MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16887-1>
343. San-Miguel, J. F., Hungria, V. T. M., Yoon, S. S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W. W., Günther, A., Nakorn, T. N., Siritanaratkul, N., Corradini, P., Chuncharunee, S., Lee, J. J., Schlossman, R. L., Shelekhova, T., Yong, K., Tan, D., Numbenjapon, T., Cavenagh, J. D., ... Richardson, P. G. (2014). Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: A multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(11), 1195–1206. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70440-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70440-1)
344. Schrader, J., Henneberg, F., Mata, R. A., Tittmann, K., Schneider, T. R., Stark, H., Bourenkov, G., & Chari, A. (2016). The inhibition mechanism of human 20. *Science*, 353(6299), 1–6.
345. Seiller, C., Maiga, S., Touzeau, C., Bellanger, C., Kervoëlen, C., Descamps, G., Maillet, L., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Gomez-Bougie, P., & Amiot, M. (2020). Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death and Disease*, 11(5), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2505-1>
346. Selimovic, D., Porzig, B. B. O. W., El-Khattouti, A., Badura, H. E., Ahmad, M., Ghanjati, F., Santourlidis, S., Haikel, Y., & Hassan, M. (2013). Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells. *Cellular Signalling*, 25(1), 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.10.004>
347. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Gorbunova, A. S., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation. *Cell Death and Differentiation*, 27(2), 405–419.

- <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0486-3>
348. Senovilla, L., Vitale, I., Martins, I., Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2013). An anticancer therapy-elicited immunosurveillance system that eliminates tetraploid cells. *OncoImmunology*, 2(1), 1–4. <https://doi.org/10.4161/onco.22409>
 349. Serrano del Valle, A. (2020). *Immunogenicity and cell death mechanisms in cancer treatment. Application to Multiple Myeloma*. Universidad de Zaragoza.
 350. Sha, Z., & Goldberg, A. L. (2020). Multiple myeloma cells are exceptionally sensitive to heat shock, which overwhelms their proteostasis network and induces apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), 21588–21597. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001323117>
 351. Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. a., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science*, 343(6166), 84–87.
 352. Shamas-din, A., Kale, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2013). Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 1–21.
 353. Shen, X., Wu, C., Lei, M., Yan, Q., Zhang, H., Zhang, L., Wang, X., Yang, Y., Li, J., Zhu, Y., & Chen, L. (2021). Anti-tumor activity of a novel proteasome inhibitor D395 against multiple myeloma and its lower cardiotoxicity compared with carfilzomib. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03701-z>
 354. Shibue, T., & Taniguchi, T. (2006). BH3-only proteins: Integrated control point of apoptosis. *International Journal of Cancer*, 119(9), 2036–2043. <https://doi.org/10.1002/ijc.21751>
 355. Shirley, M. (2016). Ixazomib: First Global Approval. *Drugs*, 76(3), 405–411. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0548-5>.
 356. Shoemaker, A. R., Mitten, M. J., Adickes, J., Ackler, S., Refici, M., Ferguson, D., Oleksijew, A., O'Connor, J. M., Wang, B., Frost, D. J., Bauch, J., Marsh, K., K. tahir, S., Yang, X., Tse, C., Fesik, S. W., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008). Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3268–3277. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4622>

357. Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7>
358. Sidiqi, M. H., Al Saleh, A. S., Leung, N., Jevremovic, D., Aljama, M. A., Gonsalves, W. I., Buadi, F. K., Kourelis, T. V., Warsame, R., Muchtar, E., Hobbs, M. A., Lacy, M. Q., Dingli, D., Go, R. S., Hayman, S. R., Rajkumar, S. V., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Kumar, S. K., ... Kapoor, P. (2020). Venetoclax for the treatment of translocation (11;14) AL amyloidosis. *Blood Cancer Journal*, 10(5). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-0321-6>
359. Sigurdardottir, E. E., Turesson, I., Lund, S. H., Lindqvist, E. K., Mailankody, S., Korde, N., Björkholm, M., Landgren, O., & Kristinsson, S. Y. (2015). The role of diagnosis and clinical follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on survival in multiple myeloma. *JAMA Oncology*, 1(2), 168–174. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.23>
360. Singh, A., Gupta, S., Yim, B., & Thekkekara, R. (2017). Tumor Lysis Syndrome in Multiple Myeloma: An Increasingly Recognized Risk—A Report of Seven Cases. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 33(1), 41–44. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0731-6>
361. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.32388/j9r853>
362. Slomp, A., Moesbergen, L. M., Gong, J. N., Cuenca, M., von dem Borne, P. A., Sonneveld, P., Huang, D. C. S., Minnema, M. C., & Peperzak, V. (2019). Multiple myeloma with 1q21 amplification is highly sensitive to MCL-1 targeting. *Blood Advances*, 3(24), 4202–4214. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000702>
363. Smith, D., Mann, D., & Yong, K. (2016). Cyclin D type does not influence cell cycle response to DNA damage caused by ionizing radiation in multiple myeloma tumours. *British Journal of Haematology*, 173(5), 693–704. <https://doi.org/10.1111/bjh.13982>
364. Soriano, G. P., Besse, L., Li, N., Kraus, M., Besse, A., Meeuwenoord, N., Bader, J., Everts, B., Den Dulk, H., Overkleeft, H. S., Florea, B. I., & Driessen, C. (2016). Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox

- and energy metabolism. *Leukemia*, 30(11), 2198–2207. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.102>
365. Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
 366. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Jennifer, A., Biophysics, M., Biology, C., Division, B., & Berkeley, L. (2014). *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9*. 507(7490), 62–67.
 367. Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 189–200. <https://doi.org/10.1038/nri1568>
 368. Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., & Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. In *Nature*, 348(6299), 331–333. <https://doi.org/10.1038/348331a0>
 369. Tagueja, N., & Nagi, J. (2010). Bendamustine: Something old, something new. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66(3), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1317-x>
 370. Tai, Y., Dillon, M., Song, W., Leiba, M., Li, X., Burger, P., Lee, A. I., Podar, K., Hideshima, T., Rice, A. G., Abbema, A. Van, Jesaitis, L., Caras, I., Law, D., Weller, E., Xie, W., Richardson, P., Munshi, N. C., Mathiot, C., ... Elisa, C. S. (2016). Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood Journal*, 112(4), 1329–1338. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107292>.The
 371. Tait, S.W., and Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. Cold Spring Harb. Perspect. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008706.
 372. Takakura, K., Kawamura, A., Torisu, Y., Koido, S., Yahagi, N., & Saruta, M. (2019). The clinical potential of oligonucleotide therapeutics against pancreatic cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133331>
 373. Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., Wong, C. S. T., Wu, H. Y., Law, H. T., Liu, K., Talbot, C. C., Lau, W. K., Montell, D.

- J., & Fung, M. C. (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Molecular Biology of the Cell*, 23(12), 2240–2252. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0926>
374. Tao, Z. F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A. M., Park, C. H., Boghaert, E. R., Catron, N. D., Chen, J., Colman, P. M., Czabotar, P. E., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Flygare, J. A., Hymowitz, S. G., Jin, S., Judge, R. A., Koehler, M. F. T., Kovar, P. J., ... Souers, A. J. (2014). Discovery of a potent and selective BCL-XL inhibitor with in vivo activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 5(10), 1088–1093. <https://doi.org/10.1021/ml5001867>
375. Tatsuno, K., Han, P., Edelson, R., & Hanlon, D. (2021). Detection of Immunogenic Cell Death in Tumor Vaccination Mouse Model. In A. B. Alvero & G. G. Mor (Eds.), *Detection of Cell Death Mechanisms. Methods and Protocols* (Vol. 2255, pp. 171–186). <http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1162-3>
376. Teicher, B. A., & Tomaszewski, J. E. (2015). Proteasome inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 96(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.008>
377. Tessoulin, B., Moreau-Aubry, A., Descamps, G., Gomez-Bougie, P., Maïga, S., Gaignard, A., Chiron, D., Ménoret, E., Le Gouill, S., Moreau, P., Amiot, M., & Pellat-Deceunynck, C. (2018). Whole-exon sequencing of human myeloma cell lines shows mutations related to myeloma patients at relapse with major hits in the DNA regulation and repair pathways. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0679-0>
378. Thorburn, J., Moore, F., Rao, A., Barclay, W. W., Thomas, L. R., Grant, K. W., Cramer, S. D., & Thorburn, A. (2005). Selective Inactivation of a Fas-associated Death Domain Protein (FADD)-dependent Apoptosis and Autophagy Pathway in Immortal Epithelial Cells. *Mol Biol Cell*, 16, 5318–5328. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
379. Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Leverson, J. D., Souers, A. J., Maïga, S., Béné, M. C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., & Amiot, M. (2014). The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: A promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*, 28(1), 210–212. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.216>
380. Touzeau, C., Maciag, P., Amiot, M., & Moreau, P. (2018). Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, 32(9), 1899–1907.

- <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0223-9>
381. Touzeau, C., Ryan, J., Moreau, P., Chonghaile, T. N., Le Gouill, S., Richardson, P., Anderson, K., Amiot, M., & Letai, A. (2016). BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia*, 30(July 2015), 761–764. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.184>
 382. Tundo, G. R., Sbardella, D., Santoro, A. M., Coletta, A., Oddone, F., Grasso, G., Milardi, D., Lacal, P. M., Marini, S., Purrello, R., Graziani, G., & Coletta, M. (2020). The proteasome as a druggable target with multiple therapeutic potentialities: Cutting and non-cutting edges. *Pharmacology and Therapeutics*, 213, 107579. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107579>
 383. Twycross, R. (1994). The Risks and Benefits of Corticosteroids in Advanced Cancer. *Drug Safety*, 11(3), 163–178. <https://doi.org/10.2165/00002018-199411030-00003>
 384. Valentin, R., Grabow, S., & Davids, M. S. (2018). The rise of apoptosis: Targeting apoptosis in hematologic malignancies. *Blood*, 132(12), 1248–1264. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-791350>
 385. Valle, C. W., Min, T., Bodas, M., Mazur, S., Begum, S., Tang, D., & Vij, N. (2011). Critical role of VCP/p97 in the pathogenesis and progression of non-small cell lung carcinoma. *PLoS ONE*, 6(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029073>
 386. van de Donk, N. W. C. J., & Yong, K. (2019). Oral proteasome inhibitor maintenance for multiple myeloma. *The Lancet*, 393(10168), 204–205. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)33128-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33128-3)
 387. Vaxman, I., Visram, A., Kumar, S., Dispenzieri, A., Buadi, F., Dingli, D., Lacy, M., Muchtar, E., Kapoor, P., Hogan, W., Hayman, S., Leung, N., Gonsalves, W., Kourelis, T., Warsame, R., Berger, T., & Gertz, M. A. (2020). Autologous stem cell transplantation for multiple myeloma patients aged ≥ 75 treated with novel agents. *Bone Marrow Transplantation*. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01159-9>
 388. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, 75(2), 229–240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80065-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80065-M)

389. Vogl, D. T., Stadtmauer, E. A., Tan, K. S., Heitjan, D. F., Davis, L. E., Pontiggia, L., Rangwala, R., Piao, S., Chang, Y. C., Scott, E. C., Paul, T. M., Nichols, C. W., Porter, D. L., Kaplan, J., Mallon, G., Bradner, J. E., & Amaravadi, R. K. (2014). Combined autophagy and proteasome inhibition a phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. *Autophagy*, 10(8), 1380–1390. <https://doi.org/10.4161/auto.29264>
390. Walker, B. A., Boyle, E. M., Wardell, C. P., Murison, A., Begum, D. B., Dahir, N. M., Proszek, P. Z., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Melchor, L., Aronson, L. I., Scales, M., Pawlyn, C., Mirabella, F., Jones, J. R., Brioli, A., Mikulasova, A., Cairns, D. A., Gregory, W. M., ... Morgan, G. J. (2015). *Mutational Spectrum , Copy Number Changes , and Outcome : Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1503>
391. Wang, F., Gómez-Sintes, R., & Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, 19(12), 918–931. <https://doi.org/10.1111/tra.12613>
392. Wang, M., Han, X. H., Zhang, L., Yang, J., Qian, J. F., Shi, Y. K., Kwak, L. W., Romaguera, J., & Yi, Q. (2008). Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia*, 22(1), 179–185. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404959>
393. Wang, W., Yang, X., Li, C., Li, Y., Wang, H., & Han, X. (2021). Immunogenic Cell Death (ICD) of Murine H22 Cells Induced by Lentinan. *Nutrition and Cancer*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1897632>
394. Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death and Disease*, 10(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
395. Wärrri, A., Cook, K. L., Hu, R., Jin, L., Zwart, A., Soto-Pantoja, D. R., Liu, J., Finkel, T., & Clarke, R. (2018). Autophagy and unfolded protein response (UPR) regulate mammary gland involution by restraining apoptosis-driven irreversible changes. *Cell Death Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0105-y>
396. Weeden, C. E., Ah-cann, C., Holik, A. Z., Garnier, J. P. J., Merino, D., & Lessene, G. (2018). Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition. *Oncogene*, 4475–4488. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0268-2>
397. Wei, A. H., Roberts, A. W., Spencer, A., Rosenberg, A. S., Siegel, D., Walter, R.

- B., Caenepeel, S., Hughes, P., McIver, Z., Mezzi, K., Morrow, P. K., & Stein, A. (2020). Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood Reviews*, 44(xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100672>
398. Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes and Development*, 14(16), 2060–2071. <https://doi.org/10.1101/gad.14.16.2060>
399. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., Macgregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517), 727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>
400. Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H. M., & Green, D. R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), 127–136. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.149>
401. Wemeau, M., Kepp, O., Tesnière, A., Panaretakis, T., Flament, C., De Botton, S., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Chaput, N. (2010). Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death and Disease*, 1(12), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.82>
402. Whitfield, J. R., Beaulieu, M. E., & Soucek, L. (2017). Strategies to inhibit Myc and their clinical applicability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>
403. Wilkinson, K. D. (2005). The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43), 15280–15282.
404. Wójcik, C., Yano, M., & DeMartino, G. N. (2004). RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *Journal of Cell Science*, 117(2), 281–292. <https://doi.org/10.1242/jcs.00841>
405. Xiang, W., Yang, C. Y., & Bai, L. (2018). MCL-1 inhibition in cancer treatment. *OncoTargets and Therapy*, 11, 7301–7314. <https://doi.org/10.2147/OTT.S146228>
406. Yaccoby, B. 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*. 2908–2913.
407. Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 39–48. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.40>
 408. Yan, J., Zhang, H., Xiang, J., Zhao, Y., Yuan, X., Sun, B., & Lin, A. (2018). The BH3-only protein BAD mediates TNF α cytotoxicity despite concurrent activation of IKK and NF- κ B in septic shock. *Cell Research*, 28(7), 701–718. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0041-7>
 409. Yang, D. T., Young, K. H., Kahl, B. S., Markovina, S., & Miyamoto, S. (2008). Prevalence of bortezomib-resistant constitutive NF-kappaB activity in mantle cell lymphoma. *Molecular Cancer*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-40>
 410. Ye, X., Zhou, X. J., & Zhang, H. (2018). Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02334>
 411. Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., & Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, 400(6747), 886–891. <https://doi.org/10.1038/23730>
 412. Ying, Y., & Padanilam, B. J. (2016). Regulation of necrotic cell death p53, PARP1 and Cyclophilin D- overlapping pathways of regulated necrosis? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(11–12), 2309–2324. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2202-5>. Regulation
 413. You, Y., Cheng, A. C., Wang, M. S., Jia, R. Y., Sun, K. F., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Chen, S., Liu, M. F., Zhao, X. X., & Chen, X. Y. (2017). The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death and Disease*, 8(4), 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.139>
 414. Youle, R. J., & Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
 415. Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., & Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1124–1132. <https://doi.org/10.1038/ncb1482>

416. Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Bone*, 27(1), 71–83. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>.
417. Yuan, B. Z., Chapman, J., & Reynolds, S. H. (2009). Proteasome inhibitors induce apoptosis in human lung cancer cells through a positive feedback mechanism and the subsequent Mcl-1 protein cleavage. *Oncogene*, 28(43), 3775–3786. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.240>
418. Yuan, J., & Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes and Development*, 24(23), 2592–2602. <https://doi.org/10.1101/gad.1984410>
419. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641–652. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90485-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90485-9)
420. Yue, D., & Sun, X. (2019). Ixazomib promotes CHOP-dependent DR5 induction and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 20(3), 284–294. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1529095>
421. Zeng, C., Zeng, B., Dong, C., Liu, J., & Xing, F. (2020). Rho-ROCK signaling mediates entotic cell death in tumor. *Cell Death Discovery*, 6(1), 10–12. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0238-7>
422. Zhang, B., Gojo, I., & Fenton, R. G. (2002). Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*, 99(6), 1885–1893. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.1885>
423. Zhang, K., Desai, A., Zeng, D., Gong, T., Lu, P., & Wang, M. (2017). Magic year for multiple myeloma therapeutics: Key takeaways from the ASH 2015 annual meeting. *Oncotarget*, 8(6), 10748–10759. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13314>
424. Zhang, L., Pham, L. V., Newberry, K. J., Ou, Z., Liang, R., Qian, J., Sun, L., Blonska, M., You, Y., Yang, J., Lin, X., Rollo, A., Tamayo, A. T., Lee, J., Ford, R. J., Zhao, X., Kwak, L. W., Yi, Q., & Wang, M. (2013). In vitro and in vivo therapeutic efficacy of carfilzomib in mantle cell lymphoma: Targeting the immunoproteasome. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(11), 2494–2504. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0156>
425. Zhang, X., Lin, C., Song, J., Chen, H., Chen, X., Ren, L., Zhou, Z., Pan, J., Yang, Z., Bao, W., Ke, X., Yang, J., Liang, Y., Huang, H., Tang, D., Jiang, L., & Liu, J.

- (2019). Parkin facilitates proteasome inhibitor-induced apoptosis via suppression of NF- κ B activity in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*, 10(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1881-x>
426. Zhang, X., Xu, Q., Zhang, Z., Cheng, W., Cao, W., Jiang, C., Han, C., Li, J., & Hua, Z. (2016). Chloroquine enhanced the anticancer capacity of VNP20009 by inhibiting autophagy. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep29774>
427. Zhang, Y., Ishida, C. T., Shu, C., Kleiner, G., Sanchez-Quintero, M. J., Bianchetti, E., Quinzii, C. M., Westhoff, M. A., Karpel-Massler, G., & Siegelin, M. D. (2018). Inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and c-MET causes synthetic lethality in model systems of glioblastoma. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25802-0>
428. Zhao, X. Y., Wang, X. Y., Wei, Q. Y., Xu, Y. M., & Lau, A. T. Y. (2020). Potency and Selectivity of SMAC/DIABLO Mimetics in Solid Tumor Therapy. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9041012>
429. Zheng, W., Xie, W., Yin, D., Luo, R., Liu, M., & Guo, F. (2019). ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0353-3>
430. Zhu, F., Zhang, W., Yang, T., & He, S. dan. (2019). Complex roles of necroptosis in cancer. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 20(5), 399–413. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900160>
431. Zhu, H., Guo, W., Zhang, L., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J. J., Dong, F., & Fang, B. (2005). Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biology and Therapy*, 4(7), 781–786. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.7.1897>
432. Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B., & Andrews, D. W. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Blood*, 89(10), 3817–3825. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00788.x>
433. Zong, W. X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes and Development*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1101/gad.1376506>

