

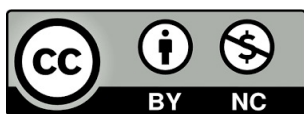
Andrea Benedí Visiedo

Miméticos bh3 e inhibidores de
aurora quinasa y de hsp90:
estudio de su mecanismo de
acción y búsqueda de
combinaciones potencialmente
sinérgicas en células de tumores
sólidos y de mieloma múltiple

Director/es

Marzo Rubio, Isabel
Naval Iraberri, José Javier

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



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MIMÉTICOS BH3 E INHIBIDORES DE AURORA
QUINASA Y DE HSP90: ESTUDIO DE SU
MECANISMO DE ACCIÓN Y BÚSQUEDA DE
COMBINACIONES POTENCIALMENTE
SINÉRGICAS EN CÉLULAS DE TUMORES
SÓLIDOS Y DE MIELOMA MÚLTIPLE

Autor

Andrea Benedí Visiedo

Director/es

Marzo Rubio, Isabel
Naval Iraberri, José Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2024

Tesis Doctoral

MIMÉTICOS BH3 E INHIBIDORES DE AURORA QUINASA Y DE HSP90: ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCIÓN Y BÚSQUEDA DE COMBINACIONES POTENCIALMENTE SINÉRGICAS EN CÉLULAS DE TUMORES SÓLIDOS Y DE MIELOMA MÚLTIPLE

Autor

Andrea Benedí Visiedo

Director/es

Isabel Marzo Rubio

José Javier Naval Iraberri

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza

Escuela de Doctorado

2023



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis Doctoral

**MIMÉTICOS BH3 E INHIBIDORES DE
AURORA QUINASA Y DE HSP90:
ESTUDIO DE SU MECANISMO DE
ACCIÓN Y BÚSQUEDA DE
COMBINACIONES POTENCIALMENTE
SINÉRGICAS EN CÉLULAS DE TUMORES
SÓLIDOS Y DE MIELOMA MÚLTIPLE**

Andrea Benedí Visiedo

2023



**Universidad
Zaragoza**

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, Catedrática de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Miméticos BH3 e inhibidores de Aurora quinasa y de Hsp90: estudio de su mecanismo de acción y búsqueda de combinaciones potencialmente sinérgicas en células de tumores sólidos y de mieloma múltiple*” ha sido realizada por Andrea Benedí Visiedo 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 por la Universidad de Zaragoza dentro del Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Zaragoza, Diciembre 2023

Fdo.: José Javier Naval Iraberri

Fdo.: Isabel Marzo Rubio

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a:

- Dos contratos con cargo a actividades de investigación desarrolladas en el grupo de referencia *Inmunidad, cáncer y células madre* subvencionadas por el Gobierno de Aragón, y una de ellas cofinanciada por el Programa Operativo FEDER Aragón 2014-2020 (PUI/2018-239 y PUI/2021-219).
- Dos contratos con cargo a proyectos I+D+i subvencionados por el Gobierno de Aragón y cofinanciados por el Programa Operativo FEDER Aragón 2014-2020 (Referencia LMP98_18) (convocatorias PUI/2019-329 y PUI/2020-202).
- Un contrato predoctoral financiado por el Vicerrectorado de Política Científica de la Universidad de Zaragoza (convocatoria PI-PRD/2021-002; BOA nº 175, 23 de Agosto de 2021).



Programa Operativo Fondo Europeo de Desarrollo Regional de Aragón 2014-2020
Construyendo Europa desde Aragón



Vicerrectorado de
Política Científica
Universidad Zaragoza

Resumen

El cáncer constituye un problema de salud a nivel mundial, con millones de decesos al año. Los avances conseguidos en las últimas décadas en el ámbito terapéutico del cáncer, entre los que se incluye la incorporación de terapias dirigidas en las pautas de tratamiento, han conseguido mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, hoy en día todavía no existe una cura, por lo que urge descubrir nuevas dianas terapéuticas, desarrollar nuevas moléculas dirigidas más específicas y seguras y hallar la estrategia antitumoral más eficaz para cada tipo de cáncer e, incluso, paciente.

Las proteínas de la familia Bcl-2, las quinasas mitóticas de la familia Aurora y las proteínas de choque térmico como la chaperona Hsp90 se han erigido como potenciales dianas terapéuticas dada su frecuente sobreexpresión en las células tumorales y su contribución a las señas de identidad del cáncer. Esto ha favorecido el desarrollo de compuestos dirigidos contra cada una de estas familias de proteínas: los miméticos BH3, que neutralizan a los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y activan la respuesta apoptótica; los inhibidores de Aurora quinasa, que provocan fallos en la mitosis y la citoquinesis; y los inhibidores de Hsp90, que impiden la estabilización y activación de multitud de proteínas cliente, incluidas oncoproteínas. Por todo ello, en la presente tesis se ha pretendido profundizar en el estudio del mecanismo de acción de estas familias de inhibidores y se ha evaluado su potencial antitumoral como agentes únicos o combinados en un panel de ocho líneas celulares tumorales establecidas: cinco de mieloma múltiple (NCI-H929, MM.1S, U266, RPMI 8226 y OPM-2), una de cáncer de pulmón (A549), otra de cáncer de colon (HCT-116) y otra de cáncer pancreático (MIA PaCa-2).

Los resultados aquí obtenidos revelan que los miméticos BH3 ABT-737 (inhibidor de Bcl-2/Bcl-X_L/Bcl-w), ABT-199 (antagonista de Bcl-2), A-1155463 (inhibidor de Bcl-X_L) y S63845 (inhibidor de Mcl-1) despliegan una actividad citotóxica variable en las tres líneas celulares de tumores sólidos y son más eficaces activando la vía autofágica en las células A549 que en las células de mieloma múltiple. Curiosamente, estos compuestos no modifican de forma significativa el perfil de expresión de la mayoría de las proteínas de la familia Bcl-2 evaluadas en las células de mieloma, exceptuando la sobreexpresión de Mcl-1 después del tratamiento con su antagonista y la caída generalizada de PUMA tras la acción de los inhibidores en casi todas las líneas celulares. Además, hemos confirmado que los miméticos BH3 actúan únicamente a través de la vía intrínseca de la apoptosis, aunque hemos descubierto que la participación de Bim en este proceso no es especialmente relevante en las células de mieloma, salvo en el caso de S63845 y A-1155463, este último solo para las células OPM-2. Por lo tanto, pensamos que otras proteínas “solo-BH3” están implicadas en dicho mecanismo apoptótico. Además, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de Bcl-X_L y Mcl-1 actúa como mecanismo de resistencia frente a los inhibidores selectivos de cada proteína anti-apoptótica.

Por otro lado, alisertib (inhibidor de Aurora A) y barasertib (inhibidor de Aurora B) exhiben potencial citostático y citotóxico en las células de mieloma y ambos efectos son mayores a largo plazo. Por un lado, relacionamos el potencial citostático de estos compuestos con la parada mitótica que inducen. La acumulación de ciclina B1 hallada tras la acción de alisertib indica que este compuesto provoca un arresto mitótico prolongado y, en consecuencia, se activa la catástrofe mitótica, mientras que niveles más bajos de esta proteína después del tratamiento con barasertib se asocian con una parada transitoria que las células evaden a través del deslizamiento mitótico. En estos casos, los posibles destinos celulares son la muerte, la entrada en un estado de senescencia o la inducción de poliploidía. De hecho, nuestros resultados confirman que alisertib y barasertib conducen a estos tres destinos finales en todas las líneas celulares de mieloma, lo que reafirma la heterogeneidad en la respuesta a un mismo tratamiento entre líneas celulares e incluso dentro de un mismo cultivo, descrita en otros estudios. No obstante, alisertib posee mayor potencial citotóxico, mientras que barasertib es un inductor de poliploidía más potente. Además, barasertib también induce senescencia en células de tumores sólidos, como se ha comprobado en células tumorales de páncreas en este estudio y en otras líneas celulares de tumores sólidos en trabajos anteriores del grupo. Por otro lado, también hemos observado que los inhibidores de Aurora quinasa son capaces de inducir autofagia de manera más eficaz en las células de cáncer de pulmón que en las de mieloma múltiple.

En cuanto a su efecto citotóxico, alisertib ha mostrado dos perfiles de toxicidad distintos en varias líneas celulares, lo que nos lleva a pensar que este inhibidor posee dos mecanismos de acción distintos: uno a dosis bajas en el que inhibiría exclusivamente a Aurora A y otro a dosis altas en el que también bloquearía a Aurora B, algo que ya ha sido propuesto por otros autores. En cualquier caso, nuestros resultados indican que ambos inhibidores inducen la caída del potencial mitocondrial y la liberación del citocromo c, eventos que también se producirían en respuesta a alisertib a dosis bajas incluso cuando la ruta apoptótica mitocondrial se encuentra bloqueada. Sin embargo, ambos compuestos provocan un incremento de la expresión de Mcl-1 y/o Bcl-2, así como un aumento o reducción de los niveles de PUMA en función de la línea celular y/o el tratamiento aplicado. Asimismo, determinamos que Bim está implicada en la acción citotóxica de alisertib en las células U266 y en las OPM-2 cuando estas se sometían a exposiciones prolongadas. Además, encontramos que la sobreexpresión de Bcl-X_L y/o Mcl-1 otorga resistencia frente a docetaxel y alisertib, pero no frente a vincristina, y concluimos que algunos antimitóticos activan mecanismos de muerte independientes de Bax y Bak. Finalmente, determinamos que la implicación de las caspasas en la muerte ocasionada por alisertib y barasertib depende de la línea celular y que su contribución es mayor cuando alisertib se utiliza en el rango nanomolar y la vía apoptótica mitocondrial se encuentra inhibida.

Un análisis más exhaustivo del efecto de los inhibidores de Aurora quinasa a nivel mitocondrial indica que alisertib y barasertib a dosis altas provocan la hiperpolarización de las mitocondrias en las células RPMI 8226. Además, ambos compuestos incrementan la masa mitocondrial y la producción de ROS mitocondriales en todas las células de mieloma, incluso teniendo en cuenta que ambos aumentan el tamaño celular. Los resultados obtenidos con células leucémicas desprovistas de DNA mitocondrial sugieren que los ROS mitocondriales están implicados en la toxicidad asociada a ambos inhibidores. Sin embargo, los inhibidores metabólicos DCA (que inhibe la glucólisis y fomenta el uso del sistema OXPHOS) y metformina (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria) no afectan de manera uniforme a la producción de ROS mitocondriales en respuesta a los inhibidores de Aurora quinasa. Por otro lado, consideramos que los ROS totales contribuyen de manera parcial a la acción citotóxica de alisertib y barasertib en algunas líneas celulares.

Por su parte, los inhibidores de Hsp90 17-AAG (tanespimicina) y KW-2478 despliegan una toxicidad mayor en las células de mieloma que en las células de cáncer de pulmón, siendo las más sensibles las células MM.1S. Además, a partir de estudios con células deficientes en Bax y Bak deducimos que estos compuestos activan las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis y otros mecanismos de muerte alternativos. Por otro lado, en las células A549 observamos que ambos inhibidores inducen la parada en mitosis, pero no conducen a un estado de senescencia.

Finalmente, en cuanto a las combinaciones evaluadas, la combinación simultánea de miméticos BH3 y fármacos antimitóticos, incluidos alisertib y barasertib, se muestra más efectiva en células de tumores sólidos que de mieloma múltiple, siendo las combinaciones más sinérgicas aquellas que se producen en las células A549 cuando se inhibe Bcl-X_L. No obstante, si la inhibición de las proteínas Aurora y las proteínas anti-apoptóticas se produce de manera secuencial en las células de mieloma NCI-H929, MM.1S y U266, se induce una modesta sinergia. Además, nuestros resultados indican que los miméticos BH3 reducen la viabilidad de las células MIA PaCa-2 senescentes, mientras que ABT-737 y A-1155463 exhiben actividad senolítica en las células A549 senescentes y la muerte inducida es parcialmente dependiente de caspasas cuando se inhibe específicamente Bcl-X_L. En cuanto a la combinación simultánea de los miméticos BH3 y los inhibidores de Hsp90, esta se revela sinérgica en las células A549, especialmente cuando se inhibe Mcl-1, y en las líneas celulares de mieloma NCI-H929, MM.1S y U266. En cambio, si alisertib y barasertib actúan conjuntamente se induce un efecto antagónico en la mayoría de las líneas celulares de mieloma. Por otro lado, la combinación secuencial de alisertib/barasertib y panobinostat (inhibidor de histona deacetilasas), induce un efecto sinérgico en algunas líneas celulares, siendo especialmente llamativo el observado en las células NCI-H929 cuando se utilizan dosis altas de alisertib.

En conjunto, todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en el estudio del mecanismo de acción de los compuestos aquí evaluados para tratar de identificar posibles marcadores que ayuden a predecir la respuesta a los tratamientos. Asimismo, dado que algunas combinaciones se han mostrado sinérgicas, se requieren más estudios que evalúen su eficacia a otros niveles y permitan concluir si pueden resultar beneficiosas para algún grupo de pacientes.

Abreviaturas, siglas y acrónimos

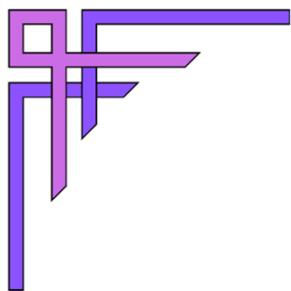
(c-)FLIP: Cellular FLICE-like Inhibitory Protein
(c-)IAP(1/2): (Cellular-)Inhibitor of Apoptosis Protein (1/2)
(C/O-)MAD(1/2): (Closed/Open-)Mitotic Arrest-Deficient protein (1/2)
(d)ATP: (Deoxy)adenosine triphosphate
(D)KO: (Double) knockout
(I)CAD: (Inhibitor of) Caspase-Activated DNase
(R-)ISS: (Revised-)International Staging System
7-AAD: 7-Aminoactinomycin D
a. C.: antes de Cristo
ABB: Annexin V Binding Buffer
ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP: Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADO: Adenosine
AIF: Apoptosis-Inducing Factor
Akt:
ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia
Ambra1: Autophagy and beclin 1 regulator 1
AML: Acute Myeloid Leukemia
AMPK: AMP-activated Protein Kinase
Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1
APC/C: Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome
APL: Acute Promyelocytic Leukemia
APS: Ammonium persulfate
ARF: Alternative Reading Frame
ASCT: Autologous Stem Cell Transplant
ATCC: American Type Culture Collection
ATF6: Activating Transcription Factor 6
ATG: Autophagy-related
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
B7-H3: B7 Homolog 3
Bad: Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax: Bcl-2-associated X
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bcl-B: Bcl-2-like protein 10; BCL2L10
Bcl-w: Bcl-2-like protein 2; BCL2L2
Bcl-X_L: B-cell lymphoma-extra large
BCMA: B-Cell Maturation Antigen
Bfl-1/A1: Bcl-2-related protein A1
BH: Bcl-2 homology

Bid: BH3-interacting domain death agonist
Bif-1: Bax-Interactin Factor-1
Bik: Bcl-2-interacting killer
Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death
BiTE: Bispecific T-cell engager
BMF: Bcl-2 Modifying Factor
BMSC: Bone Marrow Stromal Cells
BNIP3: Bcl-2 Interacting Protein 3
Bok: Bcl-2-related ovarian killer
BPDCN: Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm
BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA: Bovine Serum Albumin
BSO: L-buthionine-(S,R)-sulfoximine
BUB(1/3): Budding Uninhibited by Benzimidazoles (1/3)
BUBR1: Budding Uninhibited by Benzimidazole-Related 1
C/EBP β : CCAAT (cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine)/Enhancer-Binding Protein β
CAD: Caspase-Activated DNase
CAFs: Cancer-Associated Fibroblasts
CAK: CDK Activating Kinase
CAR: Chimeric Antigen Receptor
CCL(2/27): C-C motif chemokine ligand (2/27)
CCLE: Cancer Cell Line Encyclopedia
CD(28/80/86): Cluster of Differentiation (28/80/86)
CD158a: Cluster of Differentiation 158 a
CD161: Cluster of Differentiation 161
CD19: Cluster of Differentiation 19
CD3: Cluster of Differentiation 3
CD38: Cluster of Differentiation 38
CD95/Apo-1: Cluster of Differentiation 95 / Apoptosis antigen 1
CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity
CDC20: Cell Division Cycle protein 20 homolog
CDC25: Cell Division Cycle 25
Cdh1: CDC20 homolog 1
CDK: Cyclin-Dependent Kinase
CELMoDs: Cereblon E3 ligase modulators
CENP-E: Centromere-associated protein-E

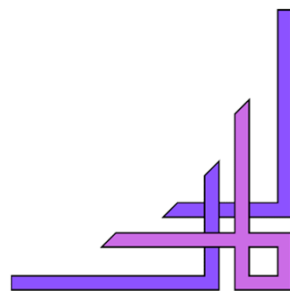
cGAS/STING: Cyclic GMP (guanosine monophosphate)-AMP (adenosine monophosphate) synthase/Stimulator of Interferon Genes	EndoG: Endonuclease G
CHK(1/2): Checkpoint Kinase (1/2)	ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
CHOP: C/EBP homologous protein	FADD: Fas-Associated Death Domain
Cip/Kip: CDK Interacting Protein / Kinase Inhibitory Protein	FAM46C: Family with sequence similarity 46, member C
CLL: Chronic Lymphocytic Leukemia	FasL: Fas Ligand
CML: Chronic Myeloid Leukemia	FAT3: FAT atypical cadherin 3
CNA: Copy Number Alteration	FDA: Food and Drug Administration
COX2: Cyclooxygenase 2	FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
CPC: Chromosomal Passenger Complex	FIP200: FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa)
CRAB: Hypercalcemia-renal insufficiency-anaemia-bone lesions	FLT3: FMS-like tyrosine kinase 3
CRBN: Cereblon	GABARAP-L1: GABA (Gamma-aminobutyric acid) Type A Receptor Associated Protein-Like 1
CT: Computed Tomography	GADPH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
CYLD: Cyclindromatosis	GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
CYPD: Cyclophilin D	GPX4: Glutathione peroxidase 4
d. C.: después de Cristo	GSH: Glutathione
DAD: D-box-Activating Domain	Hax-1: HCLS1-associated protein X-1
DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns	HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
DAPK: Death-Associated Protein Kinase	HDACs: Histone deacetylases
DCA: Dichloroacetate	HIF-1α: Hypoxia-Inducible Factor-1 α
DDR: DNA Damage Response	HOXB3: Homeobox B3
DD: Death Domain	hQPA: hydroxyquinazoline pyrazol anilide
DED: Death Effector Domain	Hrk: Harakiri
DiOC₆(3): 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide	Hsc70: Heat shock cognate 71 kDa
DIS3: Exosome complex exonuclease RRP44	Hsp(70/90): Heat shock protein (70/90 kDa)
DISC: Death-Inducing Signaling Complex	HUWE1: HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma	IC₅₀: Half-maximal Inhibitory Concentration
DLIs: Donor Lymphocyte Infusions	ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium	ICD: Immunogenic Cell Death
DMSO: Dimethyl sulfoxide	IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
DNA: Deoxyribonucleic acid	ICSA: International Cell Senescence Association
DNAM-1: DNAX Accessory Molecule 1	Ig: Immunoglobulin
DR4/DR5: Death Receptor 4/5	IGH: Immunoglobulin heavy locus
DRAM: DNA damage-Regulated Autophagy Modulator	IKZF(1/3): Ikaros zinc finger protein (1/3)
DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)	IL: Interleukin
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid	IMiDs: Immunomodulatory Drugs
EG5: Kinesin-5	IMWG: International Myeloma Working Group
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	INCENP: Inner centromere protein
EMA: European Medicines Agency	INK4: Inhibitors of CDK4

IRE1: Inositol Requiring Enzyme 1	NBR1: Next to BRCA1 gene 1
IRF4: Interferon Regulatory Factor 4	NCDD: Nomenclature Committee on Cell Death
ITGB(1/2): Integrin-beta (1/2)	NDP52: Nuclear Dot Protein 52 kDa
IκB: Inhibitor of κB	NET: Neutrophil Extracellular Traps
KEAP1: Kelch-like ECH-Associated Protein 1	NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
KRAS: Kirsten rat sarcoma virus	NHL: Non-Hodgkin Lymphoma
LAMP2A: Lysosome-Associated Membrane glycoprotein type 2A	NK: Natural Killer
LC3: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3	NKG2D: Natural Killer Group 2 member D
LDAC: Low-dose cytarabine	NKT: Natural Killer T
LDGD: Lysosome-Dependent Cell Death	Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1: PMAIP1
LFA-1: Lymphocyte Function-Associated antigen 1	NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase	NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer
Mb: Megabase	OMI/HtrA2: High-temperature requirement protein A2
MCC: Mitotic Checkpoint Complex	OPG: Osteoprotegerin
MCL: Mantle Cell Lymphoma	OXPHOS: Oxidative phosphorylation
Mcl-1: Myeloid cell leukemia-1	p53 (TP53): Tumor protein p53
MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells	PARP(1): Poly [ADP-ribose] polymerase (1)
MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts	PAX5: Paired box 5
MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance	PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells
MHC: Major Histocompatibility Complex	PBS: Phosphate Buffered Saline
MiDAS: Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence	PD-1: Programmed cell death protein 1
MIF: Macrophage migration inhibitory factor	PD-L(1/2): Programmed cell death protein ligand (1/2)
MILs: Marrow-Infiltrating Lymphocytes	PKD: Pyruvate dehydrogenase kinase
miRNA: Micro ribonucleic acid	PERK: Protein kinase RNA-activated (PRK)-like ER kinase
ML-IAP: Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein	PET-CT: Positron Emission Tomography-Computed Tomography
MLKL: Mixed Lineage Kinase domain-Like	PGAM5: Phosphoglycerate mutase 5
MM: Multiple myeloma	PI: Propidium Iodide / Proteasome inhibitor
MMAF: Monomethyl auristatin F	PIDD: P53-induced protein with a death domain
MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization	PIK3C3: Phosphatidylinositol 3-Kinase catalytic subunit type 3
MPT: Mitochondrial Permeability Transition	PLK1: Polo-Like Kinase 1
MRI: Magnetic Resonance Imaging	PP1: Protein Phosphatase 1
mRNA: Messenger ribonucleic acid	PP2A: Protein Phosphatase 2A
mSMART: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy	pRb (RB1): Retinoblastoma protein
Mps1: Multipolar spindle 1	PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin	PTCL: Peripheral T-Cell Lymphoma
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	PtdIns3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
MUC1: Mucin 1	PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
Myc (MYC): Myelocytomatosis	PUMA: p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
	RANK(L): Receptor activator of NF-κB (ligand)
	RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

Ras: <i>Rat sarcoma virus</i>	Th17: <i>T-helper 17 cells</i>
RCD: <i>Regulated Cell Death</i>	TILs: <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
RIPK(1/3): <i>Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase (1/3)</i>	TLC-S: <i>Taurolithocholate acid sulfate</i>
RNS: <i>Reactive Nitrogen Species</i>	TMD: <i>Transmembrane domain</i>
ROBO1: <i>Roundabout guidance receptor 1</i>	TMRE: <i>Tetramethylrhodamine ethyl ester</i>
ROCK-1: <i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1</i>	TNF(α): <i>Tumor Necrosis Factor(alpha)</i>
ROS: <i>Reactive Oxygen Species</i>	TNFR1: <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
RPMI (medio): <i>Roswell Park Memorial Institute</i>	TRADD: <i>TNFR1-associated death domain</i>
RRID: <i>Research resource identifiers</i>	TRAF3: <i>TNF Receptor-Associated Factor 3</i>
SA β-gal: <i>Senescence-associated beta-galactosidase</i>	TRAIL: <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
SAC: <i>Spindle Assembly Checkpoint</i>	Treg: <i>T regulatory cell</i>
SAHF: <i>Senescence-Associated Heterochromatin Foci</i>	UBA: <i>Ubiquitin-associated</i>
SASP: <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>	ULK1: <i>Unc-51-Like autophagy activating Kinase 1</i>
SCLC: <i>Small Cell Lung Cancer</i>	UPR: <i>Unfolded Protein Response</i>
SDS-PAGE: <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>	UVRAG: <i>UV radiation Resistance-Associated Gene</i>
SINE: <i>Selective Inhibitor of Nuclear Export</i>	VCAM-1: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
SLAMF7: <i>Signaling lymphocytic activation molecule family member 7</i>	VDAC2: <i>Voltage-Dependent Anion-selective Channel 2</i>
SLL: <i>Small Lymphocytic Lymphoma</i>	VEGF-A: <i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
Smac/DIABLO: <i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI</i>	VEGFR: <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
SMM: <i>Smoldering Multiple Myeloma</i>	VPS(15/34): <i>Vacuolar Protein Sorting (15/34)</i>
SP140: <i>Speckled Protein 140</i>	WAF1: <i>Wild-Type p53-Activated Fragment 1</i>
STAT3: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	Wee1: <i>Wee1-like protein kinase</i>
T-FL: <i>Transformed Follicular Lymphoma</i>	XIAP: <i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
TCR: <i>T-Cell Receptor</i>	XKR8: <i>XK-Related protein 8</i>
TEMED: <i>Tetramethylethylenediamine</i>	XPO1: <i>Exportin 1</i>
TGF-β: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>	Z-DEVD(-FMK): <i>N-Benzyloxycarbonyl-aspartyl-glutamyl-valyl-aspartyl fluoromethyl ketone</i>
	Z-IETD(-FMK): <i>N-Benzyloxycarbonyl-isoleucyl-glutamyl-theronyl-aspartic acid fluoromethyl ketone</i>
	Z-VAD(-FMK): <i>N-Benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl] fluoromethyl ketone</i>
	γH2AX: <i>Phosphorilated form of H2A histone family member X</i>



ÍNDICE



Índice

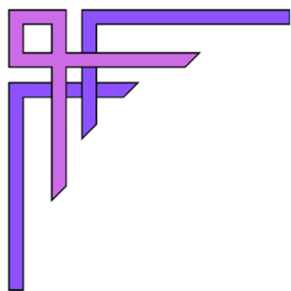
1. Introducción	2
1.1. Muerte celular.....	2
1.1.1. Breve recorrido por la historia de la muerte celular	2
1.1.2. Importancia en fisiología y en patología	2
1.1.3. Tipos de muerte celular	3
1.2. Apoptosis.....	8
1.2.1. Rutas de señalización.....	8
1.2.2. Proteínas de la familia Bcl-2.....	12
1.2.2.1. Modelos de activación de Bax y Bak	16
1.2.3. Caspasas	20
1.2.4. Apoptosis y cáncer.....	23
1.2.5. Muerte celular y el tratamiento del cáncer	25
1.3. Autofagia	30
1.3.1. Mecanismos autofágicos	30
1.3.2. Autofagia y apoptosis	33
1.4. Ciclo celular	35
1.4.1. Puntos de control del ciclo celular.....	38
1.4.2. Catástrofe mitótica	41
1.4.3. Senescencia celular.....	44
1.4.4. Fármacos antimitóticos	49
1.5. Mieloma múltiple: una enfermedad desafiante.....	55
1.5.1. Orígenes ancestrales, primeros casos documentados y observación en otras especies animales.....	55
1.5.2. Prevalencia y etiología	58
1.5.3. Definición y etapas de la enfermedad	59
1.5.4. Sintomatología.....	60
1.5.5. Diagnóstico	61
1.5.6. Citogenética y su relación con la progresión de la enfermedad	62
1.5.7. Sistemas de estadificación y estratificación del riesgo	67
1.5.8. El mieloma múltiple y su microambiente en la médula ósea	67
1.5.9. Catálogo terapéutico y manejo clínico del mieloma múltiple.....	71
1.5.9.1. De la medicina tradicional a la inmunoterapia	71
1.5.9.1.1. Agentes alquilantes.....	71

1.5.9.1.2.	Glucocorticoides.....	72
1.5.9.1.3.	Antraciclinas	72
1.5.9.1.4.	Fármacos inmunomoduladores (IMiDs).....	73
1.5.9.1.5.	Inhibidores del proteasoma (PIs).....	74
1.5.9.1.6.	Inhibidores de histona deacetilasas	76
1.5.9.1.7.	Trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas	77
1.5.9.1.8.	Inmunoterapia: de los anticuerpos monoclonales a la terapia celular adoptiva	77
1.5.9.1.9.	Nuevos enfoques.....	81
1.5.9.2.	Manejo clínico del mieloma múltiple.....	82
2.	Antecedentes y objetivos	85
3.	Materiales y métodos	91
3.1.	Cultivos celulares.....	91
3.1.1.	Líneas celulares.....	91
3.1.2.	Material utilizado para el cultivo celular.....	93
3.1.3.	Mantenimiento de los cultivos celulares	94
3.1.4.	Test de micoplasmas	94
3.1.5.	Criopreservación de las líneas celulares	95
3.2.	Estudio de la proliferación, muerte celular y autofagia	95
3.2.1.	Determinación de la proliferación celular mediante ensayo de reducción del MTT	95
3.2.2.	Análisis de la muerte inducida por citometría de flujo mediante (doble) marcaje con Anexina V (y 7-AAD)	97
3.2.3.	Evaluación de la activación de la autofagia mediante el uso de CYTO-ID®.....	98
3.3.	Determinación de la caspasa-3 activa	99
3.4.	Estudio de parámetros mitocondriales	100
3.4.1.	Evaluación del potencial transmembrana mitocondrial	100
3.4.2.	Determinación de la salida del citocromo c de la mitocondria.....	101
3.4.3.	Detección de ROS mitocondriales y evaluación de la masa mitocondrial.....	101
3.5.	Estudio del ciclo celular	102
3.6.	Detección de senescencia celular mediante la medición de la actividad de la β -galactosidasa lisosomal	103
3.7.	Análisis de la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia....	106
3.8.	Análisis de la expresión de proteínas por <i>Western Blot</i>	106
3.8.1.	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales.....	107
3.8.2.	Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	107
3.8.3.	Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	108

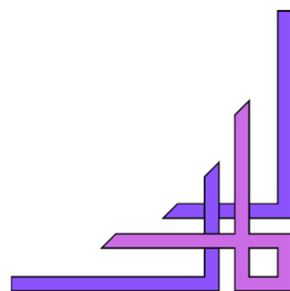
3.8.4. Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia y detección de inmunocomplejos	108
3.9. Análisis estadístico de los datos	110
4. Resultados y discusión – Parte I: Estudio del mecanismo de acción de diferentes agentes quimioterápicos y evaluación de nuevas combinaciones en líneas celulares de tumores sólidos	113
4.1. La inhibición farmacológica de Aurora B induce senescencia en células tumorales pancreáticas	113
4.2. Estudio de la sensibilidad de células de tumores sólidos a miméticos BH3 ...	115
4.3. Los miméticos BH3 y los inhibidores de Aurora quinasa activan la autofagia en células de cáncer de pulmón	118
4.4. Mecanismo de acción de inhibidores de Hsp90 en células de cáncer de pulmón	126
4.4.1. Estudio de la sensibilidad de células de cáncer de pulmón a inhibidores de Hsp90	126
4.4.2. Los inhibidores de Hsp90 inducen arresto mitótico en células de cáncer de pulmón	128
4.4.3. Los inhibidores de Hsp90 no inducen senescencia en células tumorales de pulmón	131
4.5. Estrategias sinérgicas basadas en miméticos BH3	135
4.5.1. La combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 resulta sinérgica en líneas celulares de tumores sólidos.....	136
4.5.2. La combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 resulta sinérgica en células de cáncer de pulmón	143
4.5.3. Efecto de los miméticos BH3 en células tumorales senescentes de pulmón y de páncreas	145
5. Resultados y discusión – Parte II: Estudio del mecanismo de acción de diferentes agentes quimioterápicos y evaluación de nuevas combinaciones en líneas celulares de mieloma múltiple	152
5.1. Mecanismo de acción de los miméticos BH3 en el mieloma múltiple	152
5.1.1. Efecto de los miméticos BH3 sobre la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma	152
5.1.2. Efecto de los miméticos BH3 en líneas celulares de mieloma deficientes en proteínas pro-apoptóticas o que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas.....	160
5.1.3. Efecto de la inhibición de Bcl-X _L sobre el ciclo celular de células U266	167
5.1.4. Los miméticos BH3 no inducen autofagia en células de mieloma múltiple	169
5.2. Caracterización del mecanismo de acción de fármacos antimitóticos en el mieloma múltiple	175

5.2.1.	Estudio de la sensibilidad de células de mieloma múltiple a inhibidores de Aurora quinasa	176
5.2.2.	Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre el ciclo celular y la morfología nuclear en células de mieloma múltiple	183
5.2.3.	Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en células de mieloma múltiple	195
5.2.4.	Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma múltiple	201
5.2.5.	Efecto de fármacos antimitóticos en líneas celulares de mieloma deficientes en proteínas pro-apoptóticas o que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas.....	207
5.2.6.	Alisertib como inductor de autofagia en células de mieloma múltiple	218
5.2.7.	Inhibidores de Aurora quinasa como inductores de senescencia.....	221
5.2.8.	Papel de las caspasas y RIPK1 en la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa	225
5.2.9.	Participación de las especies reactivas de oxígeno totales en la muerte desencadenada por los inhibidores de Aurora quinasa	234
5.2.10.	Papel de la mitocondria en el mecanismo de acción de inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma múltiple.....	238
5.2.10.1.	Alisertib y barasertib alteran el potencial transmembrana mitocondrial	238
5.2.10.2.	Alisertib y barasertib incrementan la masa mitocondrial y fomentan la producción masiva de ROS mitocondriales	243
5.2.10.3.	Implicación del DNA mitocondrial en la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa	248
5.2.10.4.	Efecto de inhibidores metabólicos sobre la generación de ROS mitocondriales	252
5.2.10.5.	Implicación del citocromo c.....	255
5.3.	Estudio de la sensibilidad de células de mieloma múltiple a los inhibidores de Hsp90 y de su mecanismo de acción.....	260
5.4.	En busca de estrategias sinérgicas en el mieloma múltiple	267
5.4.1.	Combinación de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3	267
5.4.2.	Combinación de fármacos antimitóticos y miméticos BH3	274
5.4.3.	Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y miméticos BH3...	281
5.4.4.	Combinación de alisertib y barasertib	286
5.4.5.	Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib	291
5.4.6.	Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat.....	295
5.4.7.	Combinación de inhibidores de Aurora quinasa e inhibidores metabólicos.....	300
6.	Discusión general	306
7.	Conclusiones.....	324
8.	Bibliografía.....	329

Anexos.....	415
Anexo I – Estructura química de los compuestos utilizados.....	415
Anexo II – Tampones y disoluciones.....	416
Anexo III – Publicaciones.....	418



INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1. Muerte celular

1.1.1. Breve recorrido por la historia de la muerte celular

Si Matthias Schleiden y Theodor Schwann establecían las bases de la Teoría Celular entre 1838 y 1842, Carl Vogt observaba y describía por primera vez la muerte celular el mismo 1842 al estudiar la metamorfosis de los anfibios, aunque nunca acuñó este término [1]. De hecho, la expresión “muerte celular” (en alemán, *Zelltod*) apenas se utilizó durante el siglo XIX, sino que palabras relativas a los tejidos eran usadas para hacer referencia a la destrucción celular [1]. No obstante, con los años, conceptos como necrobiosis, histólisis, cromatólisis y oncosis fueron utilizados por distintos autores para referirse a la muerte celular acontecida en diferentes estadios del desarrollo y situaciones patológicas en los tejidos de insectos y anfibios [1].

Pese a las observaciones realizadas durante el siglo XIX y principios del siglo XX, no fue hasta mediados de este último siglo cuando la muerte celular se reconoció como un evento normal y necesario en el desarrollo de organismos multicelulares gracias al trabajo de Glücksmann, quien sostuvo que la muerte celular generalizada era un proceso crucial en la ontogenia de los vertebrados [2]. Unos años más tarde, en 1964, Lockshin y Williams se percataron de que la muerte de las células durante una etapa concreta de la metamorfosis de los insectos era predecible, lo que les hizo pensar que existía un “programa” que conducía a lo que denominaron “muerte celular programada” [2, 3].

Un hito relevante en el estudio de la muerte celular fue la introducción del término “apoptosis” en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para referirse a una forma de muerte celular activa, regulada y generalizada que era importante en el desarrollo y el mantenimiento tisular, y diferenciarla así de la “necrosis”, una forma de muerte patológica pasiva debida a factores externos [2, 3]. Ya en la década de 1980, Brenner, Horvitz y Sulston desentrañaron las bases moleculares de la muerte celular programada utilizando como modelo el nematodo *Caenorhabditis elegans* y esbozaron una ruta genética primitiva que la explicaba, lo que les valió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002 [2]. Dada la importancia del descubrimiento, los estudios en otros animales, incluidos mamíferos, no se hicieron esperar y de estos se desprendió que los principales actores de la apoptosis se conservan entre especies, pero la complejidad del sistema aumenta progresivamente en los eucariotas superiores [3, 4].

1.1.2. Importancia en fisiología y en patología

En pleno siglo XXI, la comunidad científica ha asumido que la muerte celular es un factor decisivo para el desarrollo de los organismos multicelulares, el mantenimiento de la homeostasis celular, tisular y orgánica y para la continua adaptación al entorno [2, 5, 6]. En condiciones

fisiológicas, la muerte de algunas células es compensada por la proliferación de otras en un proceso conocido como “recambio celular”, el cual es de vital importancia para la mayoría de los animales, incluidos los humanos, al permitir la renovación de multitud de tejidos y estar implicado en el envejecimiento [1, 5]. Si en algún momento este equilibrio se rompe, las consecuencias pueden ser devastadoras. Un exceso de muerte celular conduce a enfermedades neurodegenerativas o a inmunodeficiencias, mientras que un déficit conlleva el desarrollo de enfermedades autoinmunes y muchos tipos de cáncer [5–7]. Asimismo, la muerte celular en el momento y lugar equivocados es la causa de otras muchas lesiones, como derrames cerebrales o ataques cardíacos [6].

1.1.3. Tipos de muerte celular

Los motivos que llevan a las células a sucumbir pueden ser muy variados: desde infecciones o estímulos de diversa naturaleza hasta cambios de rol en las funciones que pueden cumplir durante el desarrollo, haciendo que estas se vuelvan prescindibles, o la adquisición de mutaciones que activan vías de señalización y comunicación celulares que les permiten proliferar descontroladamente [6].

Además, la adquisición de mutaciones que les permiten proliferar descontroladamente, los mecanismos supresores de tumores se

Atendiendo a la definición de muerte celular que hace el NCDD en 2018, se considera que una célula está muerta cuando esta sufre una degeneración irreversible de sus funciones vitales, especialmente de la capacidad de producción de ATP y la conservación del equilibrio redox, lo que desemboca en la pérdida de la integridad celular [8].

Grosso modo, la muerte celular puede catalogarse como “accidental” o “regulada” [9]. La muerte accidental es la que se produce de forma instantánea y descontrolada como consecuencia de la exposición a intensos estímulos físicos, químicos o mecánicos [8]; en cambio, la implicación de una maquinaria molecular especializada que responde a señales intracelulares o perturbaciones del microambiente extracelular convierte a la muerte celular en un proceso regulado de desarrollo más tardío que puede modularse con fármacos o mediante la manipulación genética [8, 9]. Sin embargo, si se tienen en cuenta otras variables, la clasificación deja de ser tan sencilla.

La clasificación más utilizada durante las últimas décadas atiende a características morfológicas y fue propuesta por Schweichel y Merker en 1973 [10]. Así pues, ellos diferenciaban tres tipos de muerte celular: I, II y III, que en la actualidad se corresponden con la apoptosis, muerte dependiente de autofagia y necrosis, respectivamente (Fig. 1.1) [8, 10]. Según hallazgos recientes, estos tres tipos de muerte estarían interrelacionados al estar regulados frecuentemente por rutas de señalización interconectadas al compartir localizaciones subcelulares y moléculas iniciadoras y efectoras [11].

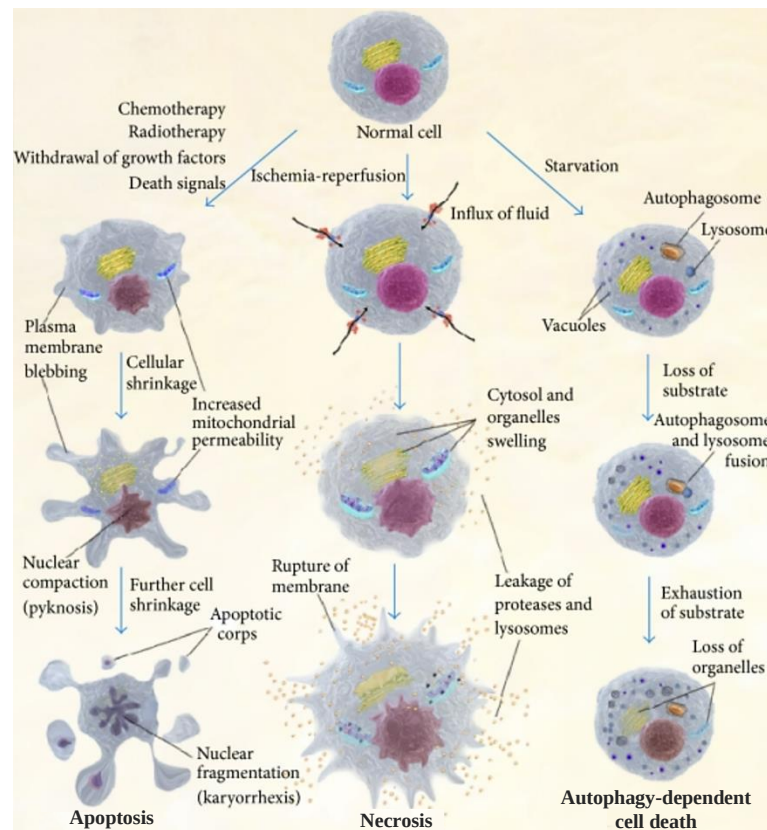


Figura 1.1 | Características morfológicas relevantes de los principales mecanismos de muerte celular. Adaptado de [12].

El mecanismo de muerte celular más estudiado y mejor caracterizado en la actualidad es, de lejos, la **apoptosis**. El primero en identificarlo fue Walther Flemming en 1885 cuando estudiaba las células de la granulosa de los folículos ováricos durante su atresia cíclica, al que bautizó como “cromatólisis” en referencia a la aparente desintegración de la cromatina nuclear que observaba [1]. Fue un término habitualmente utilizado hasta que Kerr y sus colegas acuñaron el término apoptosis en 1972, un neologismo proveniente del griego antiguo *ἀπόπτωσις* que significa “caerse o desprenderse de algo”, aludiendo a la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles en otoño [1, 13, 14]. Dado que los autores describieron este proceso como un fenómeno “programado”, muchos investigadores han usado indistintamente las expresiones “apoptosis” y “muerte celular programada” [2]. Igualmente, la expresión “suicidio celular” también se ha considerado equivalente a ambos términos, a pesar de que *Kerr et al.* nunca utilizaron esta terminología [2]. Sin embargo, la realidad es que no toda la apoptosis está “programada” por eventos genéticos, de la misma forma que no todos los suicidios celulares ni toda la muerte celular programada durante el desarrollo se producen por apoptosis [6]. No obstante, la apoptosis es, probablemente, el mejor ejemplo que se conoce de suicidio celular, donde las células reciben señales que les indican que deben iniciar un proceso de autodestrucción, sacrificándose de manera altruista en beneficio del organismo en su conjunto [2, 6, 15].

La apoptosis es un evento fisiológico muy conservado en el reino animal que cumple una función vital en múltiples procesos biológicos, como son la embriogénesis, la renovación celular y el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema inmune [16, 17]. De hecho, actúa como mecanismo de defensa en la respuesta inmune y ante el daño celular provocado por agentes nocivos o enfermedades [16]. Asimismo, la homeostasis celular, tisular y del organismo está garantizada en los organismos multicelulares mientras exista un equilibrio constante entre la proliferación celular y la eliminación de células dañadas o prescindibles del organismo mediante la apoptosis [16, 18, 19]. Por el contrario, la rotura de este equilibrio es el origen de una gran variedad de patologías, pues las enfermedades degenerativas son, en parte, fruto de una apoptosis exacerbada, mientras que muchos tipos de cáncer y determinadas enfermedades autoinmunes derivan de una apoptosis limitada [14, 16, 20].

Las células que sufren apoptosis se caracterizan por experimentar cambios drásticos a nivel morfológico que comienzan con la contracción del citoplasma, la reducción del volumen celular y la adopción de una forma redondeada, seguida de la condensación de la cromatina (picnosis), la fragmentación del núcleo (cariorrhexis) y la formación de evaginaciones en la membrana plasmática que evolucionan a los denominados cuerpos apoptóticos (citoplasma y orgánulos estrechamente empaquetados con posibles fragmentos nucleares envueltos en una membrana plasmática intacta) (Fig. 1.1) [8, 16, 21]. Pese a todas estas modificaciones, las células conservan cierta actividad metabólica, los orgánulos se mantienen prácticamente intactos y la membrana plasmática preserva su integridad hasta fases tardías del proceso [8, 21]. Al mismo tiempo, la apoptosis implica múltiples eventos bioquímicos finamente regulados que incluyen la rotura oligonucleosomal del DNA y la acumulación de DNA monocatenario, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la disipación del potencial transmembrana de las mitocondrias, la exposición de fosfatidilserina en la semicapa externa de la membrana plasmática, la generación de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la intervención de las caspasas y de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 [21].

Cuando la apoptosis tiene lugar *in vitro* las células apoptóticas alcanzan la etapa terminal, en la que adoptan un morfotipo de tipo necrótico, donde la membrana plasmática se rompe y el contenido intracelular es liberado [8]. Por el contrario, si se produce *in vivo*, señales como la exposición de fosfatidilserina en el exterior celular empujan a las células adyacentes con capacidad fagocítica a engullir eficazmente a las células moribundas, que son degradadas en los lisosomas y sus componentes, reutilizados [2, 8, 22]. El hecho de que las células apoptóticas mantengan su integridad de membrana, sean eliminadas rápidamente y que las células encargadas de ello no liberen citoquinas pro-inflamatorias durante el proceso hace que, por lo general, la apoptosis no esté asociada con una respuesta inflamatoria posterior, de manera que los órganos y tejidos en los que se produce no sufren lesiones [6, 16, 22]. No obstante, no se puede considerar

un tipo silencioso de muerte celular desde el punto de vista inmunológico, ya que es un proceso activo en el que las células apoptóticas emiten señales que pueden modificar el comportamiento de las células vecinas [8, 22].

Tradicionalmente, la alternativa a la muerte por apoptosis ha sido la **necrosis** [16]. Considerada una forma de muerte celular accidental, incontrolada, pasiva e independiente de energía, responde a lesiones externas graves y repentinas, como las causadas por toxinas, hipoxia, traumatismos, calor o infecciones [2, 18, 19]. En estas situaciones, el volumen celular aumenta y el citoplasma adquiere un aspecto translúcido, algunos orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico se hinchan, y el núcleo permanece prácticamente intacto, aunque la membrana nuclear se dilata y la cromatina se aglutina de forma irregular en pequeñas áreas [9, 11, 21]. Finalmente, la membrana plasmática pierde su integridad y se produce el desmantelamiento desorganizado del contenido intracelular, lo que provoca daño tisular e inflamación (Fig. 1.1) [18, 23]. No obstante, a finales de la década de 1980 aparecieron los primeros indicios de que la necrosis también podría acontecer de manera regulada, pero no fue hasta la primera década del siglo XXI cuando se publicaron los primeros estudios relativos a la **necroptosis**, un tipo de necrosis regulada bioquímicamente por las proteínas quinasas RIPK1 y RIPK3 y la pseudoquinasa MLKL [24, 25] Este tipo de muerte, necesaria para la supervivencia celular y el desarrollo a la vez que implicada en la patogenia o en la respuesta adaptativa a distintas enfermedades, se desencadena cuando receptores mortales específicos, receptores tipo Toll, interferones, sensores intracelulares y otras moléculas detectan alteraciones en el microambiente extra o intracelular [8, 25, 26].

Contrariamente a estos procesos, la autofagia se considera un mecanismo fisiológico de supervivencia celular que, cuando se produce a nivel basal, garantiza la renovación de los orgánulos dañados, las proteínas de vida larga y el contenido citoplasmático, favoreciendo el mantenimiento de la homeostasis celular [27, 28]. Ante determinadas condiciones de estrés, como pueden ser la inanición, falta de factores de crecimiento, condiciones de hipoxia, daño mitocondrial o infecciones por patógenos, las células responden activando la autofagia, mecanismo que les aporta metabolitos para satisfacer sus necesidades energéticas y favorecer su supervivencia y crecimiento [11, 27, 28]. Igualmente, se activa durante la diferenciación celular y la embriogénesis y está implicada en la respuesta inmune innata y adaptativa [18]. Sin embargo, la exposición a un estrés extremo o duradero o a la activación de autofagia asociada a ciertas enfermedades puede desembocar en la denominada **muerte celular dependiente de autofagia** [11, 27]. Este tipo de muerte celular, distinto de la apoptosis y la necrosis, va acompañado de una vacuolización autofágica masiva del citoplasma sin condensación de la cromatina, la formación de burbujas en la membrana plasmática y el aumento de tamaño y la desaparición de los orgánulos intracelulares [25, 29] (Fig. 1.1).

El gran interés que ha despertado la muerte celular entre la comunidad científica ha impulsado los estudios en esta área, sacando a la luz más tipos de muerte regulada y procesos celulares que hasta ahora se desconocían, algunos incluso específicos de algunos tipos celulares (Tabla 1.1) [2].

Tabla 1.1 | Nuevos tipos de muerte celular regulada (RCD) y procesos celulares.

Tipo de muerte/proceso celular	Descripción
Alcaliaptosis [30]	Forma de RCD debida a la alcalinización del medio intracelular promovida por el fármaco JTC801.
Anoikis [8]	Variante específica de la vía apoptótica mitocondrial desencadenada por la pérdida de anclaje dependiente de integrina a la matriz extracelular.
Autosis [8, 31]	Caso concreto de muerte celular dependiente de autofagia que precisa de la bomba sodio-potasio de la membrana plasmática y es sensible a glucósidos cardíacos.
Catástrofe mitótica [8]	Mecanismo oncosupresor para el control de células incapaces de completar la mitosis que culmina en la muerte de las células o en su entrada en senescencia.
Muerte celular en mitosis [8]	Variante específica de RCD, generalmente apoptosis intrínseca, promovida por la catástrofe mitótica.
Cornificación [32]	Programa de diferenciación terminal de los queratinocitos que implica su muerte (corneocitos) para dar lugar al estrato córneo de la epidermis.
Eferocitosis [8, 33]	Mecanismo de eliminación de células muertas y sus fragmentos por fagocitos profesionales (macrófagos y células dendríticas, entre otros) y, en menor medida, por fagocitos no profesionales (por ejemplo, células epiteliales).
Ferroptosis [8]	Forma de RCD inducida por perturbaciones oxidativas del microambiente intracelular, regulada de manera constitutiva por GPX4 y sensible a quelantes de hierro y antioxidantes lipofílicos.
Metuosis [29]	Modalidad de RCD caracterizada por la acumulación masiva de grandes vacuolas de membrana única llenas de líquido derivadas de macropinosomas y acompañada de la hiperactivación de Ras.
Mitoptosis [29]	Vía de muerte mitocondrial basada en la fisión y fusión programada de las mitocondrias acompañada de la interrupción de la producción de ATP.
LDCD [8]	Tipo de RCD delimitado por la permeabilización de la membrana lisosomal y precipitado por catepsinas, en el que pueden participar MOMP y las caspasas.
Muerte celular entótica [8]	Modalidad de RCD dependiente de actomiosina y ejecutada por los lisosomas que se inicia por la internalización de una célula viable en otra no fagocítica.
ICD [8]	Tipo de RCD capaz de activar una respuesta inmune adaptativa en huéspedes inmunocompetentes frente a antígenos endógenos (celulares) o exógenos (virales) expresados por las células moribundas.
Muerte celular NETótica [8]	Forma de RCD dependiente de ROS asociada con la extrusión de NET y restringida a células de origen hematopoyético.
Necrosis impulsada por MPT [8]	Modalidad de RCD dependiente de CYPD que se inicia por determinadas alteraciones en el microambiente intracelular y conlleva una repentina permeabilización de la membrana mitocondrial interna a pequeños solutos.
Oxeiptosis [30, 34]	Vía de RCD no inflamatoria inducida por ROS, impulsada por la activación de la vía KEAP1-PGAM5-AIF e independiente de caspasas.

Paraptosis [35]	Tipo de RCD caracterizado por una extensa vacuolización citoplasmática que suele cursar con dilatación del retículo endoplásmico y/o las mitocondrias e ir acompañada de estrés en el retículo, interrupción de la proteostasis y alteraciones en la homeostasis redox y de Ca^{2+} .
Partanatos [8]	Modalidad de RCD desencadenada por la hiperactivación de PARP1 y precipitada por la posterior catástrofe bioenergética acoplada a la degradación de DNA dependiente de AIF y MIF.
Piroptosis [8]	Forma de RCD inducida por alteraciones en la homeostasis intra- y extracelular relacionadas con la inmunidad innata que depende de manera crucial de la formación de poros en la membrana plasmática por miembros de la familia de las gasderminas, a menudo como consecuencia de la activación de caspasas inflamatorias.
Senescencia celular [8]	Proceso fisiopatológico por el que las células pierden su potencial proliferativo de forma irreversible, pero se mantienen viables y metabólicamente activas, y que se relaciona con peculiaridades morfológicas y bioquímicas, incluido el SASP.

1.2. Apoptosis

1.2.1. Rutas de señalización

Para que la apoptosis se lleve a cabo han de activarse diferentes mecanismos moleculares dependientes de energía extremadamente complejos y sofisticados [16]. Las principales rutas de señalización de la apoptosis son la vía extrínseca o de los receptores mortales y la vía intrínseca o mitocondrial, las cuales han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas [36]. No obstante, existe una tercera vía apoptótica, conocida como vía de perforina/granzimas, que está estrechamente ligada a la actividad del sistema inmune [37]. Pese a que cada ruta tiene asociada su propia cascada de señalización, casi todas ellas convergen en la activación de caspasas, las principales enzimas encargadas de orquestar el desmantelamiento final de la célula [38, 39]. Además, en determinadas circunstancias y tipos celulares una única proteína (Bid) puede conectar la ruta extrínseca con la intrínseca, ya que las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca pueden escindir la, haciendo que su forma truncada (tBid) pueda activar a su vez la vía apoptótica mitocondrial [8, 40].

La **vía intrínseca** (Fig. 1.2A) contribuye de forma decisiva al desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular [41]. Desencadenada por una extraordinaria variedad de estímulos extra e intracelulares, que incluyen la radiación, el daño en el DNA, el estrés del retículo endoplásmico, la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno, la ausencia de factores de crecimiento, señales del desarrollo, defectos en la mitosis y diversos agentes quimioterápicos, esta ruta regula la respuesta apoptótica a través de la mitocondria [8, 39, 42]. En los mamíferos, estos estímulos conducen a la permeabilización irreversible y generalizada de la membrana mitocondrial externa, un evento cuidadosamente regulado por las proteínas de la familia Bcl-2 [8, 40]. Dicha permeabilización lleva asociada la disipación del potencial transmembrana mitocondrial y facilita la liberación de distintos factores apoptogénicos desde el espacio intermembrana al citosol, en el que, en última instancia, activan a las caspasas [8, 41]. Esta activación es debida principalmente

a la liberación del citocromo c, cuya función fisiológica habitual es la de transportar electrones en la cadena respiratoria mitocondrial [8]. Sin embargo, una vez en el citosol y junto con dATP y la proteína Apaf-1 induce el ensamblaje del apoptosoma, un complejo heptamérico que recluta a su vez a la pro-caspasa-9 y promueve su activación mediante un cambio conformacional [36, 43]. Una vez activada, la caspasa-9 procesa y activa a las caspasas ejecutoras (por ejemplo, las caspasas-3 y -7), las cuales, a su vez, proteolizan multitud de sustratos, lo que desemboca en un rápido desmantelamiento y muerte de las células [41, 44]. Otros factores apoptogénicos liberados son AIF y EndoG, que actúan al nivel del DNA e inducen apoptosis mediante un mecanismo independiente de caspasas, mientras que Smac/DIABLO y la serín proteasa OMI/HtrA2 contribuyen a la activación indirecta de las caspasas al neutralizar a sus inhibidores endógenos como, por ejemplo, la proteína XIAP [41, 43].

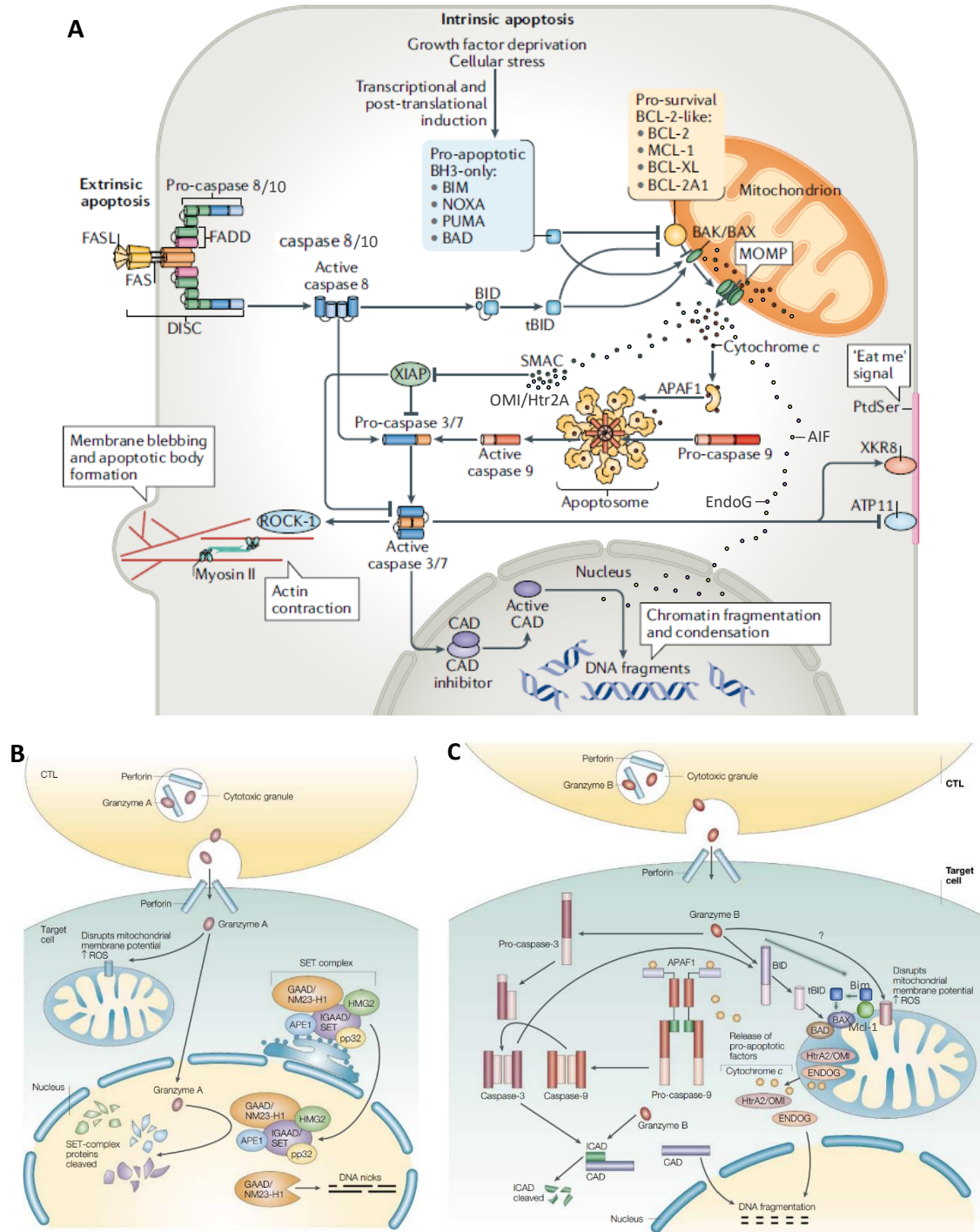


Figura 1.2 | Vías de señalización de la apoptosis. (A) Rutas extrínseca e intrínseca. Adaptado de [42] y ampliado con [41, 43]. **(B y C)** Vía de perforina/granzimas A y B. Adaptado de [45] y ampliado de [46].

Por su parte, la **vía extrínseca** (Fig. 1.2A) también participa en el mantenimiento y renovación de los tejidos, en particular en el sistema hematopoyético [41]. En este caso, la ruta da comienzo cuando determinados ligandos de la familia del TNF, presentes en el microambiente celular en forma soluble o expresados por las células vecinas, son reconocidos por receptores específicos localizados en la superficie celular [8, 27, 42]. Concretamente, estos receptores

transmembrana se conocen como receptores mortales y constituyen un subgrupo de la superfamilia de receptores del TNF [41, 43]. Entre ellos, los más destacados son TNFR1, Fas (también conocido como CD95 y Apo-1), DR4 y DR5, los cuales se unen de forma selectiva a sus respectivos ligandos: TNF α en el caso del primero, FasL al segundo y TRAIL a los dos últimos [40, 41]. La interacción ligando-receptor induce la oligomerización del receptor y el posterior reclutamiento de proteínas adaptadoras a una región citoplasmática conservada de los receptores denominada dominio mortal (DD), entre ellas FADD y, en algunos casos también TRADD, que también poseen este dominio mortal [27, 40, 42]. Estas proteínas adaptadoras reclutan a su vez a otras proteínas, entre las que se incluyen la pro-caspasa-8 o la pro-caspasa-10 en algunos contextos, a través de los dominios efectores de muerte (DED) presentes tanto en las proteínas adaptadoras como en las pro-caspasas iniciadoras [8, 42, 43]. De esta forma, se originan el complejo supramolecular DISC o los complejos necroptóticos I y II, en función del receptor mortal activado, en los que se promueve la homodimerización de las pro-caspasas iniciadoras y su posterior activación autocatalítica [8, 43, 47]. Finalmente, la forma activa de las caspasas-8 y -10 escinde y activa a las caspasas ejecutoras (3 y 7), que culminan el proceso apoptótico [36, 48].

No todas las células responden de la misma forma a la activación de la vía apoptótica de los receptores mortales. En las células consideradas de tipo II, entre las que se encuentran los hepatocitos, las células β pancreáticas y muchas de las células tumorales, las caspasas efectoras están inhibidas debido a la elevada expresión de la proteína XIAP, por lo que la vía de los receptores mortales no es capaz de inducir eficazmente la apoptosis de estas células de manera directa [8, 49]. Por ello, estas células han desarrollado un mecanismo alternativo que comunica las rutas extrínseca e intrínseca y que resulta crucial para amplificar la señal y finalizar la apoptosis [49] (Fig. 1.2A). Concretamente, las caspasas-8 y -10 procesan Bid citosólico, dando lugar a su forma activa, tBid, la cual es miristoilada y translocada a la membrana mitocondrial externa [8, 40, 41, 49]. Allí, esta proteína truncada impulsa la permeabilización de la membrana mitocondrial externa regulada por un mecanismo dependiente de Bax/Bak (ver apartado 1.2.2), facilitando la salida y activación de Smac/DIABLO, que inactiva a XIAP y permite, por tanto, la reactivación de la ruta extrínseca, a la vez que se libera el citocromo c, el cual promueve la ejecución de vía intrínseca [48, 49]. Por el contrario, el nivel de expresión de XIAP en las células de tipo I, como los timocitos y linfocitos maduros, es bajo, lo que permite que la señal apoptótica generada a partir de los receptores mortales sea suficientemente potente para activar de manera directa las caspasas efectoras, evitando así la intervención de las mitocondrias [8, 40, 49]. No obstante, pese a que la generación de tBid y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa no son necesarios para provocar la muerte de estas células, ambos eventos pueden producirse [32].

Mención especial merecen las células NK (inmunidad innata) y los linfocitos T citotóxicos (inmunidad adaptativa), ya que ambos tipos celulares disponen de un mecanismo especial para acabar con sus células diana: la citotoxicidad mediada por gránulos [45]. Si bien ambos tipos de células son capaces de aniquilar células tumorales o infectadas por patógenos intracelulares mediante la ruta de los receptores mortales, su principal mecanismo citotóxico se basa en la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos, cargados de perforina y granzimas, a la sinapsis inmunológica, lo que desencadena la muerte de las células diana a través de la denominada **vía de perforina/granzimas** [46, 50] (Figs. 1.2B y C).

Con la activación de estas células se induce la expresión y liberación de ligandos mortales (por ejemplo, FasL y TRAIL) y los gránulos citolíticos preformados son rápidamente dirigidos hacia la sinapsis inmunitaria, a la que liberan principalmente perforina y granzimas [51]. Por lo general, la perforina es la encargada de formar poros en la membrana de la célula a eliminar que permitan la llegada al citosol de las granzimas, una familia de serín proteasas que proteolizan numerosas proteínas en las células diana y terminan promoviendo su muerte pero que se encuentran inactivas en las células de origen debido al entorno acidificado en el que se encuentran [45, 46]. En los humanos se han identificado cinco tipos de granzimas: A, B, H, K y M, de las cuales, las granzimas A y B son las más abundantes y, por ende, las mejor caracterizadas [46, 52]. Una vez en el citosol, cada granzima inicia su propia cascada de señalización. Por un lado, la granzima B (Fig. 1.2C), la más potente de la familia, puede desatar la apoptosis celular en cuestión de minutos a través de distintos mecanismos, incluido el procesamiento directo de caspasas y la activación de la vía apoptótica mitocondrial, mientras que la granzima A (Fig. 1.2B) es un inductor de muerte menos eficiente al activar la apoptosis a una menor velocidad y desencadena un proceso apoptótico independiente de caspasas [46].

1.2.2. Proteínas de la familia Bcl-2

El papel determinante de la apoptosis en la evolución del reino animal se refleja en la conservación evolutiva de las moléculas implicadas en sus rutas de señalización. Ejemplo de ello es que sus secuencias y estructuras, así como las interacciones que establecen entre ellas, se conservan desde las esponjas hasta el ser humano [53].

En los mamíferos, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, considerado el evento decisivo de la ruta apoptótica mitocondrial, está minuciosamente regulada por complejas interacciones que establecen las proteínas de la familia Bcl-2 en la membrana mitocondrial [53, 54]. La historia de esta familia se inicia con el descubrimiento de la proteína Bcl-2 en los estudios de translocaciones cromosómicas que implicaban a los cromosomas 14 y 18 en el linfoma de células B del centro folicular [27, 55]. Estudios posteriores han permitido ampliar la familia, que actualmente se compone de alrededor de una veintena de proteínas, cada una de las cuales

contiene al menos uno de los cuatro motivos α -helicoidales conservados, denominados dominios de homología con Bcl-2 o dominios BH (BH1-BH4) [27, 54]. Muchas de ellas poseen, además, una región transmembrana en el extremo C-terminal, peor conservada, que les permite dirigirse y anclarse en las membranas de orgánulos intracelulares, entre los que se incluyen el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los lisosomas y peroxisomas, la membrana mitocondrial externa y la envuelta nuclear [53].

Atendiendo a su función, las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en proteínas anti- y pro-apoptóticas, y según sus propiedades estructurales, estas últimas pueden clasificarse a su vez en proteínas pro-apoptóticas multidominio y “solo-BH3” [56] (Fig. 1.3).

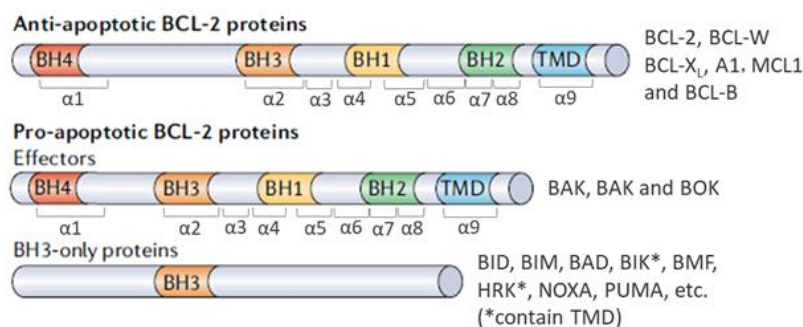


Figura 1.3 | Clasificación y estructura de las proteínas de la familia Bcl-2. BH1-BH4: dominios de homología con Bcl-2; TMD: dominio transmembrana. Modificado de [36] y ampliada con [41, 57].

Los humanos poseen media docena de **proteínas anti-apoptóticas**: la propia Bcl-2 y sus parientes cercanos Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-B y Bfl-1/A1, que conservan los cuatro dominios de homología y suelen encontrarse ancladas a la membrana mitocondrial externa o a la membrana del retículo endoplásmico a través de su hélice α 9 [8, 38, 53]. De todas ellas, Mcl-1 es la que posee una vida media más corta, de menos de 30 minutos [58]. Este rápido recambio mediado por el proteasoma parece estar regulado por la presencia de secuencias PEST (secuencias peptídicas ricas en prolina [P], ácido glutámico [E], serina [S] y treonina [T]) y múltiples regiones de fosforilación en su extremo N-terminal, que es inusualmente extenso [58–60].

La disposición de siete hélices α anfipáticas alrededor de una hélice α central hidrofóbica (α 5) les confiere una estructura globular en la que residuos de las hélices α 2 a α 5 y α 8, pertenecientes a los dominios BH1, BH2 y BH3, generan un surco superficial hidrofóbico implicado en la actividad anti-apoptótica de estas proteínas [41, 54, 57]. En las células sanas, dicho bolsillo constituye la zona canónica de interacción con el dominio BH3 de los miembros pro-apoptóticos, aunque también se han propuesto otras alternativas, como una región que abarca las hélices α 1 y α 6 y, por tanto, el dominio BH4 [36, 53]. Independientemente del mecanismo de interacción, el objetivo de estas proteínas es evitar la apoptosis promovida por las proteínas “solo-

BH3”, impidiendo la oligomerización de los miembros pro-apoptóticos multidominio en la membrana mitocondrial externa, de manera que esta no se permeabilice [38, 41].

Tres proteínas (Bax, Bak y Bok) forman la subfamilia de **proteínas pro-apoptóticas multidominio**, también conocidas como proteínas efectoras, que encuentra en Bax y Bak sus representantes prototípicos [36]. Si bien estas tres proteínas también poseen los cuatro dominios de homología y un dominio transmembrana y comparten un núcleo estructural prácticamente idéntico, estas difieren en su ubicación y dinámica subcelulares [8, 53]. En condiciones basales, Bax y Bak se encuentran en un estado inactivo, mostrando Bax una conformación monomérica quiescente o dimérica inactiva y circulando constantemente entre el citosol y la membrana mitocondrial externa a través de su interacción con Bcl-X_L [8, 54]. Bak, por su parte, se encuentra principalmente insertada en la membrana mitocondrial externa gracias a su hélice $\alpha 9$ hidrofóbica localizada en el extremo C-terminal, donde la porina mitocondrial VDAC2 la mantiene inhibida, aunque también puede ser retrotranslocada al citosol, pero a un ritmo mucho más lento que Bax [8, 54].

En este estado, Bax y Bak adoptan una estructura tridimensional similar a la presentada por las proteínas anti-apoptóticas [61]; sin embargo, al inducirse la apoptosis, ambas se activan, oligomerizan y generan poros en la membrana mitocondrial externa y, posiblemente, en otras membranas intracelulares, lo que desemboca en la permeabilización de la mitocondria y en la liberación de factores apoptogénicos que propagan la cascada de señalización apoptótica [8, 41].

Bok, por su parte, es el miembro menos conocido de esta subfamilia, pero se sabe que puede inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la muerte de las células cuando Bax y Bak no están presentes [36]. Esta proteína se encuentra activa constitutivamente, posiblemente debido a la inestabilidad intrínseca de su núcleo hidrofóbico, de manera que las proteínas “solo-BH3” no están implicadas en el mecanismo por el que Bok induce apoptosis [36]; sin embargo, su interacción con proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 favorece su localización mitocondrial [54]. Debido a su estado de actividad constitutivo, sus niveles se mantienen bajos en las células sanas gracias a su recambio a través del proteasoma regulado por la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico, pero se cree que existen otros mecanismos que neutralizan su actividad pro-apoptótica [36, 54].

Un aspecto común a las proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas multidominio es la posesión de un dominio transmembrana en la región C-terminal [62]. Tradicionalmente, dicho dominio, rico en residuos altamente hidrofóbicos, ha sido considerado un mero dominio de inserción [62]; sin embargo, estudios recientes basados en péptidos sintéticos derivados de la región transmembrana de miembros de ambas subfamilias han demostrado que interacciones mediadas por esta región también podrían modular la apoptosis [62–64].

Por último, la subfamilia de **proteínas “solo-BH3”** consta de al menos ocho miembros, entre los que se incluyen Bad, Bim, PUMA y Noxa [41]. Todos ellos comparten únicamente los 9-13 residuos que conforman el dominio BH3, suficiente para que ejerzan su función pro-apoptótica, aunque algunos de ellos contienen un dominio transmembrana [36, 41]. Cuando no están unidos a otras proteínas su estructura es intrínsecamente desordenada, pero al asociarse con proteínas de los otros subgrupos, su dominio BH3 adopta una conformación de hélice α anfipática [61, 65]. La excepción en este comportamiento es Bid, que exhibe una estructura globular inactiva similar a la de las proteínas multidominio en la que los residuos del dominio BH3 están escondidos, pero al generarse su forma activa, este dominio queda expuesto [57, 61].

La unión del dominio BH3 de estas proteínas al surco hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas tiene lugar mayoritariamente cuando cuatro residuos conservados de dicho dominio (h1-h4) se insertan en determinadas ranuras (p1-p4) y se forma un puente salino entre un residuo aspártico conservado de este dominio y un residuo de arginina, también conservado, presente en el dominio BH1 de la proteína multidominio [57, 65] (Fig. 1.4A). Por otro lado, cuando las proteínas “solo-BH3” y las pro-apoptóticas multidominio interactúan a través de su dominio BH3 y su surco hidrofóbico, respectivamente, se producen contactos homólogos a los descritos y otras asociaciones adicionales [57, 65]. No obstante, en el caso de Bax se ha descrito una superficie alternativa de interacción, denominada bolsillo trasero, que implica a sus hélices $\alpha 1$ y $\alpha 6$ y a la que se unirían proteínas “solo-BH3” como Bim [57] (Fig. 1.4B). Esto favorecería la localización mitocondrial de Bax al modificar el bucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y desplazar alostéricamente su dominio transmembrana ($\alpha 9$), pero algunos estudios apuntan a que esta superficie de interacción podría no ser esencial para la activación de Bax [57] (Fig. 1.4C).

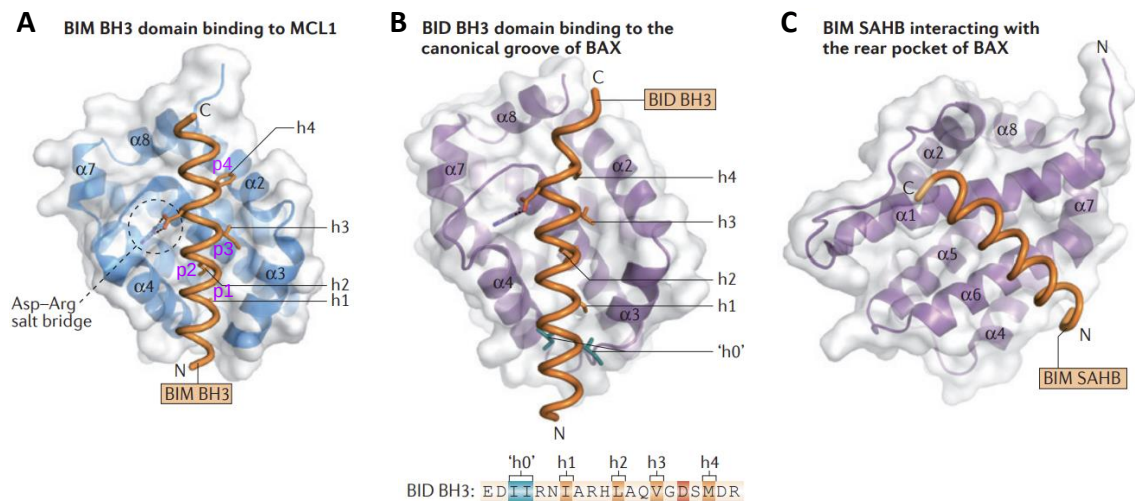
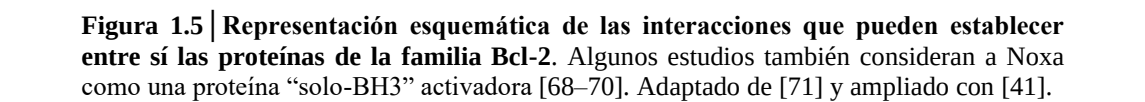


Figura 1.4 | Superficies de interacción entre las proteínas de la familia Bcl-2. (A) Interacción entre el bolsillo hidrofóbico de Mcl-1 y el dominio BH3 de Bim. **(B)** Unión del dominio BH3 de Bid al bolsillo hidrofóbico canónico de Bax. **(C)** Asociación del péptido BH3 de Bim (Bim SAHB) con el bolsillo trasero de Bax. Modificado de [57] y ampliado con [65].

En respuesta a un estímulo apoptótico que altera la homeostasis de ciertos orgánulos y compartimentos celulares, las proteínas “solo-BH3” se activan de manera transcripcional o post-traducciona, lo que las convierte en los transductores celulares de las señales de estrés [8]. Por ejemplo, proteínas como PUMA y Noxa están reguladas transcripcionalmente de manera positiva por p53, y ante un estrés en el retículo endoplásmico, Bim es inducido transcripcionalmente por CHOP [61]; por el contrario, proteínas como Bid requieren de modificaciones post-traduccionales para activarse y la fosforilación de Bim y Bad las inactiva [36, 61].

1.2.2.1. Modelos de activación de Bax y Bak

Que las formas activas de Bax y Bak son las responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa en la ruta intrínseca de la apoptosis y que las proteínas de la familia Bcl-2 son las reguladoras por antonomasia de este proceso son eventos bien conocidos [66]; sin embargo, el mecanismo detallado por el que se produce dicha activación en respuesta a un estímulo apoptótico es todavía objeto de debate [54]. Por ello, los esfuerzos de muchos miembros de la comunidad científica han estado dirigidos durante años a intentar dilucidar la compleja red de interacciones que establecen entre sí las proteínas de esta familia, tanto en medio acuoso como en las membranas, pues el resultado de estas conexiones dictamina el destino final de las células [54, 67] (Fig. 1.5). En este sentido, se han propuesto varios modelos de activación para explicar el rol de dichas proteínas en la regulación del proceso apoptótico [67].



17

directamente a Bax/Bak y las proteínas “solo-BH3” no interaccionan directamente con ellas para activarlas [66].

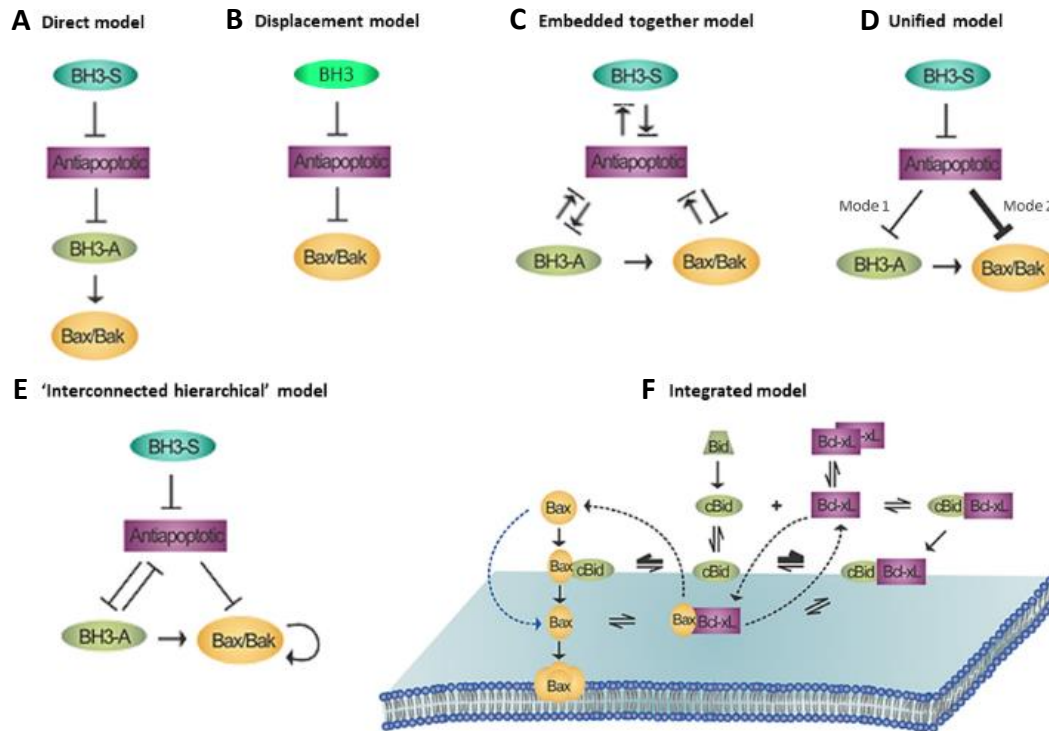


Figura 1.6 | Esquemas representativos de los modelos propuestos para la regulación de la activación de Bax y Bak mediada por las interacciones establecidas entre las proteínas de la familia Bcl-2. **(A)** Modelo directo. **(B)** Modelo indirecto o de desplazamiento. **(C)** Modelo *embedded together*. **(D)** Modelo unificado. **(E)** Modelo jerárquico interconectado. **(F)** Modelo integrado. Modificado de [67] y ampliado con [72].

Un aspecto que ambos modelos no contemplan es el papel de las membranas en estas interacciones durante la apoptosis, pues es aquí donde se instalan las proteínas de la familia Bcl-2 y sufren cambios conformacionales que controlan su función [66]. Por ello, surgió el denominado **modelo *embedded together*** (Fig. 1.6C) que, además de tener en cuenta la interacción en las membranas, aúna las principales características de los modelos anteriores [72]. En este modelo, las interacciones que se producen son reversibles y están mediadas por equilibrios competitivos que, en función de las concentraciones relativas y de las afinidades de unión, decantan la balanza por la supervivencia o la muerte celular [66]. En condiciones fisiológicas, las proteínas anti-apoptóticas citoplasmáticas son dirigidas a las membranas de las mitocondrias y del retículo endoplásmico, donde bloquean a las proteínas “solo-BH3” activadoras y a Bax/Bak, pudiendo estas últimas ser retrotranslocadas al citosol, lo que mantiene la integridad de las membranas [54, 66]. No obstante, el escenario cambia al activarse la apoptosis, cuando las proteínas “solo-BH3” sensibilizadoras interrumpen la asociación de las activadoras y efectoras con las anti-apoptóticas, de manera que las anti-apoptóticas son neutralizadas y las restantes quedan libres para interactuar entre ellas y promover la apoptosis [66].

Sobre este modelo se asienta el **modelo unificado** (Fig. 1.6D), pues comparte con él la función dual de las proteínas anti-apoptóticas al ser capaces de inhibir tanto a las proteínas “solo-BH3” activadoras como a las formas activas de Bax y Bak [72]. Sin embargo, plantea que la interrupción de la apoptosis a través del bloqueo de los miembros activadores (modo 1) es menos eficiente que la inhibición de las proteínas efectoras (modo 2) [72]. De hecho, los estímulos apoptóticos leves pueden ser sorteados mediante el primer mecanismo, pero si la perturbación es intensa, la apoptosis solamente puede ser impedida mediante el segundo mecanismo [67]. Además, es el primer modelo que conecta de manera explícita la regulación de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa con la dinámica mitocondrial a través de las proteínas de la familia Bcl-2 [72].

Un modelo más reciente, el **modelo jerárquico interconectado** (Fig. 1.6E), establece una sucesión de eventos que implican a las proteínas de la familia Bcl-2 y que regulan la apoptosis mitocondrial [67]. Está basado en mecanismos bimodales secuenciales, pues las proteínas “solo-BH3” Bim, PUMA, Noxa y Bid transforman los monómeros inactivos de Bax/Bak en monómeros activos en primer lugar, y posteriormente previenen su secuestro por las proteínas anti-apoptóticas, favoreciendo así la oligomerización de las proteínas efectoras [73]. Por su parte, los miembros anti-apoptóticos son capaces de bloquear este proceso a ambos niveles, primero uniéndose a las proteínas activadoras para evitar la activación de Bax y Bak, o si estos ya han sido activados, secuestrando sus formas activas [73]. Por tanto, la asociación de las proteínas anti-apoptóticas con las “solo-BH3” activadoras provoca la inhibición mutua de ambas proteínas al sortear la activación de Bax/Bak por parte de las activadoras y al evitar que los miembros anti-apoptóticos inhiban los monómeros activos de Bax y Bak [73]. Por su parte, las proteínas “solo-BH3” restantes promocionan la apoptosis indirectamente, pues dificultan la interacción de las proteínas anti-apoptóticas y las activadoras, pero no son capaces de activar directamente a las proteínas pro-apoptóticas multidominio [73]. Además, un aspecto novedoso de este modelo es que sugiere la autoactivación de Bax y Bak en ausencia de las proteínas “solo-BH3” activadoras y cuando Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 están reguladas negativamente [73].

Pese al aumento de la complejidad a medida que surgían nuevos modelos, ninguno de ellos ha conseguido dar una explicación general al mecanismo utilizado por las proteínas de la familia Bcl-2 para regular la apoptosis [67]. Los intentos de construir modelos computacionales que aborden la regulación de la vía apoptótica mitocondrial han sido numerosos, pero la falta de datos experimentales para los parámetros de los modelos constituye un importante obstáculo [67]. No obstante, se ha postulado un último modelo, denominado **modelo integrado** (Fig. 1.6F), que se basa en el análisis cuantitativo del interactoma de las proteínas Bcl-X_L, Bax y tBid, reconstituido *in vitro*, y que asume la formación de complejos tanto en las membranas como en el citosol [67]. Según este modelo, tBid puede ser inhibido por Bcl-X_L en ambas localizaciones subcelulares,

siendo más estable la interacción cuando se produce en la membrana [67]. Sin embargo, Bcl-X_L solamente puede asociarse con Bax en la membrana y en ausencia de tBid, lo que apunta a que, cuando las tres proteínas están presentes, los complejos Bcl-X_L/tBid son los predominantes [67]. Además, Bcl-X_L puede ser reclutado a las membranas por mediación de Bax y esta ser retrotranslocada al citosol [67]. Por otro lado, Bax podría activarse espontáneamente a temperatura fisiológica mediante un mecanismo de retroalimentación positiva y tBid impulsaría este proceso actuando como catalizador [67]. En comparación con otros modelos, este permite incrementar la complejidad del interactoma de manera gradual y sistemática mediante modificaciones postraduccionales o la incorporación de nuevos actores [67]. No obstante, son necesarios datos cuantitativos provenientes de un contexto celular para adaptar el modelo a lo que sucede en condiciones fisiológicas [67]. Esto se puede conseguir utilizando herramientas como la técnica BiFC, que permite detectar interacciones entre proteínas incluso si estas son débiles y transitorias [74]. De hecho, varios estudios han reportado la detección de interacciones entre proteínas de la familia Bcl-2 en células vivas gracias a esta técnica [70, 75].

1.2.3. Caspasas

La cascada de señalización de las caspasas en la apoptosis es un evento conservado a lo largo de la evolución de los eucariotas, pues se han identificado al menos 18 caspasas diferentes en los mamíferos que poseen sus correspondientes ortólogos en especies tan variadas como los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Drosophila melanogaster* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, en el que se descubrió la relevancia de estas enzimas en la muerte celular programada hace casi tres décadas [76–78]. Concretamente, en los humanos se han confirmado 12 caspasas y en ratones se han identificado 11 [79–81].

Estas proteínas constituyen una familia de cisteín proteasas que deben su nombre a la presencia de un residuo de cisteína en su centro activo y a su elevada especificidad de corte tras un residuo aspártico (*cysteine-dependent aspartate-specific peptidase*) [38, 43, 82]. En particular, reconocen un motivo tetrapeptídico específico del tipo P4-P3-P2-P1 y realizan el corte después del residuo C-terminal (P1), que es un residuo de aspártico (D) [38, 76]; además, la posición P3 es un residuo de glutámico (E) en todas las caspasas de mamíferos [76]. Por tanto, el motivo general preferido por las caspasas puede describirse como XEXD, aunque cada una tiene una especificidad de sustrato particular [76] (Fig. 1.7).

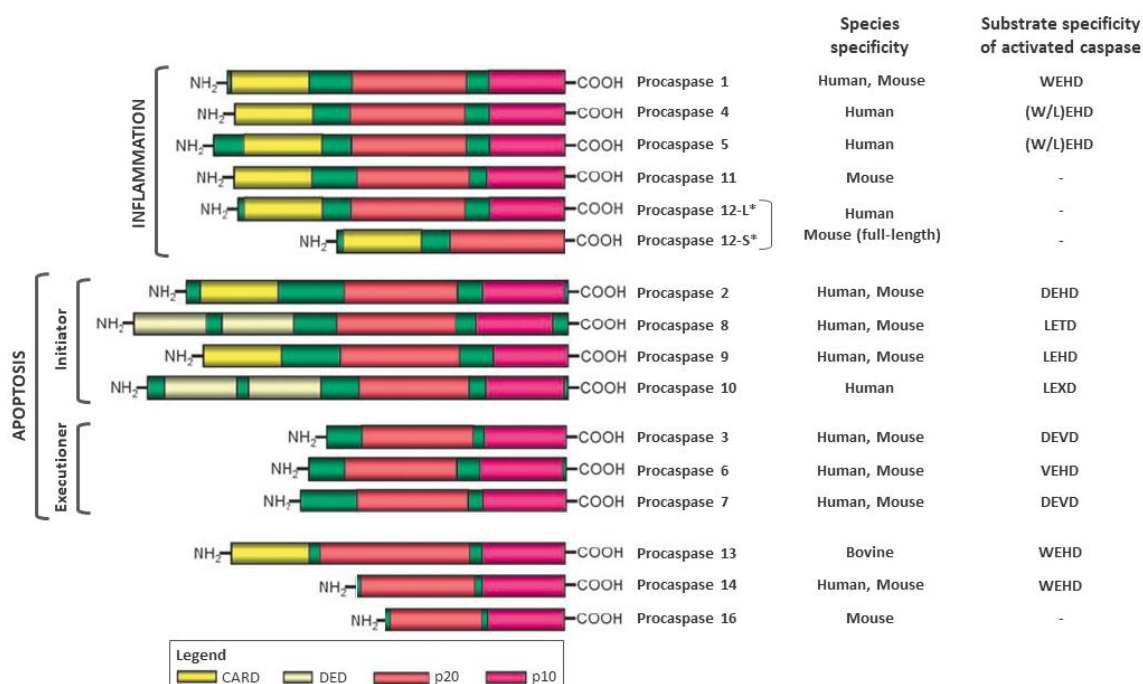


Figura 1.7 | Esquema relativo a la estructura de las caspasas de mamíferos y clasificación según su función. Se incluye también la especificidad de especie y de sustrato de cada caspasa, donde “X” puede ser treonina, serina, alanina, histidina o norleucina. L*: forma larga; S*: forma corta. Modificado de [83] y ampliado con [84–86]

Sintetizadas como zimógenos o pro-caspasas, estos precursores enzimáticos inactivos constan de una secuencia N-terminal que actúa como pro-dominio, seguido de una secuencia correspondiente a la subunidad grande, de alrededor de 20 kDa (p20), y de una secuencia correspondiente a la subunidad pequeña cercana al extremo C-terminal, de en torno a 10 kDa (p10) [43, 84]. Además, algunas pro-caspasas también poseen una pequeña secuencia que hace de enlace entre ambas subunidades [84]. Para adquirir su conformación activa, la pro-caspasa debe sufrir varios cortes proteolíticos en determinados residuos de aspártico localizados entre el pro-dominio y ambas subunidades, lo que hace que se libere el pro-dominio y que las dos subunidades heterodimericen, formándose después un tetrámero por dimerización de los heterodímeros (p20-p10)₂ [83, 84]. En este heterotetrámero, que constituye la caspasa madura, los dos heterodímeros se emparejan de forma antiparalela, de manera que los dos centros activos quedan expuestos en extremos opuestos de la caspasa [84] (Fig. 1.8).

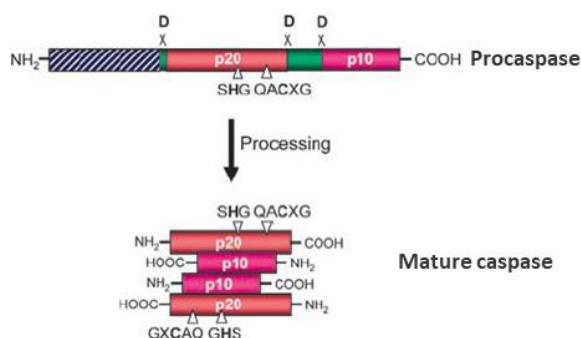


Figura 1.8 | Esquema relativo a la activación de las pro-caspasas. Se indican los residuos implicados en la formación del centro activo [83].

Dependiendo de la estructura del pro-dominio y de su función final, las caspasas se pueden clasificar en inflamatorias (1, 4, 5, 11 y 12) y apoptóticas (2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10), y dentro de estas últimas, se distingue entre caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7) [76, 84, 85, 87] (Fig. 1.7). Las pro-caspasas inflamatorias poseen un pro-dominio grande (más de 90 residuos) y actúan en la respuesta inmune innata al proteolizar precursores de citoquinas pro-inflamatorias como pro-IL-1 β o pro-IL-18 [83, 87]. Por otro lado, las pro-caspasas apoptóticas iniciadoras también contienen un pro-dominio grande, mientras que el pro-dominio de las efectoras es pequeño (de 20 a 30 residuos), y ambos tipos de caspasas son necesarios para la consecución de la apoptosis [76, 83, 87].

En el pro-dominio de las pro-caspasas iniciadoras de la vía extrínseca (8 y 10) se localizan los dominios DED, mientras que en el de la iniciadora de la ruta intrínseca (9) y de las inflamatorias se encuentra el dominio CARD [83]. Estos dominios constan de 80 a 100 residuos y son los responsables del reclutamiento de estas pro-caspasas a sus respectivos complejos de señalización (DISC, apoptosoma e inflammasoma, respectivamente) para inducir la muerte o la inflamación [83]. Una vez allí, se suelen activar mediante escisión autoproteolítica y desencadenar los procesos inflamatorios y apoptóticos, activando las caspasas iniciadoras a las efectoras en la apoptosis y las caspasas inflamatorias a diversas citoquinas [83].

Como cualquier proteína, las caspasas están reguladas por diferentes procesos. Pueden ser reguladas a nivel transcripcional, modificadas post-traduccionalmente y degradadas en el proteasoma [76]. Asimismo, su activación y actividad enzimática puede ser inhibida, respectivamente, por otras proteínas como c-FLIP o la familia IAP (inhibidor de proteínas de la apoptosis), en la que se incluyen c-IAP1, c-IAP2, XIAP, ML-IAP/livina y survivina [76, 84].

De todas las caspasas halladas en mamíferos, las caspasas-15, -17 y -18 no se han encontrado en los mamíferos placentarios, a diferencia de la caspasa-16 [85]. Las caspasas-11 y -13 son los ortólogos murino y bovino de la caspasa-4 humana, respectivamente; sin embargo, la caspasa-5 está ausente en ratones [85]. Por su parte, la caspasa-14 se expresa en la epidermis, siendo relevante en el proceso de cornificación y en la protección de las capas subyacentes de la piel [85]. Curioso es el caso de la caspasa-12, la cual se expresa como una proteína completa en los roedores, mientras que en la mayoría de los humanos lo hace como una proteína truncada catalíticamente inactiva (caspasa-12-S*) [38, 85]. Solamente alrededor del 20 % de las personas de ascendencia africana expresan la enzima completa (caspasa-12-L*), lo que se traduce en una respuesta inmune innata e inflamatoria atenuada y, por tanto, en una mayor susceptibilidad a sufrir septicemia [38, 85].

Hasta la fecha, se conocen más de 400 sustratos distintos de las caspasas de mamíferos [38]. En el caso de la apoptosis, las caspasas efectoras son las responsables de la demolición celular y

de que se manifiesten los signos característicos del proceso apoptótico [42]. Por un lado, activan de manera directa o indirecta la quinasa ROCK-1 y la DNasa CAD, en este caso último caso al proteolizar su inhibidor ICAD [42]. Esto desemboca en la contracción de los filamentos de actina y la subsiguiente formación de las evaginaciones de la membrana plasmática, y en la fragmentación internucleosomal del DNA y la condensación de la cromatina, respectivamente [42]. Además, inactivan flipasas lipídicas como ATP11 y activan la escramblasa XKR8, lo que conlleva la exposición de la fosfatidilserina en la semicapa externa de la membrana plasmática [42].

Evidencias recientes sugieren que la actuación de las caspasas no se limita a los procesos inflamatorios y apoptótico [85]. Por ejemplo, la caspasa-8 interviene en el mantenimiento y la homeostasis de los linfocitos T adultos y la caspasa-3 es importante en la diferenciación tisular, la regeneración y el desarrollo neuronal [85]. Caspasas como la 2, 8 y 14 poseen actividad anti-tumoral, aunque la sobreexpresión de algunas de ellas podría potenciar la tumorigénesis [85]. Además, la caspasa-2 estaría implicada en la autofagia, el metabolismo, la diferenciación, el mantenimiento de la estabilidad genómica y el envejecimiento [85, 88].

1.2.4. Apoptosis y cáncer

Las células normales pueden experimentar una sucesión de múltiples cambios a nivel genético que las transforma en células tumorales [14]. Uno de ellos es la evasión de la apoptosis, la cual es considerada una de las señas de identidad de las células tumorales, ya que les proporciona una ventaja para sobrevivir y resistencia a las terapias antitumorales [39]. De hecho, la comunidad científica acepta que la apoptosis es un evento indispensable para la eliminación de células potencialmente peligrosas [89]. No obstante, en los últimos años se ha propuesto que, paradójicamente, la apoptosis también puede desempeñar funciones oncogénicas [90]. Esto es debido a que las células apoptóticas envían señales que pueden ejercer efectos pleiotrópicos sobre las células del microambiente, favoreciendo la progresión y metástasis tumorales [90].

Las células cancerosas disponen de numerosos mecanismos para sortear la apoptosis. Uno de los más importantes quizá sea la alteración del equilibrio existente entre las proteínas anti- y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, bien por la sobreexpresión de los miembros anti-apoptóticos o bien por una menor expresión o la inactivación de las proteínas pro-apoptóticas mediante mutaciones, modificaciones post-transcripcionales o modificaciones post-traduccionales como la fosforilación [41]. Este mecanismo evasivo es especialmente útil para los tumores de origen hematológico, pues la sobreexpresión de proteínas como Bcl-2 (por ejemplo, algunos linfomas de células B, la leucemia linfocítica crónica [CLL] y el linfoma de células del manto [MCL]) o Mcl-1 (mieloma múltiple [MM]) sustenta su supervivencia [41, 55]. No obstante, las células tumorales pueden ser más susceptibles de sufrir apoptosis que las células normales, pues a

menudo sobreexpresan proteínas pro-apoptóticas, las cuales deben ser inhibidas por miembros anti-apoptóticos para prevenir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa [91]. Esto implica que las células tumorales contienen altos niveles de complejos de proteínas pro- y anti-apoptóticas, lo que rebaja el umbral apoptótico [91]. Por ello, se considera que estas células están “preparadas” para la apoptosis [91].

La desregulación de la expresión o el deterioro de las funciones de moléculas clave de las rutas apoptóticas como los receptores mortales, las caspasas, Apaf-1 y los IAPs también aparecen con frecuencia en las células tumorales y contribuyen a sortear la apoptosis y favorecer la progresión tumoral [14, 39]. Por ejemplo, el deterioro en la señalización de la vía de los receptores mortales unido a alteraciones en la vía de perforina/granzimas en los linfocitos T citotóxicos y células NK permiten a las células tumorales escapar de la acción citotóxica de estas células y evadir así el sistema inmune [46].

Otra proteína importante en el cáncer es el factor de transcripción p53, que, por su papel en procesos como la regulación del ciclo celular y el metabolismo, la senescencia celular y la reparación del daño ocasionado en el DNA, se ha ganado el sobrenombre del “guardián del genoma” [14, 39]. De hecho, cuando el daño en el DNA es leve, es capaz de activar genes que reparan ese daño [39]; sin embargo, si el daño es irreparable, activa genes implicados en la apoptosis como *PUMA* o *BAX* [39]. Por tanto, no resulta extraño que este gen supresor de tumores sea el que más veces se ha encontrado mutado o inactivado en el cáncer, lo que se traduce en la regulación a la baja de la apoptosis y en una ventaja para la supervivencia de las células tumorales, que también pueden ganar nuevas funciones oncogénicas [39]. Igualmente, alteraciones en los proto-oncogenes *MYC*, implicados en la progresión del ciclo celular y la apoptosis, los convierten en oncogenes, que contribuyen a la carcinogénesis [39].

Otros aspectos como modificaciones epigenéticas y post-traduccionales, especialmente la metilación de genes de proteínas anti- y pro-apoptóticas y la ubiquitinación y fosforilación de estas proteínas, así como la desregulación de la expresión de miRNAs, proporcionan resistencia a la apoptosis en las células tumorales [39]. Asimismo, alteraciones en el metabolismo y en las funciones mitocondriales también protegen a las células de la muerte y fomentan la progresión tumoral [39].

Tradicionalmente, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa se ha considerado el punto de no retorno de la ruta apoptótica mitocondrial, la cual puede producirse incluso en ausencia de la activación de caspasas (lo que se conoce como muerte celular independiente de caspasas) [36]. No obstante, las células que se exponen a un estímulo apoptótico pueden sobrevivir si una subpoblación de mitocondrias consigue sortear la permeabilización de su membrana mitocondrial externa (MOMP incompleta) y restablecer la red mitocondrial, lo cual

es posible en un determinado contexto: cuando las caspasas se encuentran inhibidas, las células disponen de suficiente energía para prevenir el colapso metabólico y las mitocondrias no funcionales son eliminadas mediante mitofagia [36]. Además, también es posible que, ante estímulos apoptóticos subletales, como pueden ser dosis bajas de inhibidores de la mitosis o los miméticos BH3, solamente se produzca MOMP en una pequeña subpoblación mitocondrial (MOMP minoritaria) que no culmina el proceso apoptótico y provoca daño en el DNA e inestabilidad genómica, lo que fomenta la transformación oncogénica [36]. Asimismo, cuando las células se exponen brevemente a una señal apoptótica como los quimioterápicos, estas inician la apoptosis, pero no la completan si la señal de muerte es eliminada, de manera que revierten su fenotipo y sobreviven [39].

1.2.5. Muerte celular y el tratamiento del cáncer

Uno de los mecanismos que las células tumorales utilizan para sortear la ruta apoptótica mitocondrial consiste en incrementar la expresión de una o varias proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, lo que desemboca en el desarrollo de resistencias a las terapias tradicionales como la radiación y la quimioterapia [65, 92]. Por otro lado, las mutaciones y el estrés que sufren estas células durante el proceso tumorigénico incrementan la expresión de los miembros pro-apoptóticos de la familia, incluidas las proteínas “solo-BH3”, de manera que, para garantizar su supervivencia, estas son secuestradas por las proteínas anti-apoptóticas [65, 93]. Estos hallazgos han contribuido a mejorar en los últimos años el conocimiento que se tiene de los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis, lo que ha impulsado el diseño de nuevos fármacos dirigidos contra algunas de las proteínas que participan en dicho proceso. De entre todos ellos, los denominados **miméticos BH3** son los que más éxito han tenido y están tratando de hacerse un hueco en la panoplia armamentística contra el cáncer.

Estos compuestos son pequeñas moléculas orgánicas que intentan reproducir la actividad pro-apoptótica de las proteínas “solo-BH3” cuando su dominio BH3 se une al bolsillo hidrofóbico de los miembros anti-apoptóticos (Fig. 1.9), de manera que la interrupción competitiva de las interacciones entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas y la neutralización de estas últimas conduce a la muerte de las células por apoptosis [42, 65, 90, 94]. Por lo general, los miméticos BH3 son compuestos lipofílicos, con un peso molecular relativamente elevado y químicamente complejos que se unen con gran afinidad a su(s) proteína(s) Bcl-2 diana(s) y activan exclusivamente la vía apoptótica dependiente de Bax/Bak [93, 95].

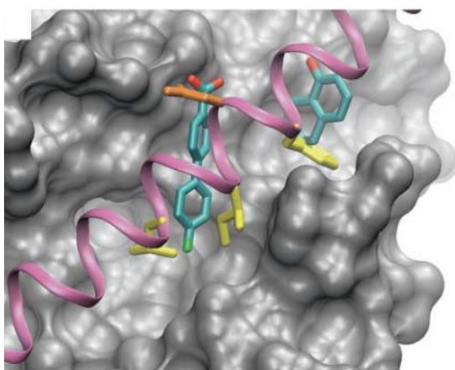


Figura 1.9 | Superposición de la interacción de Bim y los precursores del mimético BH3 ABT-737 en el bolsillo hidrofóbico de Bcl-X_L. Malva: hélice α de Bim. Gris: bolsillo hidrofóbico de Bcl-X_L. Amarillo y naranja: residuos conservados del dominio BH3 de Bim necesarios para su unión a Bcl-X_L (Leu94, Ile97 y Phe101 en amarillo y Asp99 en naranja). Azul: esqueleto carbonatado de los precursores de ABT-737. Rojo: oxígeno. Verde: flúor. Modificado de [96].

La profundización en la biología estructural de las proteínas de la familia Bcl-2 y la identificación de ligandos basada en relaciones estructura-actividad obtenidas por resonancia magnética nuclear han hecho posible el desarrollo de numerosas moléculas de este tipo [93]. La mayoría de ellas están siendo evaluadas a nivel preclínico, pero solo algunas han alcanzado la fase de ensayos clínicos, donde su potencial antitumoral como agentes únicos o en combinación con otras terapias es objeto de estudio [97]. Pese a que los resultados obtenidos en los diferentes ensayos hasta ahora son prometedores, los organismos reguladores de Estados Unidos y la Unión Europea únicamente han dado luz verde al uso de un solo mimético BH3 en la clínica, denominado ABT-199 o venetoclax [97, 98].

Muchas investigaciones se han centrado en el estudio del primer mimético BH3 validado que se desarrolló, ABT-737, y sus análogos, que han logrado alcanzar la fase de ensayos clínicos [95]. ABT-737 fue el resultado de la colaboración de las farmacéuticas estadounidenses AbbVie (antiguamente Abbott Laboratories) e Idun [95, 99]. Su gran afinidad por Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w ($K_i \leq 1$ nM) pero escasa por Mcl-1 y A1 ($K_i > 1$ μ M) lo equiparan funcional, aunque no estructuralmente, al dominio BH3 de Bad [65, 97, 100]. A nivel preclínico, la respuesta sobre las células malignas es superior a la observada en células de tejido normal [97]. Por sí solo, exhibe actividad citotóxica en líneas celulares de linfoma, leucemia y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), así como en células primarias provenientes de pacientes, pero no es efectivo en tumores que sobreexpresan Mcl-1 [14, 97, 101]. Además, la citotoxicidad de agentes antitumorales tradicionales o dirigidos en tumores sólidos, leucemia y linfoma se incrementa cuando ABT-737 se incorpora al tratamiento [97]. En modelos de xenoinjerto de ratón de linfoma y de NSCLC consiguió inhibir el crecimiento del tumor en solitario, y este logro se extendió a otros tipos de tumores al combinarlo con radiación y otros quimioterápicos [40]. A pesar de estos resultados esperanzadores, su baja solubilidad en medio acuoso y su mala biodisponibilidad han supuesto un serio obstáculo para su aplicación en la clínica, pues únicamente hay registrados dos ensayos clínicos con él [102]. Estas características fueron la clave para su rediseño estructural que dio lugar al mimético BH3 de segunda generación ABT-263 o navitoclax [40, 97].

Factores como compartir perfil inhibitorio y eficacia antitumoral con ABT-737, pero poseer propiedades físicoquímicas y farmacológicas mejoradas, como biodisponibilidad por vía oral, convirtieron a navitoclax en el primer mimético BH3 en alcanzar la fase clínica [95, 97]. Estudios preclínicos revelaron que ABT-263 y su predecesor actuaban interrumpiendo la interacción de las proteínas “solo-BH3” con Bcl-2 [92]. De hecho, navitoclax ejerce su acción mayoritariamente sobre complejos Bcl-2/Bim en lugar de sobre Bcl-2 libre en células que sobreexpresan esta proteína anti-apoptótica, de la misma forma que inhibe preferentemente los complejos que Bim forma con Bcl-2 a los que establece con Bcl-X_L o Bcl-w [103]. Los buenos datos preclínicos como agente único y combinado con terapias convencionales en tumores sólidos y hematológicos facilitaron su entrada a la etapa clínica, donde estudios de fase I demostraron que navitoclax era efectivo como monoterapia frente a neoplasias malignas de células B, especialmente en la CLL recidivante o refractaria, donde reduce la cantidad de células tumorales circulantes y provoca la respuesta del 35 % de los pacientes [65, 94]. En otras neoplasias hematológicas, como el linfoma folicular, el efecto antitumoral era limitado, pero su combinación con rituximab (anticuerpo anti-CD20) mejoraba la respuesta, algo que también se observó en la CLL [65]. Estudios de fase II también mostraron el potencial de esta combinación como tratamiento de primera línea en la CLL [94]. Esto ha contribuido a que, por el momento, no haya cesado su estudio a nivel preclínico y en la clínica como agente único o en combinación con otras terapias antitumorales [102]. No obstante, ensayos *in vivo* ya manifestaron que tanto ABT-737 como navitoclax acarrearán una disminución de los niveles de plaquetas, pues su supervivencia es altamente dependiente de Bcl-X_L [92, 102]. En el caso de ABT-263, la trombocitopenia es temporal, aguda y rápida, y puede controlarse utilizando dosis adecuadas [49, 65, 92, 94]. Por tanto, con el propósito de superar este inconveniente, se han aprovechado las diferencias existentes entre las superficies de interacción de las proteínas anti-apoptóticas para desarrollar inhibidores selectivos de cada una de ellas [94, 95, 102].

El primero de ellos, un inhibidor oral específico de Bcl-2 conocido como ABT-199 o venetoclax, fue desarrollado por las farmacéuticas AbbVie y Genentech junto con el *Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research* (Australia) [65, 95]. Pese a su analogía estructural con sus antecesores, la excepcional selectividad de venetoclax por Bcl-2 ($K_i = 0,010$ nM) en comparación con Bcl-X_L y Bcl-w (K_i 4000 y 2000 veces mayor, respectivamente) previene la indeseable trombocitopenia a la vez que muestra actividad antitumoral en numerosos tumores sólidos y hematológicos [92, 97, 101, 102]. Si bien su aplicación como agente único en la leucemia linfoblástica aguda (ALL), el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el neuroblastoma ofrece buenos resultados, en otros tipos de cáncer, como la leucemia mieloide aguda (AML), el mieloma múltiple y el linfoma no-Hodgkin (NHL), la respuesta a venetoclax ha sido más heterogénea [92, 102]. Esto podría deberse a que cánceres como el mieloma múltiple o

el linfoma folicular son más dependientes de Bcl-X_L y Mcl-1 [65]. Sin duda, los grandes beneficiados de este tratamiento son los pacientes con tumores dependientes de Bcl-2, especialmente la CLL [102]. Tanto es así que la extraordinaria eficacia frente a esta enfermedad demostrada en varios ensayos clínicos ha conducido a la rápida aprobación por parte de la FDA y la EMA de su uso en clínica, primero como monoterapia en pacientes con CLL y posteriormente combinado con otros agentes también en la CLL y en el SLL (linfoma linfocítico de células pequeñas) y la AML [104, 105]. No obstante, venetoclax se ha evaluado y continúa evaluándose, generalmente combinado con otros tratamientos, en pacientes con diversos tumores, especialmente hematológicos, en los cuales se están obteniendo resultados realmente esperanzadores [102]. Pese a todo, la extensa aplicación de venetoclax en los cánceres sanguíneos ha provocado el desarrollo de resistencias a este fármaco, principalmente debidas a la sobreexpresión de otras proteínas anti-apoptóticas, la inestabilidad genómica o el funcionamiento anómalo del sistema OXPHOS [101]. Por tanto, muchos estudios van encaminados a buscar combinaciones efectivas con otras terapias que amplíen el rango de acción y mejoren la respuesta, los cuales están remitiendo muy buenos resultados [92, 102].

El éxito cosechado por venetoclax ha animado a diferentes compañías farmacéuticas a desarrollar nuevos inhibidores selectivos de Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 y evaluarlos en tumores sólidos y de origen hematológico [92]. Algunos de estos inhibidores de Bcl-2 novedosos son S55746, S65487 y APG-2575, los cuales se encuentran siendo evaluados en ensayos clínicos como agentes únicos o combinados con otros fármacos [94, 106]. Por su parte, moléculas dirigidas específicamente contra Bcl-X_L y Mcl-1 pueden ser de gran ayuda para el tratamiento de muchos tumores sólidos y algunas neoplasias hematológicas, ya que ambas proteínas están relacionadas con la aparición de resistencias [93, 107].

Los inhibidores selectivos de Bcl-X_L han demostrado ser efectivos en ambos tipos de tumores, pero la toxicidad plaquetaria que provocan ha impedido su progresión hacia la clínica [40, 107]. El primer inhibidor de este tipo que se describió fue WEHI-539, el cual induce la muerte de células dependientes de Bcl-X_L y muestra actividad antitumoral en varios tumores sólidos; sin embargo, sus pésimas propiedades físicoquímicas han imposibilitado su dosificación *in vivo* [93, 94, 108]. El refinamiento de la estructura química de esta molécula dio lugar a un compuesto más potente, A-1155463, que muestra una afinidad por Bcl-X_L en el rango picomolar ($K_i < 0,01$ nM), mientras que su unión a otras proteínas anti-apoptóticas es mucho más débil ($K_{iBcl-2} = 80$ nM; $K_{iBcl-w} = 19$ nM; $K_{iMcl-1} > 440$ nM) [108]. Los primeros estudios revelaron que este compuesto provocaba una trombocitopenia rápida y reversible en ratones inmunodeprimidos tras una única administración por vía intraperitoneal, pero también inhibía el crecimiento tumoral en ratones de este tipo xenoinjertados con la línea celular H146 (NSCLC) [108]. No obstante, su mala solubilidad y escasa absorción por vía oral impulsaron la optimización de su estructura química,

originándose A-1331852, el inhibidor más potente de Bcl-X_L sintetizado hasta la fecha, el cual posee la ventaja de poder administrarse por vía oral [65, 93]. Ambos inhibidores son bien tolerados en ratones, mejoran modestamente la eficacia de docetaxel en tumores sólidos y reducen la aparición de la neutropenia observada con navitoclax [65, 94]. En la actualidad, los estudios con ambos compuestos continúan en distintos tipos de tumores [109–112]. Además, estudios recientes ponen de manifiesto el potencial de ambos fármacos como agentes senolíticos, capaces de eliminar exclusivamente a las células senescentes [113]. Finalmente, A-1293102 es la incorporación más reciente a este grupo de inhibidores. Con características estructurales similares a ABT-737, navitoclax y A-1155463, este compuesto tiene una afinidad por Bcl-X_L en el rango picomolar y elimina eficaz y selectivamente células tumorales dependientes de esta proteína anti-apoptótica [114]. Una aproximación interesante para atacar preferentemente y de forma más segura a las células tumorales son los conjugados anticuerpo-fármaco, que pueden contener uno o varios miméticos BH3 [95]. La primera molécula de este tipo dirigida contra Bcl-X_L es ABBV-155, también conocido como mirzotamab clezutoclax, el cual consiste en un anticuerpo dirigido contra B7-H3 que lleva acoplado un inhibidor de Bcl-X_L y actualmente se encuentra en ensayos de fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados como agente único o combinado con taxanos [40, 107].

Por otro lado, el desarrollo de inhibidores específicos de Mcl-1 ha estado limitado por el tamaño y la rigidez del surco hidrofóbico de unión al dominio BH3, la elevada afinidad de esta proteína anti-apoptótica por sus ligandos y la posible toxicidad de estos compuestos sobre muchos tipos de células normales [93, 94, 107]. Algunos compuestos de origen natural como la prodigiosina se dirigen específicamente al bolsillo hidrofóbico de Mcl-1 [102], pero los grandes avances en este campo se deben a múltiples investigaciones llevadas a cabo a partir de la segunda mitad de la década de 2010 [107]. A-1210477 fue el primer mimético BH3 selectivo de Mcl-1 en comparación con Bcl-2 y Bcl-X_L ($K_i = 28$ nM frente a $K_i > 10000$ nM, respectivamente), mostrando actividad antitumoral en solitario o combinado con navitoclax y venetoclax en diferentes líneas celulares tumorales [93]. S63845 se une con mayor afinidad a Mcl-1 ($K_i < 1,2$ nM) y es aproximadamente 1000 veces más potente que A-1210477 induciendo la muerte de la línea celular de mieloma múltiple H929, la cual es dependiente de Mcl-1 [115]. De hecho, es altamente activo como agente único *in vitro* e *in vivo* en células tumorales dependientes de Mcl-1, apenas afecta a células dependientes de Bcl-2 y Bcl-X_L y no tiene efecto en tejidos normales [115]. Su potencial terapéutico abarca desde neoplasias hematológicas, incluidos linfomas, leucemias y el mieloma múltiple, hasta varios tipos de tumores sólidos, en monoterapia o combinado con inhibidores de quinasas [115]. Un derivado suyo, S64315/MIK665, es más afín a Mcl-1 ($K_i = 0,026$ nM) y despliega una eficacia igual o mejor solo o en combinación con venetoclax en líneas celulares de melanoma con diferentes alteraciones genéticas [93]. Otros

inhibidores prometedores son AMG-176, AZD5991 y VU661013, según ensayos preclínicos llevados a cabo en modelos de leucemia, linfoma y mieloma múltiple, y todavía hay algunos en una etapa muy temprana de su desarrollo [93, 95, 102, 107]. Gracias a estos resultados alentadores, algunos de ellos se encuentran siendo evaluados en solitario o combinados con otros agentes en cánceres sanguíneos en fases clínicas tempranas, aunque la cardiotoxicidad es un importante efecto secundario asociado a la inhibición de Mcl-1 [106].

Contrariamente a Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1, el triplete Bcl-w, Bfl-1/A1 y Bcl-B ha sido menos estudiado. Además, algunas proteínas, como Bcl-w, presentan una elevada flexibilidad conformacional que obstaculiza el desarrollo de miméticos BH3 dirigidos contra ellas [106].

Conocer la dependencia de las células tumorales por las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, lo que se conoce como *BH3-profiling*, podría ser una estupenda herramienta experimental para predecir su sensibilidad a sufrir apoptosis y, en la clínica, ayudaría a pronosticar la respuesta de los pacientes a la quimioterapia y a personalizar el tratamiento [41, 116].

1.3. Autofagia

Las primeras alusiones al término “autofagia” datan de la década de 1860, cuando se empleaba para hacer referencia a un sistema de autoalimentación del cuerpo humano que, ante la falta de nutrientes, permite la supervivencia del individuo [117]. No obstante, fue Christian de Duve quien, alrededor de un siglo más tarde, se valió de este término para referirse a lo que hoy entendemos por autofagia: el proceso celular en el que el material intracelular es entregado a los lisosomas o a la vacuola para su degradación [117].

1.3.1. Mecanismos autofágicos

Altamente conservada entre los organismos eucariotas, la autofagia constituye el principal mecanismo catabólico para las células al permitir el reciclaje celular de biomoléculas y orgánulos y la eliminación de patógenos [118, 119]. En los mamíferos se han descrito tres formas principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas [119] (Fig. 1.10). Pese a que difieren entre ellas en el aspecto morfológico, la finalidad de todas ellas es degradar material citoplasmático (incluidas proteínas citosólicas y orgánulos dañados) en los lisosomas y liberar los productos resultantes al citosol para usarlos como fuente de energía o para crear nuevas estructuras y orgánulos celulares [18, 119].

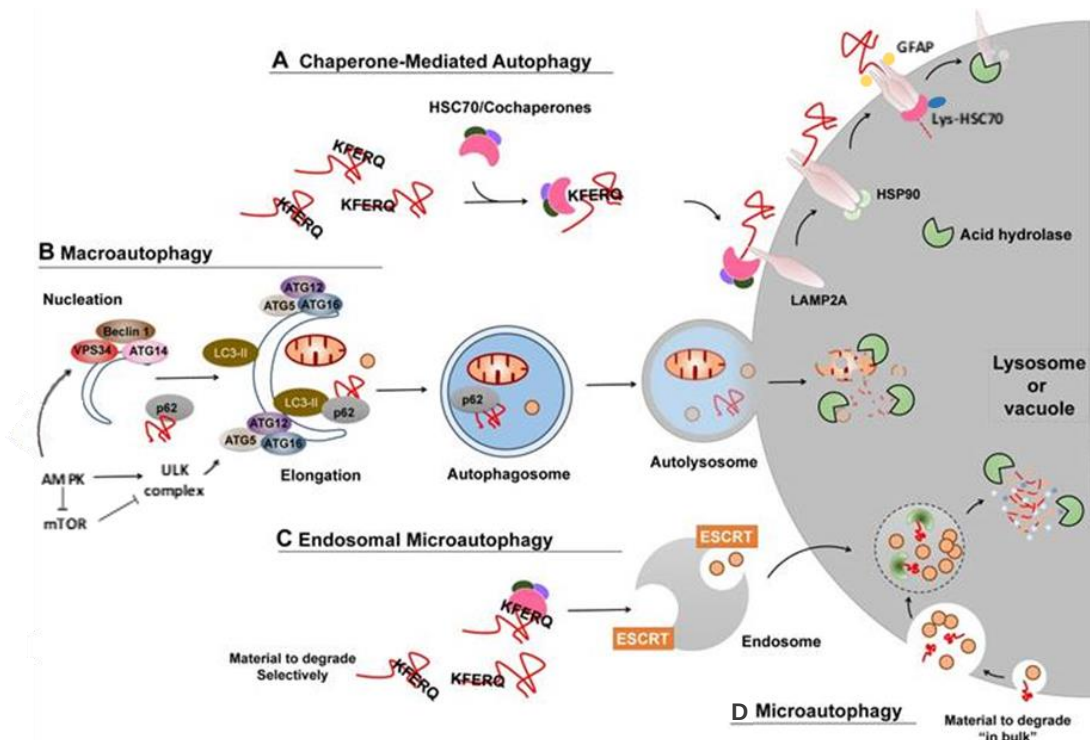


Figura 1.10 | Vías autofágicas principales. (A) Autofagia mediada por chaperonas. **(B)** Macroautofagia. **(C)** Microautofagia endosomal. **(D)** Microautofagia. Adaptado de [118, 120].

La forma mejor caracterizada de autofagia es la **macroautofagia** (Fig. 1.10B), considerada un proceso citoprotector al ayudar a mantener la homeostasis celular [119]. Sin embargo, una activación excesiva de este proceso puede tener efectos negativos, de la misma forma que defectos en esta vía están relacionados con el envejecimiento y múltiples enfermedades, como las neurodegenerativas, la diabetes o el cáncer [119]. Este mecanismo se basa en la formación *de novo* de vesículas de doble membrana en el citoplasma, denominadas autofagosomas, a partir de la maduración de las estructuras primarias (fagóforos) [119]. Tras su formación, los autofagosomas ceden la carga citoplasmática secuestrada a los lisosomas, con los que se fusionan, convirtiéndose en auto(fago)lisosomas [27, 119]. Así, gracias al pH ácido y a las hidrolasas de los lisosomas, la membrana interna del autolisosoma primero y la carga autofágica después, se degradan y los productos resultantes son exportados al citosol mediante permeasas lisosomales para su reutilización [119]. En los mamíferos, existe un nexo de unión entre la macroautofagia y la vía endocítica, ya que la fusión de los autofagosomas con endosomas tempranos o tardíos es frecuente, dando lugar a la formación de anfisomas que posteriormente se fusionarán con los lisosomas para generar autolisosomas [119].

A nivel molecular, este proceso da comienzo cuando la proteína AMPK inhibe a mTOR y estimula los complejos ULK1 y PtdIns3K de clase III [118]. El complejo ULK1, compuesto por ULK1, FIP200, ATG13 y ATG101, es esencial para las etapas de iniciación y nucleación [25,

121]. Durante la nucleación, se forman membranas pre-autofagosomales a partir de membranas lipídicas que reclutan el complejo de la PtdIns3K de clase III, compuesto al menos por PIK3C3/VPS34, Beclina 1 y ATG14L o UVRAG, y que se encarga de impulsar el tráfico de las membranas y la correcta localización de proteínas autofágicas en la estructura en creación [120]. Además, numerosas proteínas ATG son necesarias para la progresión del fagóforo a autofagosoma y el secuestro de la carga autofágica [118, 120]. Por ejemplo, el complejo ATG1-ATG13 recluta a la proteína transmembrana ATG9, la cual es esencial para la lipidación inicial de la membrana del fagóforo, mientras que el multímero ATG5-ATG12-ATG16 interviene en la lipidación de LC3 (LC3-II) al conjugarlo con fosfatidiltanolamina [25, 120]. De esta forma, LC3-II puede interactuar con diferentes receptores, favoreciendo así el reclutamiento de sustratos, y cuando el autofagosoma está completamente formado, LC3-II se libera al citosol y se recicla [25, 120].

En la **microautofagia** (Fig. 1.10D), por el contrario, la captación de la carga autofágica se produce directamente en los lisosomas como consecuencia de la formación de invaginaciones de la propia membrana lisosomal, de manera que las pequeñas vesículas resultantes son degradadas por las hidrolasas lisosomales en la luz del lisosoma [25]. Puesto que esta es la forma de autofagia menos estudiada, todavía quedan por esclarecer diversos aspectos, como su mecanismo de regulación y su posible papel en situaciones fisiológicas y patológicas, incluido el cáncer [118–120].

En contraposición a la macro y microautofagia, la **autofagia mediada por chaperonas** (Fig. 1.10A) es un tipo selectivo de autofagia en el que la carga no queda confinada en estructuras membranosas [118, 119]. En su lugar, un complejo formado por la chaperona Hsc70 citosólica y sus co-chaperonas moduladoras reconoce una secuencia similar a KFERQ en las proteínas diana (subunidades del proteasoma, proteínas de unión a lípidos y calcio o factores de transcripción y sus inhibidores, entre otros) y estas son conducidas una a una hacia la membrana del lisosoma [118, 119]. Una vez allí, tanto el sustrato como la chaperona Hsc70 interactúan con la región citosólica de la proteína de membrana asociada a lisosomas LAMP2A en su forma monomérica, lo que induce la formación del complejo multimérico de LAMP2A, que es estabilizado por la proteína de filamentos intermedios GFAP y la chaperona luminal Hsp90 [121]. El sustrato es desplegado por la acción de las chaperonas citosólicas, entre ellas Hsc70 y Hsp90 y, en este estado y gracias a la chaperona lisosomal Hsc70 (Lys-Hsc70), alcanza la luz lisosomal, donde es totalmente degradado [118, 119, 121]. Finalmente, Hsc70 citosólica dispersa activamente el complejo de translocación, de manera que LAMP2A vuelve a su estado monomérico dispuesta a iniciar una nueva ronda de translocación [119]. Este proceso autofágico se activa en respuesta a estrés oxidativo, largos periodos de privación de nutrientes y toxinas que dañan las proteínas [119]. Además, juega un papel decisivo en el metabolismo y el envejecimiento, y algunos estudios

que le otorgan un papel relevante en la biología del cáncer, tanto en estadios tempranos como agresivos [118].

Generalmente, la macro y microautofagia se consideran procesos no selectivos, donde el contenido de los autofagosomas es heterogéneo y, aparentemente, secuestrado al azar [120, 122]; no obstante, estos mecanismos también pueden eliminar estructuras específicas [120]. Para ello, la macroautofagia selectiva se vale de determinados receptores, como p62, NBR1, NDP52 y BNIP3, que además de reconocer su carga diana, permiten el inicio de la formación del autofagosoma *in situ* [120, 122]. Por otro lado, en el proceso conocido como microautofagia endosomal (Fig. 1.10C) se produce el secuestro selectivo de proteínas citosólicas solubles en cuerpos multivesiculares/endosomas tardíos con la intervención de la maquinaria ESCRT [120, 123]. Los sustratos de este proceso contienen motivos similares a KFERQ que son reconocidos por la chaperona Hsc70 citosólica, la cual los entrega a los lisosomas o endosomas al unirse a la fosfatidilserina de sus membranas con la ayuda de ESCRT, sin que LAMP2A intervenga en el proceso ni que sea necesario el desplegamiento del sustrato [121]. Los sustratos que pueden degradarse de forma selectiva son muy variados, pues pueden ser desde proteínas individuales como la ferritina, pasando por grandes complejos proteicos como los ribosomas, hasta orgánulos [122]. En este último caso, el proceso recibe distintos nombres en función del orgánulo diana: mitofagia (mitocondrias), pexofagia (peroxisomas), lipofagia (gotas lipídicas), lisofagia (lisosomas), ER-fagia/reticulofagia (retículo endoplásmico) y nucleofagia (núcleo) [122]. Incluso la implicación de la autofagia en la eliminación de patógenos recibe un nombre específico, xenofagia [122].

1.3.2. Autofagia y apoptosis

Dada la importancia de la autofagia y la apoptosis en el mantenimiento de la homeostasis a nivel celular, tisular y del organismo, la primera actuando como mecanismo de supervivencia celular y la segunda como vía de desmantelamiento celular, no resulta extraño que ambos procesos estén interconectados [124]. Tanto es así que ambas vías pueden compartir estímulos inductores y la comunicación que establecen entre ellas resulta determinante para el destino final de las células [125]. De hecho, la apoptosis y la autofagia suelen actuar como dos procesos mutuamente excluyentes, pues la autofagia reprime la inducción de la apoptosis, mientras que la activación de la cascada apoptótica suprime la maquinaria autofágica [124, 125]. Se han descrito numerosos vínculos entre ambas rutas (Tabla 1.2), de manera que proteínas de la vía apoptótica pueden intervenir en el proceso autofágico y viceversa, lo que les otorga una doble función que les permite regular ambos procesos [124]. Por tanto, estas comunicaciones juegan un papel fundamental en el desarrollo de muchas enfermedades, como las neurodegenerativas y el cáncer [124, 126].

Tabla 1.2 | Puntos de convergencia entre la autofagia y la apoptosis.

Conexión autofagia-apoptosis	Efecto en la célula
Complejo Beclina 1- (Bcl-2/Bcl-X_L)	Bloqueo de la autofagia al impedir la interacción de Beclina 1 con la PtdIns3K de clase III [119, 125, 126].
Bim	Inhibición de la formación de autofagosomas al reclutar Beclina 1 al complejo motor de dineína [124].
Interacción UVRAG-Bax	Supresión de la apoptosis al inhibir la translocación de Bax del citosol a la mitocondria [125].
Conjugación ATG12-ATG3	Sensibilización de las células a la vía apoptótica intrínseca [125].
Asociación ATG12-Mcl-1	Efecto pro-apoptótico al evitar la unión de Mcl-1 a proteínas pro-apoptóticas [125].
Interacción ATG5-FADD	Inhibición de la vía extrínseca de la apoptosis al impedir la unión de DISC a FADD. Inducción de muerte celular dependiente de autofagia [125].
Complejo ATG7-caspasa-9	Estimulación de la ruta autofágica e inhibición de la vía apoptótica mitocondrial al promover la formación de LC3-II autofagosomal dependiente de ATG7 y, por tanto, entorpecer el reclutamiento y la actividad proteolítica de la caspasa-9 en el apoptosoma [126].
Procesamiento de ATG5 mediada por calpaína	La forma trunca de ATG5 no tiene actividad autofágica pero sí pro-apoptótica al unirse a Bcl-X _L y, en consecuencia, desencadenar la vía apoptótica mitocondrial [127].
Rotura de Ambra1 mediada por calpaína y caspasas	Inactivación de la vía autofágica [124, 126].
Escisión de ATG4D mediada por caspasa-3	El fragmento N-terminal de ATG4D resultante escinde y elimina los lípidos de la proteína GABARAP-L1, lo que apaga el proceso autofágico [126]. El fragmento C-terminal es reclutado a la matriz mitocondrial, favoreciendo la vía intrínseca de la apoptosis [126].
Rotura de Beclina 1 mediada por caspasas (-3, -6, -9 y -10)	Imposibilidad de inducción de la autofagia. Promoción de la apoptosis en algunas situaciones al localizarse en la mitocondria el fragmento C-terminal resultante que carece del dominio BH3 y provocar la liberación de factores apoptogénicos [124].
Caspasa-6	Bloqueo de la autofagia debido a la escisión de p62, ATG3, ATG5 y Beclina 1 [126].
Caspasa-8	Inhibición de la autofagia al procesar proteínas autofágicas (RIPK1, ATG3, ATG5, p62 y Beclina 1) [125, 128]. Favorecimiento de la vía extrínseca de la apoptosis al ser reclutada (por los ejes ATG5-FADD o p62-LC3) y activada en los autofagosomas [125].
p53	p53 nuclear impulsa la vía autofágica a través de regulación positiva de genes diana (DRAM, DAPK y ATG5) [124]. p53 citosólico previene la autofagia al inducir la degradación de Beclina 1 mediada por peptidasas específicas de ubiquitina y/o al inhibir la vía AMPK-mTOR-ULK1 [125].
FLIP	Compite con LC3 por unirse a ATG3 e inhibe la lipidación de LC3, bloqueando la autofagia [126]. Pequeños péptidos de FLIP impiden la interacción FLIP-ATG3, pero no perjudican la asociación LC3-ATG3, favoreciendo la autofagia [124].
IAPs	La inhibición de survivina (IAP) favorece la autofagia [124].
OMI/HtrA2	Promoción de la autofagia al proteolizar Hax-1 (miembro de la familia Bcl-2 anti-apoptótico) y romper el complejo Beclina 1-Hax-1 [124].

1.4. Ciclo celular

En 1855 Rudolf Virchow ya afirmó que toda célula proviene de otra preexistente [129]. Sin embargo, tuvo que pasar casi un siglo hasta que el concepto de “ciclo celular” naciera de la mano de Howard y Pelc [130]. Hoy en día, se sabe que el ciclo celular es un proceso evolutivamente conservado a lo largo de todo el dominio Eukarya, el cual implica una serie de eventos moleculares ordenados y extraordinariamente regulados que garantizan la generación de dos células idénticas genéticamente [129, 131, 132]. Esto es posible gracias a la correcta duplicación del DNA genómico y su posterior segregación entre las células hijas, dos eventos que tienen lugar en dos etapas separadas temporalmente: la interfase y la fase M (mitosis), respectivamente [132].

La interfase es la etapa más larga del ciclo, en la que las células crecen, son activas metabólicamente y duplican su material genético [131–133]. Por su parte, la fase M es una etapa más corta y en ella acontece la correcta segregación del material genético y la citoquinesis, en la que se reparte el contenido celular entre las dos células hijas [132, 133]. En este momento, el ciclo celular se reinicia y las células pueden volver al inicio de la interfase [132]. La duración global del proceso depende cada tipo de célula, pero las células de mamífero en cultivo suelen tardar alrededor de 24 horas en completar un ciclo celular [131]. No obstante, solo una pequeña parte de las células del organismo humano se encuentran proliferando activamente, concretamente las localizadas en tejidos que se autorrenuevan como el epitelio y la médula ósea [134]. La mayoría de las células del organismo son quiescentes que, o bien han abandonado el ciclo celular y se encuentran terminalmente diferenciadas, como las neuronas o los miocitos, o bien se encuentran en un estado quiescente reversible, como les sucede a las células gliales o los hepatocitos [134].

La interfase se compone a su vez de varias fases: una fase replicativa del DNA (S) y dos fases *gap*, una pre-replicativa (G1) y otra post-replicativa (G2) [132]. Durante la fase G1 temprana las células pueden seguir dos caminos: seguir las etapas del ciclo y proliferar o entrar en un estado de quiescencia, no proliferativo, reversible (G0), del que pueden salir y reincorporarse al ciclo celular [131–133]. Si finalmente las células optan por continuar en la fase G1, estas crecen, aumentan de tamaño y llevan a cabo la síntesis proteica [131, 133, 135]. Al final de esta fase existe una “ventana de decisión” que las células deben superar para progresar a la siguiente fase [132]. En la fase S, que dura aproximadamente 6 horas, las células duplican sus cromosomas y el centrosoma, el principal orquestador de los microtúbulos, para prepararse para la división nuclear [131]. Completada esta fase, las células alcanzan la fase G2, de en torno a 4 horas de duración, en la que se evalúa el resultado del proceso de la replicación cromosómica y en la que las células se preparan para la correcta repartición de los cromosomas entre las células hijas [131, 132]. Al igual que sucedía en la fase G1, al final de la fase G2 existe otra ventana de decisión que las células deben superar para proseguir a la siguiente etapa, la fase M [132].

La fase M, por su parte, es la etapa más corta del ciclo celular eucariota, pues solamente se extiende de una a dos horas, y en ella tienen lugar la mitosis, que consta de cinco de fases, y la citokinesis [131]. La mitosis se inicia con la profase, en la que la cromatina nuclear se condensa y forma los cromosomas en el núcleo, y termina con la ruptura de la membrana nuclear [131]. En la prometáfase se forma el huso mitótico, constituido por los haces de microtúbulos que brotan de cada centrosoma y que establecen uniones bilaterales con la región central de cada cromátida hermana (el cinetocoro) [131, 132]. Durante la metafase, los cromosomas se alinean a lo largo del plano ecuatorial del huso, formando la placa metafásica [131, 132]. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan originando dos cromosomas independientes [131]. Finalmente, durante la telofase los cromosomas se dilatan, se genera una nueva envuelta nuclear alrededor de cada conjunto de cromátidas y comienza a producirse el anillo contráctil de actina y miosina en el surco de división del citoplasma [131]. Esta estructura y los microtúbulos interpolares remanentes en la zona central del huso permiten la culminación de la citokinesis, es decir, la división de la célula parental mediante estrangulación, que da lugar a dos células hijas con núcleos y citoplasmas independientes [131, 136]. Análogamente a lo que sucede en la interfase, las células pueden tomar la decisión de abandonar la mitosis durante la transición metafase-anafase [132].

La progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular en los mamíferos está estrictamente regulada por una familia de proteínas quinasas: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), cuya actividad depende, a su vez, de su unión a ciclinas o a inhibidores de CDKs [133].

Las CDKs son una familia de serín/treonín quinasas que se asocian con las proteínas ciclinas, formando complejos activos en los que la ciclina es la subunidad reguladora y la CDK es el componente catalítico y cuyo cometido es fosforilar distintas proteínas diana para promover el ciclo celular [131, 132]. Se han identificado más de una veintena de ciclinas y CDKs en los mamíferos, de las cuales, las ciclinas A, B, D y E y las CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6 son reguladores cruciales del ciclo celular [133]. A lo largo del proceso, los complejos CDK-ciclina que se forman son específicos de determinadas fases y existe selectividad entre la ciclina y la CDK que constituye cada complejo en cada momento [131]. Al igual que las ciclinas actúan como reguladores positivos, el papel de reguladores negativos les corresponde a los inhibidores de CDKs [131]. Estos engloban a la familia INK4, que inhibe selectivamente a los complejos ciclina D-(CDK4/6) que se forman en la fase G1, y la familia Cip/Kip, que actúa a lo largo de todo el ciclo inhibiendo la actividad de los complejos ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK1 [131, 133] (Fig. 1.11).

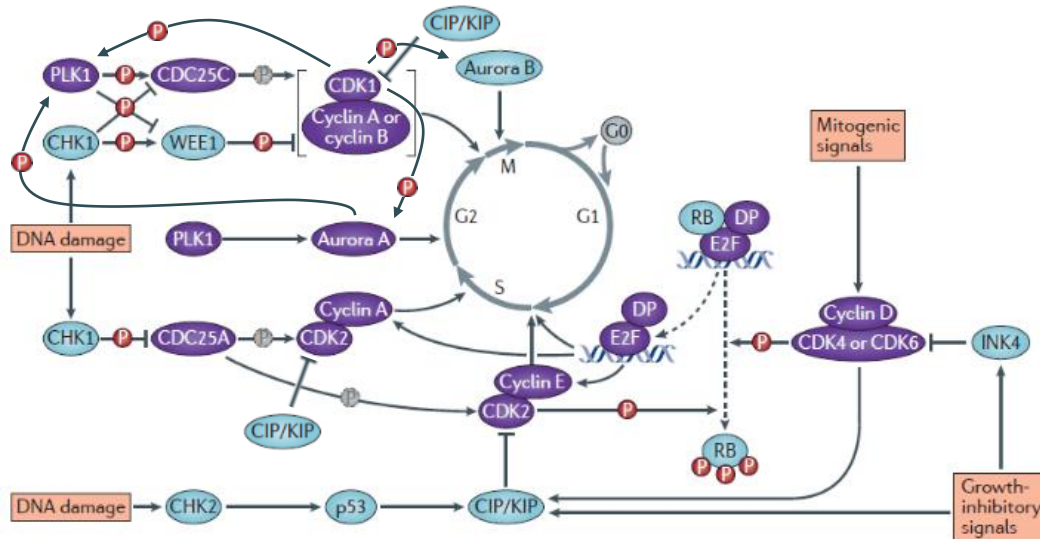


Figura 1.11 | Progresión del ciclo celular y reguladores principales. Modificado de [137] y ampliado con [133].

Señales de crecimiento como los mitógenos provocan la entrada de las células quiescentes al ciclo celular, haciendo que se induzca la expresión de ciclinas de tipo D que se unen y activan CDK4 y CDK6, lo que permite la progresión a lo largo de la fase G1 [131, 133]. Estos complejos activos se acumulan durante esta fase y fosforilan e inactivan a proteínas de la familia del retinoblastoma [133]. Una de ellas, pRb, regula negativamente la transición de la fase G1 a la S cuando se encuentra en un estado no fosforilado porque bloquea la transcripción dependiente del factor E2F [133]. No obstante, su fosforilación permite que los factores de transcripción E2F activen genes necesarios para la transición G1/S, como la DNA polimerasa α y las ciclinas E y A [133]. La actividad CDK aumenta al formarse complejos entre ciclinas de tipo E y CDK2, que continúan hiperfosforilando a pRb, lo que genera un bucle de retroalimentación positiva que consigue su total inactivación y permite la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular [132, 133]. Gracias a este bucle, el complejo degradador de ciclinas APC/C específico de la fase G1 (APC/C^{Cdh1}) queda inactivado y se produce la acumulación de complejos activos ciclina E/A-CDK2, lo que permite superar la ventana de decisión para promocionar a la fase S, marcada por el comienzo de la replicación del DNA [132] (Fig. 1.11).

En esta fase, caracterizada por la acumulación y elevada actividad de los complejos ciclina A-CDK2, es fundamental que el DNA se duplique en el tiempo adecuado y que lo haga solamente una vez por ciclo; de lo contrario, el genoma podría verse dañado [131–133]. Además de ciclinas de tipo A, durante la fase S también se acumulan gradualmente ciclinas de tipo B, y estas se asocian a CDK1 [132]; sin embargo, esta quinasa se encuentra fosforilada e inactivada durante esta fase [132].

A lo largo de la fase G2 se acumulan complejos ciclina A/B-CDK1, lo que crea una ventana de decisión para la entrada en mitosis [132]. En esta fase del ciclo celular, la quinasa PLK1 regula la localización centrosomal de Aurora A, y esta, a su vez fosforila y activa a PLK1 [137]. Esto contribuye a la activación de CDK1, que se produce a distintos niveles, y una vez activa, esta quinasa fosforila de manera generalizada a más de un millar de sustratos, permitiendo la entrada en mitosis [132, 137]. Al mismo tiempo, CDK1 fosforila a PLK1, Aurora A y Aurora B, las cuales fosforilan a otros sustratos mitóticos, lo que favorece la inducción de una cascada de fosforilación que prepara a la célula para completar su división [132] (Fig. 1.11). En la profase, la CDK1 activa favorece la adopción de una morfología celular redondeada y la separación de los centrosomas, a la vez que los complejos ciclina B/CDK1 importados al núcleo provocan la condensación de los cromosomas, el desensamblaje nucleolar, la activación del complejo APC/C^{CDC20} y la permeabilización de la membrana nuclear [132]. Esto último inicia la prometáfase, en la que la ciclina A es ubiquitinada por el complejo APC/C^{CDC20} y posteriormente degradada por el proteasoma 26S, pero la actividad de CDK1 se mantiene elevada gracias a las ciclinas de tipo B [132]. Tras la alineación cromosómica en metafase, el complejo APC/C^{CDC20} desencadena una serie de eventos que conducen a la salida de la mitosis, incluidos la separación de las cromátidas hermanas, la elongación del huso para conseguirla y la formación del anillo contráctil de actina-miosina para llevar a cabo la citocinesis [132]. Igualmente, favorece la ubiquitinación y posterior eliminación de las ciclinas de tipo B [132]. Esto unido a la inactivación de CDK1 mediada por fosfatasas conduce a la inhibición total de la actividad de esta quinasa, haciendo que las células hijas resultantes ingresen de nuevo en la fase G1 [132].

1.4.1. Puntos de control del ciclo celular

Para que la progenie de una célula sea genéticamente idéntica a su progenitora, se debe evitar a toda costa la acumulación y propagación de errores genéticos a lo largo del ciclo celular [132]. Para ello, existen varios mecanismos dependientes de vías de señalización conservados evolutivamente que se reparten a lo largo del ciclo y se activan ante los siguientes escenarios: la detección de daño en el DNA durante la interfase, la pérdida de la integridad de las horquillas de replicación del DNA en la fase S o el ensamblaje incompleto del huso mitótico durante la fase M [132] (Fig. 1.12). Cuando los sensores de estos puntos de control se activan el ciclo celular se detiene temporalmente o se ralentiza, inhibiendo la actividad de las CDKs y del complejo APC/C con el objetivo de permitir la reparación del DNA o el correcto ensamblaje del huso [132, 137]. Si, por el contrario, el daño ocasionado en el DNA es irreparable, se promueve la salida del ciclo celular o la muerte de la célula [132].

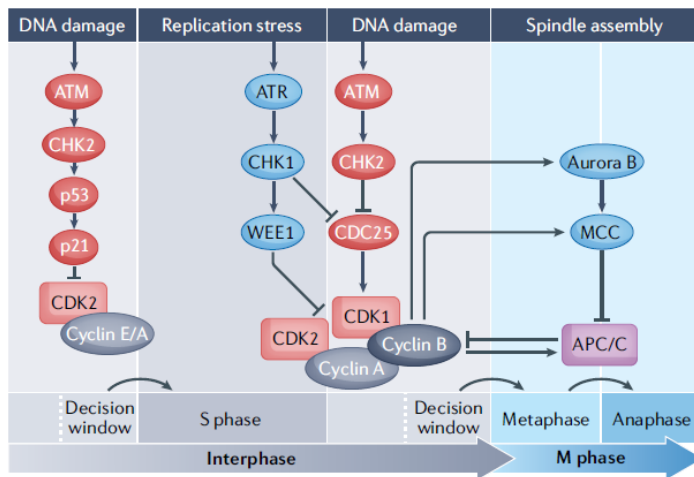


Figura 1.12 | Proteínas reguladoras clave de cada punto de control del ciclo celular [132].

Los puntos de control de daño en el DNA revisan la integridad del material genético previamente a su replicación y la mitosis [138]. En ambos escenarios se activan por fallos en la replicación y roturas de doble cadena del DNA y, si es necesario, inactivan los complejos ciclina E/A-CDK2 en la transición G1/S o ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK1 en la transición G2/M [132, 138]. Primero se desencadena una respuesta rápida y reversible que depende de las quinasas ATM y CHK2 para ralentizar la progresión del ciclo celular [132, 138]. Antes de la replicación se transcribe de forma lenta pero sostenida p21, que es activado por p53, y este, a su vez, por CHK2, lo que provoca la inhibición de los complejos ciclina E/A-CDK2 en la fase G1 y, en consecuencia, la promoción a la fase S [132, 138]. Por el contrario, ATM y p53 no son tan relevantes tras la replicación para frenar la progresión debido a la existencia de cierta redundancia con el punto de control de la replicación del DNA [132] (Fig. 1.12). Si las células consiguen reparar el daño, continúan hacia la fase S, pero si el daño es grave, la célula puede tomar diferentes caminos: sufrir apoptosis en la fase G1, salir temporalmente del ciclo (quiescencia) o hacerlo permanentemente (senescencia) [132]. Por su parte, una parada prolongada en las fases S y G2 provoca la salida del ciclo a un estado senescente o la inducción de apoptosis [132].

La integridad de la síntesis de DNA durante la fase S está supervisada por el punto de control de la replicación del DNA, una variante especializada del punto de control anterior [139, 140]. Se activa en respuesta a la lenta progresión o al estancamiento de la horquilla de replicación, el cual puede deberse, entre otros factores, a la escasez de nucleótidos libres, el aumento o la reducción de la frecuencia de iniciación de la replicación, o a regiones difíciles de replicar, como sitios frágiles o secuencias repetitivas [132, 139]. Ante la acumulación de DNA monocatenario, resultado del desacoplamiento de la polimerasa y la helicasa, se activa la quinasa ATR y esta, a su vez, activa a la quinasa CHK1, que fosforila y promueve la degradación de CDC25 a la vez que fosforila y activa a la quinasa Wee1 [132]. Todo ello impide la actividad de los complejos ciclina A/B-CDK1/2 con el objetivo de ganar tiempo para completar la replicación antes de entrar en mitosis [132] (Fig. 1.12). Así, se consigue bloquear la activación de orígenes de replicación

tardíos, paralizar las horquillas de replicación activas y estabilizar las que se encuentran bloqueadas, de manera que se logra evitar el inicio de nuevas replications, limitar la tasa general de replicación y que las horquillas de replicación bloqueadas se recuperen y reanuden su actividad, consiguiendo así que todas las áreas del genoma se repliquen [132]. Con esta respuesta, la célula previene el daño en el DNA como consecuencia del estrés en la replicación y consigue que la replicación del DNA se complete antes de cambiar de fase, pero si la presencia de DNA monocaterio se alargara en el tiempo, se podría producir un colapso de la horquilla, lo que daría lugar a roturas de doble hebra y a la activación de los puntos de control de daño en el DNA para repararlas [132].

Ya en la fase mitótica, a la célula solo le queda supervisar la correcta repartición del material genético entre las células hijas y, para ello, es fundamental que los cromosomas estén alineados y biorientados, es decir, con las cromátidas unidas a ambos polos del huso en la placa metafásica [132, 138, 141]. Cuando existen cinetocoros no conectados o conectados erróneamente puede darse la situación de que algunos cromosomas no sean capturados o que dos cromátidas hermanas estén unidas al mismo polo del huso, lo que se traduce en una segregación cromosómica inadecuada, con ganancias o pérdidas cromosómicas en las células hijas [132]. Con el fin de evitar este problema, la mitosis se detiene gracias a la activación de un mecanismo de vigilancia, conocido como “punto de control del ensamblaje del huso” (SAC, por sus siglas en inglés) [132, 142]. La maquinaria de este mecanismo, que incluye entre sus componentes a Mps1, MAD1, MAD2, BUBR1, BUB1 y BUB3, es reclutada a los cinetocoros libres, donde cataliza la formación del complejo MCC, compuesto por BUBR1, BUB3, MAD2 y CDC20 [132, 143] (Figs. 1.13A y B). Dicho complejo actúa bloqueando el complejo APC/C^{CDC20} y, por tanto, la transición de metafase a anafase [132]. Solamente cuando todos los cinetocoros están unidos y los cromosomas correctamente alineados, el SAC se inactiva y el complejo MCC se desmonta, quedando libre CDC20 para activar a APC/C [132, 143] (Fig. 1.13C). Si el arresto mitótico es prolongado, las células pueden morir por apoptosis mediada por caspasas o sufrir un proceso conocido como “deslizamiento mitótico”, mediante el cual la célula elude el bloqueo sin realizar la segregación cromosómica e inicia un nuevo ciclo celular como una célula tetraploide, aunque puede terminar pereciendo [132].

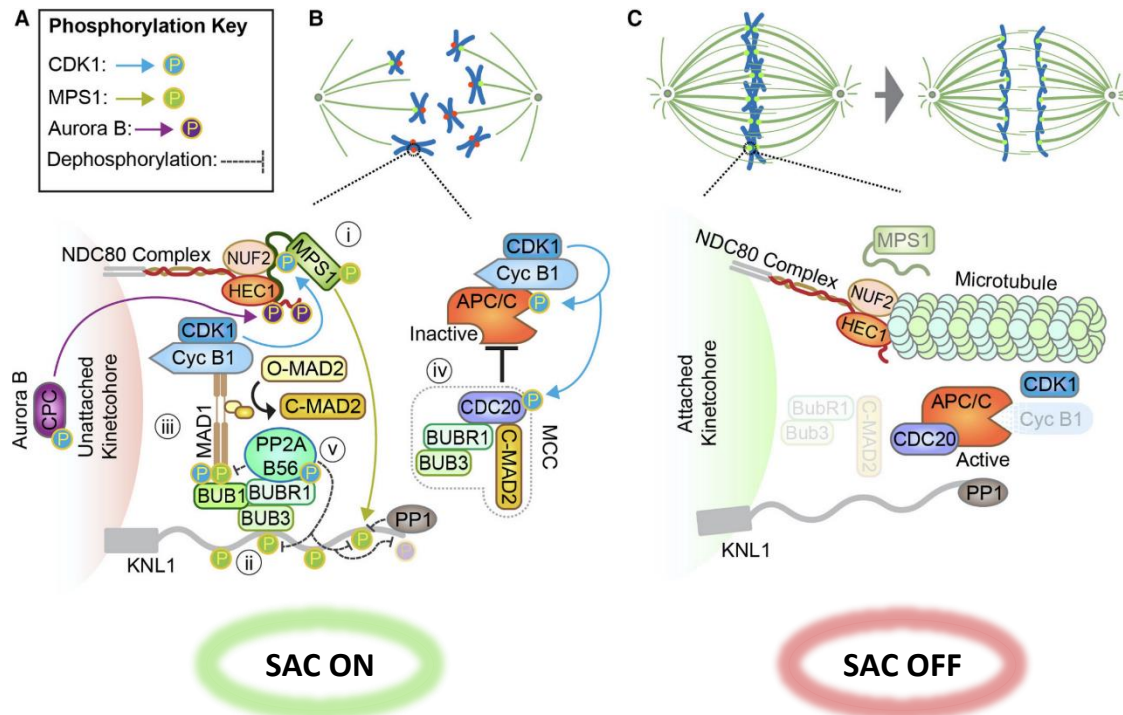


Figura 1.13 | Visión global del SAC. (A) Clave de fosforilación y defosforilación de algunos componentes clave de la maquinaria del SAC. (B [i-iv]) Mecanismo de activación del SAC. Brevemente, Aurora B y CDK1 fosforilan a Mps1, que es reclutado a los cinetocoros libres (i); Mps1 a su vez fosforila a KNL1, permitiendo el reclutamiento de BUBR1, BUB1 y BUB3 (ii); otras fosforilaciones de Mps1 sobre BUB1 favorecen el reclutamiento de MAD1, que en complejo con MAD2, cataliza la conversión de O-MAD2 en C-MAD2 (iii); BUBR1, BUB3, C-MAD2 y el co-activador de APC/C, CDC20, conforman el complejo MCC, el cual impide la activación de APC/C (iv). **(B [v] y C) Silenciamiento del SAC.** Si la unión cinetocoro-microtúbulo y la alineación cromosómica se resuelven correctamente, el SAC se inactiva (B [v]) y el complejo MCC se desarma, quedando libre CDC20 para formar el complejo activo APC/C^{CDC20}, el cual degrada ciclina B1 y securina para salir del arresto mitótico (C) [143].

1.4.2. Catástrofe mitótica

La maquinaria mitótica, incluido el SAC, puede verse afectada por señales exógenas (por ejemplo, xenobióticos) o endógenas (entre ellas, el estrés replicativo o mitótico), lo que podría desembocar en la inadecuada distribución de los cromosomas durante la mitosis, dando lugar a células aneuploides (llevan a cabo la citocinesis) o poliploides (contienen dos o más conjuntos de cromosomas al no ejecutar la citocinesis) [8, 144, 145]. Con el fin de eliminar estas células potencialmente tumorigénicas, las células eucariotas superiores han desarrollado diferentes estrategias, y una de ellas es la catástrofe mitótica [144].

Las primeras evidencias de este fenómeno celular datan de finales de la década de 1930 y principios de 1940, cuando Glücksmann y Spear expusieron células en fase de crecimiento exponencial a radiación y observaron que la mitosis se inhibía y una parte de las células moría, pero otra subpoblación celular era capaz de reanudar la proliferación con el paso del tiempo [146–148]. Posteriores estudios por microscopía revelaron que las células morían durante o después del primer ciclo mitótico posterior a la radiación y que presentaban configuraciones y

reordenamientos cromosómicos espaciales aberrantes [148, 149]. Por ello, este tipo de muerte fue bautizada como muerte mitótica o retardada, haciendo referencia a la división celular o a la aparición de células muertas tras la irradiación, respectivamente [148]. La expresión “catástrofe mitótica” fue acuñada por primera vez en 1986 para describir una cepa de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que carecía de la quinasa Wee1 y presentaba un fenotipo letal inducido por temperatura resultado de una mitosis aberrante, aunque no fue hasta 1995 cuando se utilizó para hacer referencia al mecanismo de muerte celular asociado con la mitosis retardada [150, 151].

Actualmente, la catástrofe mitótica se considera un mecanismo oncosupresor regulado que previene la proliferación y/o supervivencia de aquellas células que no pueden culminar la mitosis debido a daño severo en el DNA, defectos en la maquinaria mitótica y/o errores en los puntos de control mitóticos [8]. En los mamíferos, este mecanismo de defensa frente a la inestabilidad genómica puede encaminar a las células hacia dos destinos: la muerte en mitosis o la salida de ella, mediante deslizamiento mitótico [144, 152, 153]. A su vez, aquellas células que escapan del bloqueo mitótico mediante el deslizamiento mitótico pueden tener diferentes desenlaces: la muerte, la entrada en un estado de senescencia y/o la entrada a un estado de poliploidía debido al inicio de un nuevo ciclo de división (endorreduplicación) y a no realizarse la citoquinesis [148, 152, 153] (Fig. 1.14).

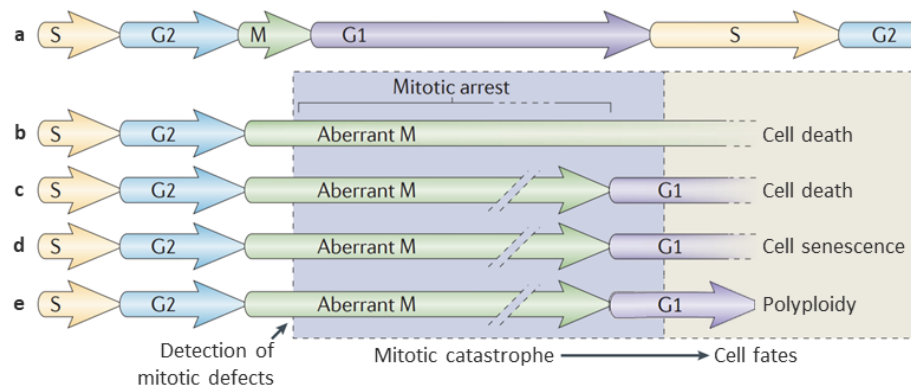


Figura 1.14 | Definición y posibles destinos finales tras la catástrofe mitótica. (a) Progresión habitual del ciclo celular. **(b)** Muerte en mitosis durante el arresto mitótico. **(c-e)** Muerte en la fase G1 (c), entrada en un estado de senescencia (d) e inducción de poliploidía (e) tras el deslizamiento mitótico. Modificado de [144] y ampliado con [154].

Morfológicamente, la catástrofe mitótica se caracteriza por la presencia de alteraciones nucleares singulares, que incluyen la macro-, multi- y micronucleación [8]. La macronucleación se debe a una segregación cromosómica defectuosa y las células gigantes multinucleadas derivan de grupos de cromosomas no condensados y erróneamente segregados como consecuencia de una mitosis multipolar y una citoquinesis malograda [8, 153]. Por su parte, las células micronucleadas se originan durante la anafase a partir de cromosomas rezagados o fragmentos cromosómicos, los

cuales son excluidos de los núcleos de las células hijas durante la telofase, dando lugar a un micronúcleo aislado del núcleo principal [142]. Por otra parte, los aspectos celulares y bioquímicos más relevantes de este evento celular son el arresto mitótico en la fase G2/M, resultado de la presencia de elevados niveles de ciclina B1, y la acumulación del marcador bioquímico de daño en el DNA γ H2AX fosforilado en Ser139 [150]. Asimismo, la red mitocondrial también se encuentra alterada en este estado, pues la membrana mitocondrial externa está mínimamente permeabilizada y, en estas condiciones, solamente una pequeña porción de citocromo c es liberado [150]. Esto hace que las caspasas no se activen a un nivel suficiente para inducir la muerte de la célula, pero sí para activar DNasas y favorecer la inestabilidad genómica [150]. No obstante, todavía quedan por esclarecer numerosos aspectos de este proceso. Uno de ellos son los mecanismos moleculares concretos que detectan las alteraciones mitóticas y las cascadas de señalización que promueven la catástrofe mitótica [8, 150]. Se asume que la catástrofe mitótica es desencadenada por daño subletal en el DNA que termina activando al SAC, impidiendo la transición metafase-anafase, y va acompañada de la estabilización en el tiempo de la ciclina B1 [150]. Igualmente, la inhibición o cambios en la expresión de las proteínas que componen el complejo CPC, coordinador del movimiento de los cromosomas y los microtúbulos durante la mitosis e intermediario en la activación de SAC, también conduce a la catástrofe mitótica [150, 155]. Además, otras proteínas como p53 y la caspasa-2 podrían ser relevantes en la regulación de este proceso [150].

Análogamente, los mecanismos que deciden el destino celular tras la catástrofe mitótica tampoco han sido elucidados hasta el momento [152]. Un intento de resolver este misterio se basa en un modelo, conocido como **“modelo de redes competitivas”** (Fig. 1.15), en el que, la acumulación de señales mortales por un lado y la duración de la mitosis por otro, trabajan en direcciones opuestas e independientes [156]. Así, la primera empuja a favor de la muerte celular, mientras que en la segunda se produce la degradación paulatina y constante de la ciclina B1 incluso si el SAC permanece activado, provocando el deslizamiento mitótico [156]. Por tanto, el destino celular está sujeto a cuál de los dos umbrales es sobrepasado primero [156]. Si las señales mortales se acumulan velozmente y son suficientemente fuertes para inducir muerte antes de que el complejo ciclina B1-CDK colapse, las células perecerán durante la mitosis [156] (Fig. 1.15A). En contraposición, ante la caída de los niveles de ciclina B1 y la actividad de CDK1 por debajo del nivel mínimo para mantener el arresto mitótico antes de alcanzar el umbral de muerte, las células sufrirán deslizamiento mitótico al abandonar la mitosis y alcanzar una nueva fase G1 en estado tetraploide [156] (Fig. 1.15B).

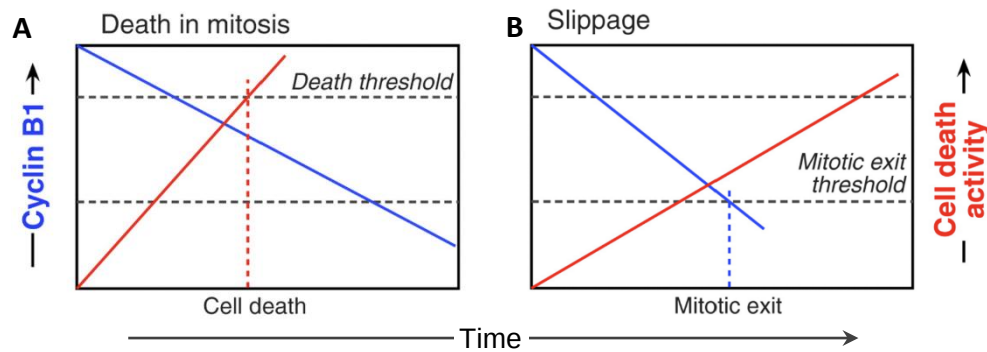


Figura 1.15 | Modelo de redes competitivas propuesto para explicar el destino celular tras el arresto mitótico. (A) Si se supera primero el umbral de muerte durante la parada mitótica, las células mueren en mitosis **(B)** Si el umbral de la salida mitótica es el primero en rebasarse, las células sufren deslizamiento mitótico. Modificado de [157, 158].

La muerte durante la mitosis puede ser por apoptosis, de tipo necrótico o muerte dependiente de autofagia [152]. En esta decisión, p53 juega un papel crucial activando la caspasa-2, lo que generalmente desencadena una variante de la vía apoptótica mitocondrial canónica regulada por las proteínas de la familia Bcl-2 [8, 150]. En cambio, la ausencia de p53 favorece la muerte de tipo necrótico, aunque se desconoce el mecanismo exacto [150, 152]. Además, se ha propuesto que las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la duración de la catástrofe mitótica y que sus miembros anti-apoptóticos también pueden intervenir estimulando el proceso autofágico, conectando por tanto las vías apoptótica y autofágica [150, 152]. Por otro lado, algunas células consiguen salir con éxito de la parada mitótica, ya sea eludiendo la transición metafase-anafase y la citoquinesis (deslizamiento mitótico) o continuando la mitosis aberrante, aunque es frecuente que esta división no culmine y no se produzca la citoquinesis [144, 159]. Por tanto, en ambos escenarios se generan células tetraploides, pero si la mitosis aberrante se completa, se obtienen células aneuploides con potencial tumorigénico [144]. Por lo general, las células aneuploides mueren o detienen su crecimiento, y solo en raras ocasiones, inician una nueva mitosis y son susceptibles de sucumbir durante esta etapa, salir de ella mediante deslizamiento mitótico o realizar nuevas rondas de mitosis aberrantes [144]. En cuanto a las células tetraploides, muchas de ellas mueren o entran en un estado de senescencia, mientras que otras entran de nuevo en división, lo que puede acabar desembocando en aneuploidía, nuevas divisiones aberrantes, la muerte de las células en mitosis, el deslizamiento mitótico y la generación de células con una dotación cromosómica de $8n$ [144].

1.4.3. Senescencia celular

A comienzos de los años 60, Hayflick y Moorhead observaron que las células primarias diploides humanas detienen su crecimiento de forma irreversible en cultivo tras un número limitado de divisiones, quedando las células en un estado conocido como senescencia replicativa y que ellos asociaron con el envejecimiento [160, 161]. El interés que ha despertado la senescencia

desde entonces ha alentado a los investigadores a ahondar en este campo, permitiendo esbozar los entresijos de este fenómeno celular y su papel en el organismo, pues todavía quedan importantes aspectos por dilucidar [162]. Actualmente, se sabe que estímulos de naturaleza variada pueden dar lugar a diferentes tipos de senescencia [163] (Tabla 1.3 y Fig. 1.16i).

Tabla 1.3 | Tipos de senescencia en función del estímulo inductor.

Tipo de senescencia	Estímulo inductor
Senescencia replicativa	Acortamiento de los telómeros ocasionada por un intenso periodo de proliferación en ausencia de actividad de la telomerasa endógena [164].
	Activación del locus <i>CDKN2A</i> con el envejecimiento [164].
Senescencia inducida por daño en el DNA	Daño irreparable en el DNA inducido por radiación o fármacos [163].
Senescencia inducida por oncogenes	Activación de oncogenes como <i>Ras</i> o <i>BRAF</i> [163].
	Inactivación de genes supresores de tumores como <i>PTEN</i> [163].
Senescencia derivada de estrés oxidativo	Subproductos oxidantes del metabolismo celular o agentes oxidantes externos [163].
Senescencia inducida por quimioterapia	Quimioterápicos [163].
Senescencia asociada a disfunción mitocondrial (MiDAS)	Disfunción mitocondrial [163].
Senescencia inducida epigenéticamente	Inhibición de la maquinaria epigenética (DNA metilasas, histona deacetilasas) [163].
Senescencia paracrina	SASP producidos por células senescentes primarias que alteran el microambiente [163, 164].

Independientemente de la señal instigadora, la senescencia se define como un mecanismo de respuesta al estrés adaptativo implicado en procesos fisiológicos y patológicos, y que puede tener consecuencias tanto beneficiosas como perjudiciales para la salud del organismo [160, 165]. Su papel fisiológico es especialmente relevante en el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis tisular, la remodelación y reparación tisular, la cicatrización de heridas y la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas [165, 166]. No obstante, la acumulación de células senescentes está relacionada con el envejecimiento y enfermedades asociadas a él, como las neurodegenerativas, la osteoartritis, la diabetes o el cáncer [167, 168]. De hecho, la senescencia se considera un potente mecanismo oncosupresor *in vivo* en diversas especies de vertebrados, incluidos los humanos, aunque en determinadas circunstancias podría favorecer la progresión tumoral [169, 170].

Los eventos y características que definen a las células senescentes dependen del tipo celular, el estímulo iniciador y el contexto fisiológico [166]. En general, las células senescentes detienen

su ciclo en la fase G1 de forma estable e irreversible y, por tanto, son incapaces de entrar en la fase S incluso en presencia de estímulos mitogénicos [165, 171]; sin embargo, se mantienen metabólicamente activas [165]. No obstante, su metabolismo está alterado debido, en parte, a la acumulación de mitocondrias disfuncionales [163]. Además, tienen regulados al alza varios mecanismos de supervivencia, entre ellos la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, lo que les confiere resistencia a la apoptosis a largo plazo [163, 166, 171]. Desde el punto de vista morfológico y estructural, las células senescentes adoptan una morfología aplanada, irregular y multinucleada y experimentan un aumento considerable de su tamaño, que suele ir acompañado de un aumento del volumen citoplasmático y nuclear, la presencia de vacuolas agrandadas, consecuencia del estrés en el retículo endoplásmico, y de alteraciones en la composición de la membrana plasmática [163, 165, 168]. Mientras que esto es habitual *in vitro*, *in vivo* las células conservan la morfología que les corresponde de acuerdo al tejido en el que se encuentran [164]. Además, las células senescentes incrementan su masa y actividad lisosomal, especialmente la cantidad de la β -galactosidasa lisosomal, dando lugar a la denominada actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal) [167]. Asimismo, sufren daño a nivel lipídico, proteico y en el DNA, activándose en este último escenario una respuesta persistente a daño en el DNA [160, 165]. La pérdida de la proteína estructural lámina B1 compromete su integridad nuclear y conlleva la pérdida de la condensación de la heterocromatina y la aparición de fragmentos de cromatina en el citoplasma que pueden ser secretados [163]. Los cambios epigenéticos también son habituales y la formación de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF), especialmente en la senescencia asociada a oncogenes, permitiría mantener reprimida la heterocromatina [160, 163, 164].

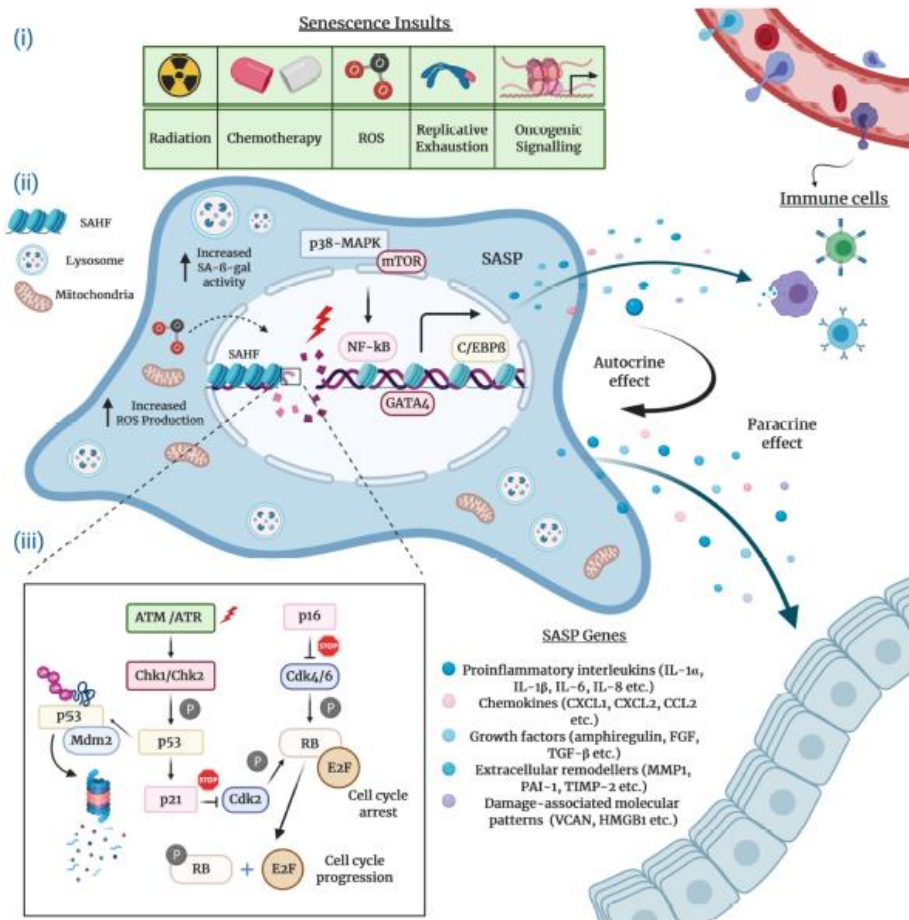


Figura 1.16 | Mecanismos y características moleculares de la senescencia celular. (i) Estímulos inductores de senescencia; **(ii)** características moleculares y vías que regulan la producción del SASP y la infiltración de células del sistema inmune; **(iii)** mecanismos reguladores de la detención del ciclo celular [160].

La red de eventos moleculares que culminan en la senescencia celular es muy compleja, pues los diferentes estímulos inductores desencadenan vías de señalización específicas [160, 164]. No obstante, la mayoría convergen en la activación de las vías supresoras de tumores p53/p21^{Waf1/Cip1} y/o p16^{INK4a}/pRb, principales reguladoras de la senescencia al permitir la entrada de las células en este estado y mantenerlo de forma permanente [160, 164, 165]. De hecho, se ha propuesto que el papel de p53 en senescencia es impulsar la transcripción de p21^{Waf1/Cip1}, que inhibe la actividad de CDK2 y, con ello, la hipofosforilación de pRb, impidiendo la progresión del ciclo celular en los momentos iniciales, pero una detención mantenida en el tiempo requiere de la activación del inhibidor de CDK4 y CDK6 p16^{INK4} y de la estabilización de p53 gracias a p14^{ARF} [168] (Fig. 1.16iii).

Una característica particular de las células senescentes es la adquisición de un complejo fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) que implica la secreción de numerosas citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento, DAMPs, metaloproteinasas de la matriz extracelular y otras moléculas que actúan como señales de senescencia dirigidas a

ellas mismas o a las células circundantes (efecto autocrino y paracrino, respectivamente) [160, 166, 172] (Fig. 1.16). No obstante, la composición y la potencia de los SASP varía en función del estímulo inductor, la duración de la senescencia, el microambiente y el tipo celular [165]. Por ejemplo, el fenotipo secretor asociado a MiDAS difiere del derivado del SASP canónico inducido por estrés genotóxico, pues factores comunes como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 son sustituidos en el secretoma asociado a MiDAS por otros factores como IL-10, TNF α y CCL27 [166, 173]. Este fenotipo secretor está regulado a múltiples niveles que incluyen la epigenética, la transcripción, la traducción, modificaciones post-traduccionales, la estabilidad del mRNA y la secreción [163, 168]. Su regulación recae sobre las vías de señalización p38 MAPK, cGAS/STING y DDR (respuesta a daño en el DNA), de las cuales, casi todas convergen en la activación de los factores de transcripción NK- κ B y C/EBP β , causantes del inicio y mantenimiento de este fenotipo [160, 168] (Fig. 1.16ii).

El efecto de este secretoma es pleiotrópico en algunos contextos, pues citoquinas como IL-1, IL-6 e IL-8 actúan de forma autocrina creando un bucle de retroalimentación positiva que refuerza la senescencia, mientras que otras moléculas tienen un efecto paracrino sobre las células vecinas, lo que permite la reparación y regeneración tisular o la supresión del potencial proliferativo de células potencialmente malignas, así como el reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo para eliminar células dañadas o pre-malignas [163, 165, 170]. Sin embargo, la acumulación de células senescentes y la composición e intensidad del perfil secretor pueden favorecer a la aparición de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la progresión tumoral [160]. De hecho, la parada del ciclo y los SASP generados por las células senescentes impiden la iniciación del tumor, pero en situaciones concretas estos factores pueden favorecer la progresión tumoral y proteger a las células malignas del ataque del sistema inmune [170].

Actualmente, existen dos estrategias centradas en la senescencia que podrían ser efectivas en la terapia antitumoral. Por un lado, los llamados agentes senomórficos o senostáticos, que incluyen a rapamicina, metformina y flavonoides de origen natural, buscan suprimir el fenotipo senescente, incluido el SASP [174]. Por otro, dasatinib, quercetina, diferentes miméticos BH3 como navitoclax y A-1155463, inhibidores de la chaperona Hsp90 e incluso aproximaciones como la inmunoterapia se engloban dentro de la terapia senolítica, que pretende acabar selectivamente con las células senescentes, y están siendo evaluados a nivel preclínico o clínico [160, 174, 175]. En este sentido, se está estudiando la inducción de senescencia en las células tumorales con agentes como palbociclib (inhibidor de CDK4 y CDK6) y la posterior eliminación de dichas células con terapias citotóxicas [170].

1.4.4. Fármacos antimitóticos

Pese a que cada tipo de tumor tiene un comportamiento único, una característica habitual de las células tumorales es su excesiva capacidad proliferativa, la cual se mantiene incluso ante señales inhibitorias del crecimiento, tales como la escasez de nutrientes o la falta de espacio [176, 177]. La desregulación del ciclo celular en estas células debido a mutaciones en los genes que controlan la progresión del ciclo es una posible causa de este crecimiento exorbitado [156, 178]. Concretamente, las alteraciones en la mitosis conducen a las células a un estado de inestabilidad genómica y cromosómica a base de mutaciones en el DNA y aberraciones cromosómicas, que son el germen para la progresión tumoral y la adquisición de un fenotipo agresivo [178, 179]. Si bien la inhibición de las fases iniciales del ciclo celular puede originar células viables quiescentes, la intervención sobre la mitosis ofrece más posibilidades de acabar con las células tumorales ya que, a pesar de su corta duración, la mitosis es una fase muy dinámica en la que las células son vulnerables a agresiones externas como fármacos quimioterapéuticos debido a la baja tasa de traducción proteica [156, 179]. Por ello, las denominadas terapias antimitóticas, dirigidas contra proteínas reguladoras de la mitosis, están emergiendo como un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento del cáncer.

La diana de los primeros fármacos antimitóticos fueron los microtúbulos, estructuras compuestas por heterodímeros de α - y β -tubulina que se polimerizan y despolimerizan con gran velocidad [178, 180]. Esta dinámica es fundamental para que el huso mitótico se forme adecuadamente y, por tanto, la segregación de las cromátidas hermanas se dé correctamente [181]; por contra, cualquier alteración de este equilibrio conlleva a errores durante la división celular que terminan provocando la muerte de las células [181]. Los agentes anti-microtúbulos clásicos son de origen natural o semisintéticos e interfieren en dicha dinámica desestabilizando los microtúbulos e inhibiendo su polimerización o estabilizando los microtúbulos ya existentes y favoreciendo su polimerización [156, 177, 180]. Dentro de los agentes desestabilizantes se encuadran los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina y vinflunina, entre otros), la colchicina y la eribulina, mientras que los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y las epotilonas son considerados agentes estabilizantes [181]. Pese a que la diana molecular de ambas familias es la β -tubulina, la superficie de interacción, la estructura química y los efectos de cada una sobre los microtúbulos son distintos [176, 177]. En cualquier caso, la interacción de estos fármacos con su diana interfiere en la formación de un huso mitótico funcional, haciendo que muchos cromosomas queden libres y su orientación no sea la correcta [176, 181]. Esta situación provoca la activación del SAC, que desemboca en la detención de la mitosis, lo que proporciona tiempo adicional a las células para enmendar los errores en la unión entre los microtúbulos y los cinetocoros [179]. En consecuencia, las células son más susceptibles a morir durante la mitosis, aunque también pueden

salir de esta parada mediante deslizamiento mitótico y perecer, iniciar un nuevo ciclo o entrar en un estado de senescencia [176, 179, 180], tal y como se ha señalado en los apartados 1.4.1 y 1.4.2.

Los alcaloides de la vinca, introducidos en la clínica en la década de 1960, y los taxanos, utilizados desde la década de 1990, son eficaces en el tratamiento de una amplia gama de tumores [181–183]. Los taxanos son fundamentales en la terapia frente a cánceres como los de mama, próstata, pulmón y ovario, y los alcaloides de la vinca se utilizan como monoterapia o combinados con quimioterápicos en linfomas, sarcomas, tumores pediátricos y cánceres de vejiga, mama y pulmón, entre otros [181]. Su éxito en la clínica no depende solo de la alteración de la mitosis porque las funciones de los microtúbulos se extienden a la interfase, donde participa en el tráfico, la señalización y la motilidad celulares [156]. Por tanto, los efectos de estos compuestos alcanzan también a células sanas y a células en un estado no proliferativo, lo que provoca importantes efectos secundarios como mielosupresión grave derivada de la incapacidad de las células de la médula ósea para proliferar, y neurotoxicidad al afectar al transporte axonal [178, 180, 184].

Ante la eficacia clínica de estos compuestos, los graves efectos adversos asociados y las resistencias desarrolladas, muchos esfuerzos se han dirigido en los últimos años al desarrollo y evaluación de nuevos agentes anti-microtúbulos y de moléculas dirigidas contra otras proteínas de la maquinaria mitótica, incluidas quinasas, proteínas motoras de los microtúbulos y complejos multi-proteína, con los que se busca potenciar la actividad antitumoral y minimizar las toxicidad y la aparición de resistencias [177, 180, 181, 185]. Entre las nuevas dianas se encuentran Mps1 (componente del SAC), las quinasas CDK1, PLK1 y Aurora A y B, el complejo APC/C y las quinesinas Eg5 y CENP-E, ya que la sobreexpresión de muchas de ellas ha sido detectada en varios tipos de cánceres [156, 181].

De entre todas ellas, las proteínas Aurora son vitales para el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas y, por tanto, de la integridad genómica [186, 187]. Se trata de una nueva y pequeña familia de serín/treonín quinasas, compuesta por tres isoformas en los mamíferos: Aurora A, Aurora B y Aurora C [186, 188] (Fig. 1.17). Fue descubierta en 1995 por Glover cuando examinaba al microscopio los defectos en el huso mitótico de mutantes de *D. melanogaster*, y debe su nombre a la semejanza de dichos defectos con el fenómeno de la aurora boreal [188–190]. Más tarde se describieron homólogos en otras especies, incluidas *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus* y la humana [186, 189]. Estas proteínas se componen de un dominio catalítico altamente conservado seguido por una pequeña cola C-terminal y antecedido una región N-terminal reguladora, algo menos conservada, con longitud y secuencia variables [186, 190–192]. También poseen etiquetas de degradación: una caja D al final del dominio catalítico o en la región C-terminal, común a todas ellas, para su degradación mediante ubiquitinación el proteasoma, y Aurora A y B también contienen un motivo KEN y una caja DAD/A en el extremo N-terminal implicadas en su proteólisis dependiente de APC/C [191–193]. Además, contienen un

bucle T catalítico compuesto de residuos de treonina (Thr288 en Aurora A, Thr232 en Aurora B y Thr195 en Aurora C) cuya autofosforilación conduce a la activación de estas quinasas, y su defosforilación por PP1 las inactiva [188]. Sin embargo, las diferencias entre sus dominios N-terminales les confiere funciones y localizaciones subcelulares distintas, así como capacidades de interacción específicas [186].

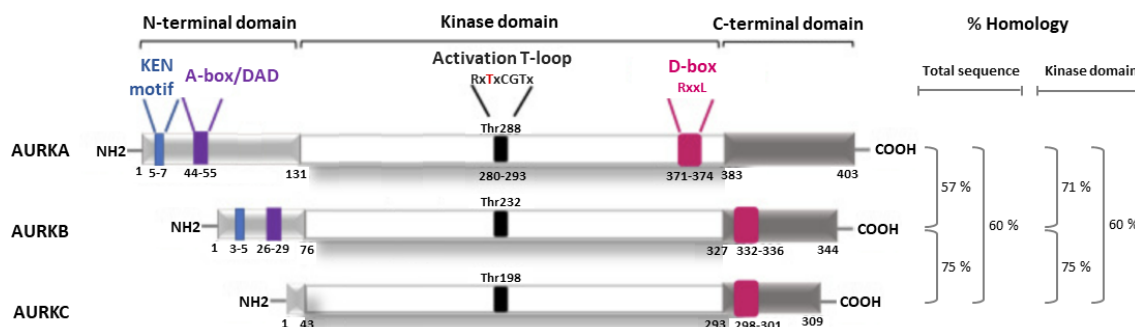


Figura 1.17 | Estructura y dominios de las isoformas de la familia de proteínas Aurora y porcentaje de homología en la secuencia total y el dominio quinasa entre las isoformas. Modificado de [193] y ampliado con [191].

Aurora A consta de 403 residuos de aminoácidos y su nivel de expresión y localización subcelular varía en función de la fase celular [186, 192]. Su nivel de expresión es ínfimo durante la fase G1, al final de la fase S comienza a acumularse alrededor de los centrosomas y es en la fase G2/M cuando alcanza su máximo nivel de expresión y se activa, localizándose principalmente en los centrosomas y en los microtúbulos que forman el huso mitótico [186, 192]. No obstante, la mayor parte se degrada en la transición metafase-anafase, y en el momento de la salida mitótica, su expresión está regulada principalmente por APC/C^{Cdh1} [192]. Su actuación supervisando el centrosoma y guiando el huso mitótico hacia los centrómeros hasta que se produce la segregación cromosómica es clave [186]. En concreto, controla la entrada en mitosis, la maduración, duplicación y separación de los centrosomas en los polos de la célula al inicio de la mitosis, la formación del huso mitótico, la unión de los centrómeros a esta estructura, la correcta alineación de los cromosomas en la placa metafásica, la salida de la mitosis y la citocinesis [186, 192]. Por otro lado, se ha descrito recientemente que Aurora A también se importa a las mitocondrias durante la interfase, donde regula la dinámica mitocondrial y la producción de energía [194].

Aurora B está conformada por 344 residuos y, análogamente a Aurora A, modifica su nivel de expresión y localización subcelular según la fase del ciclo [186, 192]. Al final de la fase S se localiza en la heterocromatina pericentromérica y alcanza su máximo en la fase G2/M, donde actúa [192]. Esta proteína tiene preferencia por los cinetocoros, ya que forma parte del complejo CPC constituyendo el dominio catalítico junto al dominio C-terminal de INCENP, mientras que el dominio regulador lo componen la región N-terminal de INCENP, survivina y borealina [156]

(Fig. 1.18A). Esto le permitiría actuar como un sensor de la tensión existente en las conexiones cinetocoro-microtúbulos durante la metafase, facilitando la adecuada biorientación de los comosomas y regulando las interacciones entre los cromosomas y el huso mitótico, la cohesión de las cromátidas hermanas y la señalización del SAC, con el fin de conseguir que los cromosomas se segreguen correctamente [156] (Fig. 1.18B). Ya en la anafase, se reubica en la placa ecuatorial, donde controla la citoquinesis [156] (Fig. 1.18C).

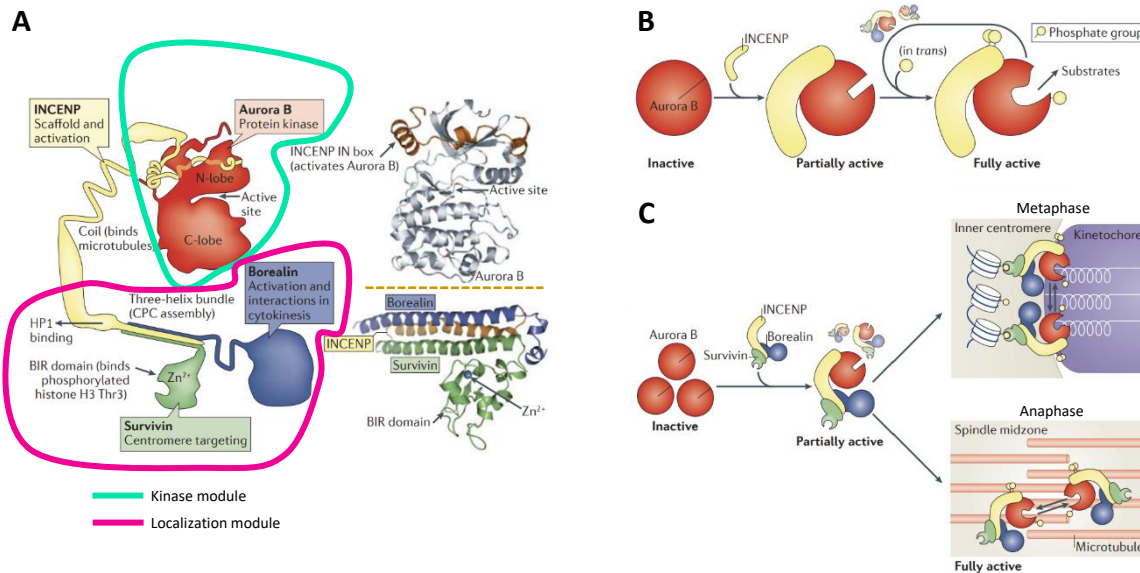


Figura 1.18 | Estructura del complejo CPC y activación de Aurora B. (A) Estructura, dominios que constituyen el CPC y funciones de cada componente. Estructura cristalina de Aurora B completa en complejo con la región C-terminal de INCENP (residuos 790-894) (arriba a la derecha) y del haz de tres hélices INCENP (residuos 1-58), borealina (residuos 10-109) y survivina completa (abajo a la derecha). **(B y C) Activación de Aurora B.** La activación de Aurora B se produce cuando esta se une al extremo carboxilo terminal de INCENP y se produce la fosforilación de ambas en *trans* a través de un circuito de retroalimentación (B). No obstante, la activación de Aurora B *in vivo* depende de la localización del CPC, ya que solo cuando este se ubica en las histonas del centrómero interno (metafase) y en los microtúbulos en la placa ecuatorial (anafase), gracias a su módulo de localización, se produce la autofosforilación en *trans* que activa completamente a Aurora B (C). Modificado de [155].

Por último, la isoforma menos estudiada, Aurora C, se compone de 309 residuos y, estructuralmente, es más similar a Aurora B que a Aurora A [186, 189]. De hecho, puede considerarse una “proteína cromosómica pasajera” cuya función se solapa con la de Aurora B en la mitosis, ya que interviene en la correcta alineación y segregación de los cromosomas, la unión adecuada del huso a los cinetocoros y la citoquinesis [192, 195]. Sin embargo, su expresión se ha reportado en la tiroides, los testículos, la placenta y, sobre todo, en las células germinales, donde su papel es crucial para la gametogénesis [186, 196, 197].

La desregulación de estas proteínas, ya sea por sobreexpresión, amplificaciones, translocaciones o deleciones, es frecuente en muchos tipos de cáncer [195]. Concretamente, la sobreexpresión y actividad desregulada de Aurora A y B se asocia con inestabilidad genómica y

poliploidía/aneuploidía, aspectos que promueven la tumorigénesis y correlacionan con un pronóstico desfavorable [186, 187, 196, 198]; sin embargo, se necesita profundizar en el estudio de Aurora C para terminar de comprender su papel en el cáncer [189]. Por ello, la inhibición de Aurora quinasas mediante pequeñas moléculas es una estrategia que puede ser eficaz en la batalla contra el cáncer [198]. En la última década se han descubierto al menos una quincena de inhibidores de estas quinasas, todos ellos dirigidos contra el sitio de unión a ATP, con el que compiten [156, 187]. La elevada similitud entre el bolsillo de unión a ATP de la subunidad catalítica de Aurora A y Aurora B/C (la diferencia entre ellas es de solo tres residuos), ha contribuido a que muchos de los inhibidores desarrollados estén dirigidos contra todos los miembros de la familia (pan-inhibidores como tozasertib, CYC-116 o AMG 900, entre otros), aunque más recientemente se han desarrollado inhibidores selectivos de Aurora A (como alisertib y ENMD-2076) y B (por ejemplo, barasertib y BI 811283) [156, 188, 198]. No obstante, algunos también actúan sobre otras quinasas no mitóticas [156].

En general, los ensayos preclínicos otorgan a los inhibidores de esta familia cierta acción antitumoral, ya que bloquean la proliferación, migración y capacidad invasora de líneas celulares tumorales y suprimen el crecimiento y la progresión tumoral en modelos animales [184]. Por ello, muchos han avanzado hasta la fase clínica, pero el camino de algunos de ellos terminó en esta etapa debido a los desalentadores resultados obtenidos, ya sea por la falta de actividad, elevada toxicidad o errores en la estrategia terapéutica elegida [156, 184]. Por tanto, las próximas investigaciones referidas a estos fármacos están dirigidas a optimizar su estructura química, aumentar su especificidad, potenciar su eficacia, reducir su toxicidad y utilizarlos en combinación con tratamientos convencionales o novedosos [192].

Uno de los inhibidores más destacables es alisertib (MLN8237). Se trata del primer inhibidor oral de segunda generación altamente específico de Aurora A ($IC_{50} = 1,2$ nM), que muestra una afinidad por Aurora B 330 veces inferior ($IC_{50} = 396,5$ nM) [189, 192]. Este compuesto es el resultado de la modificación de la estructura química de MLN8054, un inhibidor oral más específico de Aurora A ($IC_{50} = 4$ nM) que de Aurora B ($IC_{50} = 172$ nM) que consiguió frenar el crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados, pero que en las primeras fases de los ensayos clínicos se abandonó a causa de los graves efectos secundarios ocasionados a nivel del sistema nervioso central debidos a la similitud de MLN8054 con las benzodiazepinas y su afinidad por el receptor de GABA $\alpha 1$ [187, 189, 190, 195]. La inhibición de Aurora A por la acción de alisertib provoca alteraciones relevantes, desde la detención del ciclo celular derivada de la formación de un huso mitótico aberrante y otros defectos en la mitosis, hasta la inducción de autofagia, senescencia, aneuploidía, poliploidía, catástrofe mitótica e, incluso, la muerte celular [199–201]. A nivel preclínico, muestra actividad antitumoral frente a modelos *in vitro* e *in vivo* de un amplio abanico de tumores, incluyendo los cánceres de próstata, ovario, colon, pulmón, neuroblastoma,

glioblastoma, linfoma, AML, ALL y mieloma múltiple [197, 201]. Además, es activo frente a tumores pediátricos, siendo la ALL y el rabdomiosarcoma los tumores en los que más y menos eficacia demuestra, respectivamente [189]. Como consecuencia de estos resultados, este compuesto se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I y II en pacientes con tumores sólidos y sanguíneos y en pacientes pediátricos con tumores sólidos avanzados [197]. Sin embargo, los resultados desprendidos de estos ensayos han sido más bien modestos y en algunos de ellos los efectos secundarios encontrados son intolerables [156, 202]. Además, un estudio de fase III llevado a cabo en pacientes con linfoma periférico de células T (PTCL) reveló que alisertib no superaba en eficiencia a otras terapias convencionales, aunque podría resultar beneficioso para la supervivencia de pacientes con otras neoplasias hematológicas avanzadas [202]. Por lo tanto, alisertib continúa siendo testado en cánceres hematológicos y sólidos, en solitario o combinado con otros regímenes [156, 202].

Otro fármaco destacado de este grupo es barasertib (AZD1152), un inhibidor muy potente y selectivo de Aurora B ($K_i = 1 \text{ nM}$) en comparación con Aurora A ($K_i = 1,4 \text{ }\mu\text{M}$), pero que también inhibe a otras 50 quinasas, y que surgió de la optimización de otro inhibidor de Aurora B, ZM447439 [196, 203]. Concebido como un pro-fármaco incapaz de atravesar las membranas celulares, tras su administración *in vivo* se convierte rápidamente en su forma activa, barasertib-hQPA [197, 204]. En las células tumorales *in vitro* provoca un alineamiento cromosómico defectuoso y bloquea la citoquinesis, permitiendo la endoreduplicación y dando lugar a células gigantes multinucleadas con una dotación cromosómica igual o superior a $4n$ (poliploides) que pueden entrar en senescencia y/o perecer [156, 204, 205]. Igualmente, causó la generación de células tumorales gigantes con múltiples núcleos en modelos tumorales *in vivo*, lo que se tradujo en la inhibición del crecimiento tumoral en función de la dosis [206]. Al igual que alisertib, barasertib ha llegado a la fase de ensayos clínicos, donde su administración como agente único o combinado con otros agentes ha sido y está siendo evaluada en la actualidad en diversos tipos de tumores, sobre todo hematopoyéticos, en los que ha demostrado ser más eficaz [156, 196]. Pese a todo, varios estudios informan de una respuesta del 19-25 % en pacientes de AML avanzada tratados únicamente con barasertib, pero su combinación con citarabina a dosis bajas de (LDAC) en pacientes de AML de avanzada edad incrementaba la tasa de respuesta general hasta el 45 % [197]. Por el contrario, la respuesta en pacientes de DBCL y tumores sólidos fue limitada [156, 196]. Sin embargo, el cambio en la vía de administración, de intravenosa a la encapsulación en nanopartículas, mejoró la actividad antitumoral como agente único en pacientes de AML [196, 207].

1.5. Mieloma múltiple: una enfermedad desafiante

El mieloma múltiple es una enfermedad compleja y heterogénea que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células plasmáticas clonales que se acumulan principalmente en la médula ósea, pero que también pueden encontrarse en el torrente sanguíneo y, en consecuencia, llegar a otros órganos y tejidos blandos, especialmente en los estadios avanzados de la enfermedad [208–210]. Estas células aberrantes suelen secretar una inmunoglobulina monoclonal, conocida como proteína M, que puede encontrarse en la sangre y/o en la orina, y su acumulación puede conllevar una disfunción orgánica y la aparición de los primeros síntomas [208, 211]. No obstante, entre un 15 % y un 20 % de los pacientes secretan cadenas ligeras monoclonales libres, lo que se asocia con un peor pronóstico, y un 3 % de los casos se corresponden con un fenotipo no secretor [209].

1.5.1. Orígenes ancestrales, primeros casos documentados y observación en otras especies animales

El hallazgo de diversos restos esqueléticos con un patrón específico de lesiones óseas compatibles con el mieloma múltiple en distintas zonas del planeta sugiere que esta enfermedad ha acompañado a la especie humana durante milenios [212]. Los restos más antiguos procederían de la América precolombina y del Alto Egipto y datarían del 3300 a. C. al 500 a. C. [212]; otros más recientes pertenecerían a indios americanos y su datación variaría del año 200 al 1300 d. C. [212]; y por su parte, en Europa se habrían encontrado restos de la Edad de Bronce en España, de los años 1400 al 1800 en el sur de Alemania, de la época medieval en Gran Bretaña y del 1000 al 1400 en Islandia [212, 213].

El primer caso bien documentado del que se tiene constancia fue el de Sarah Newbury, publicado en 1844 por Samuel Solly [212]. En aquella ocasión, la autopsia de la paciente reveló la existencia de una sustancia roja que había reemplazado la estructura esponjosa de diferentes huesos, incluidos el esternón y el fémur [214] (Fig. 1.19). Otro caso de la época que todavía se conoce mejor es el de Thomas Alexander McBean, en cuya autopsia también se detectó la presencia de una sustancia roja de aspecto oleoso en el esternón y las costillas [212, 215]. Antes de su muerte, el Dr. MacIntyre analizó su orina y determinó que contenía una elevada cantidad de “materia animal” que se asoció con la albúmina [216]. El químico Henry Bence Jones concluyó que la proteína era deutóxido hidratado de albúmina y, aunque él no le otorgó un nombre específico, años más tarde Fleischer la bautizó como “proteína de Bence Jones” [216]. Además, Jones fue el primero en relacionar esta proteína con el diagnóstico del mieloma al señalar la importancia de su detección en la orina de pacientes que padecen ablandamiento de huesos (afección conocida como *mollities ossium*), lo que le convertiría en la primera persona en desarrollar una prueba bioquímica para la detección del cáncer (la detección de proteinuria en el

mieloma múltiple), adelantándose más de un siglo al uso del antígeno carcinoembrionario y de la α -fetoproteína como biomarcadores tumorales específicos [216–218].

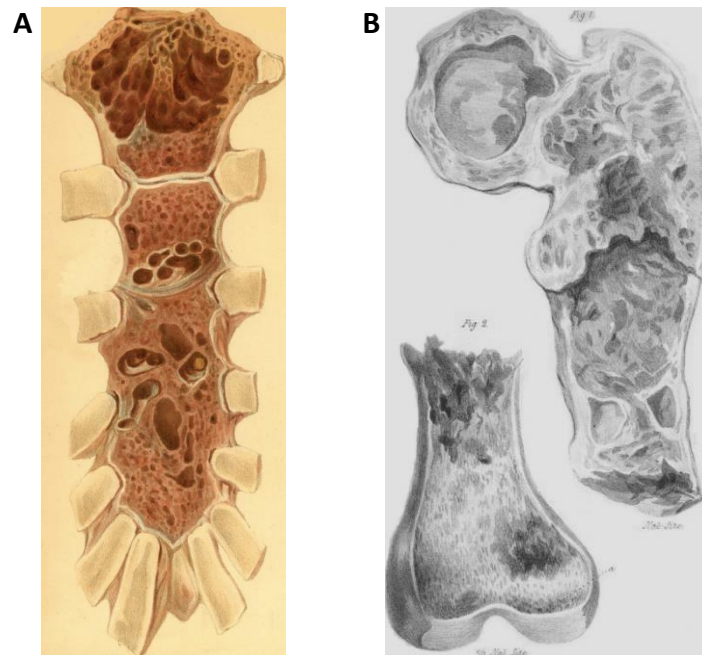


Figura 1.19 | Ilustración de la destrucción ósea y el reemplazo de la porción esponjosa por una sustancia roja en el esternón (A) y el fémur (B) de Sarah Newbury, realizada tras la autopsia [214].

La caracterización del mieloma múltiple fue progresando con el paso de los años. En 1922 Bayne-Jones y Wilson distinguieron dos grupos de proteínas de Bence Jones (I y II) que, aunque similares, no eran idénticas [219]. De hecho, Putnam al inicio de la década de 1950 demostró que las proteínas de Bence Jones de cada paciente eran bioquímicamente únicas [216]. Por su parte, Korngold y Lipari probaron en 1956 que los antisueros de las proteínas de Bence Jones reaccionaban con las proteínas de mieloma, estableciendo así una relación antigénica entre las proteínas de Bence Jones y las proteínas séricas del mieloma múltiple [216, 219]. Este descubrimiento implicó que, más adelante, los dos principales grupos antigénicos de la proteína de Bence Jones se denominaran con las letras griegas κ (kappa) y λ (lambda) en su honor [216]. Seis años más tarde, Edelman y Gally demostraron que las cadenas ligeras obtenidas a partir de una IgG sérica de mieloma y la proteína de Bence Jones presente en la orina del mismo paciente eran idénticas [216]. Unos años después, Hilschmann y Craig en 1965 y Titani y sus colegas en 1966 confirmaron esta relación y establecieron que cada cadena ligera se dividía en dos regiones, una variable (V) y una constante (C), un descubrimiento que explica la heterogeneidad de las gammaglobulinas normales y la diversidad y especificidad de los anticuerpos [216]. Por otro lado, von Waldeyer-Hartz fue el primero en utilizar el término “célula plasmática” en 1875 cuando, probablemente, lo que estuviera observando fueran mastocitos tisulares en lugar de células plasmáticas [216]. No obstante, la descripción de estas células la realizó Ramón y Cajal quince

años después al estudiar condilomas sífilíticos (Fig. 1.20), y en 1895 Marschalkó detalló las características de las células plasmáticas [216]. Posteriormente, en 1900 Wright postuló que el mieloma múltiple estaba originado y constituido por células plasmáticas [216].

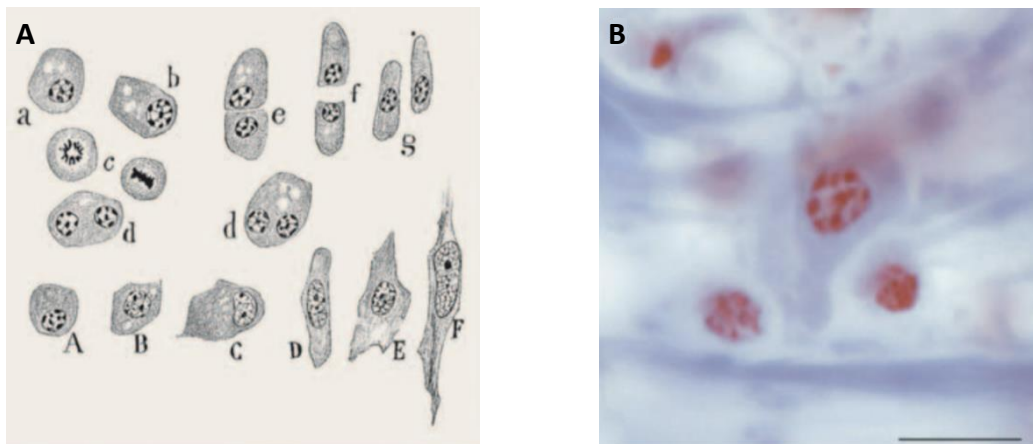


Figura 1.20 | Primera descripción de la morfología y el desarrollo de las células plasmáticas. (A) Dibujos originales realizados por Santiago Ramón y Cajal relativos a la morfología y el desarrollo de las células plasmáticas. (B) Fotografía de células plasmáticas típicas en el tejido conectivo tomada de una de las preparaciones tumorales del científico [220].

Por otro lado, dada la dinamicidad de la naturaleza, cabe esperar que el mieloma múltiple no sea una enfermedad restringida únicamente a los seres humanos, sino que se encuentre diseminada en el reino animal. En este sentido, diversos estudios han reportado casos en distintas especies, incluidos perros, caballos, cerdos y felinos, pero, en cualquier caso, parece un desorden poco común en el mundo animal [221–238].

A lo largo de la historia, esta neoplasia ha recibido múltiples calificativos. En un principio, el descubrimiento de esta proteína hizo que la enfermedad se conociera como “*mollities ossium* con proteinuria de Bence Jones”, y no fue hasta 1873 cuando von Rustizky acuñó por primera vez el término “mieloma múltiple” para referirse a los ocho tumores de médula ósea que encontró separados en un paciente durante la autopsia [216]. No obstante, esta enfermedad ha recibido diferentes nombres en función de la época e incluso del territorio. Ejemplo de ello es que en Rusia y las regiones de influencia soviética se conoció como “síndrome de Rustizky” durante buena parte del siglo XX [216]. En Estados Unidos y Europa occidental fue denominada “enfermedad de Kahler” a raíz de una descripción de la enfermedad por parte de Otto Kahler en 1889 [216]. Wright descubrió en 1900 que la enfermedad estaba causada por células plasmáticas, por lo que propuso denominarla “mieloma de células plasmáticas” [216]. Finalmente, en Italia se popularizó como “enfermedad de Kahler-Bozzolo” durante la primera parte del siglo XX como consecuencia de la descripción de un caso de la enfermedad de Kahler por parte del italiano Camillo Bozzolo [216].

1.5.2. Prevalencia y etiología

El mieloma múltiple es la segunda neoplasia hematológica maligna más común en los países occidentales, solo superada por el NHL [239, 240]. Algunos factores como la edad, el sexo o la etnia influyen en la incidencia y mortalidad de la enfermedad [240, 241]. De hecho, los datos estadísticos indican que se suele diagnosticar entre los 65 y 74 años, siendo más frecuente entre la población envejecida y extremadamente raro en los menores de 35 años [241]. Además, el mayor número de muertes se produce en pacientes de 75 a 84 años y la incidencia y la mortalidad son más elevadas en los hombres que en las mujeres [241]. Curiosamente, la población negra es la más afectada por este desorden, mientras que la asiática y la población de las islas del Pacífico presentan la incidencia y la tasa de mortalidad más baja [241].

A nivel mundial, en el año 2020 supuso el 13,8 % de los nuevos diagnósticos de cánceres hematológicos y el 16,4 % de las muertes causadas por este tipo de tumores, pero solamente representó el 0,9 % de todos los nuevos casos de cáncer diagnosticados y el 1,2 % de las defunciones debidas al cáncer [240]. Para el año 2023 se estima el diagnóstico de 35730 nuevos casos de mieloma múltiple y un total de 12590 fallecimientos en Estados Unidos, mientras que en España se estiman 3082 nuevos diagnósticos de un total de 279260 nuevos casos de cáncer (excepto cáncer de piel no melanoma) [242, 243].

En Estados Unidos, prácticamente la totalidad de los casos se diagnostican cuando la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado y solo el 4 % de los casos son detectados cuando el tumor se encuentra localizado en el sitio primario [241]. Esto influye en la tasa de supervivencia relativa a 5 años, puesto que esta es mayor en los pacientes diagnosticados en una fase temprana [241]. A nivel general, esta tasa fue del 55,87 % en 2019, 2,2 veces superior a la observada en 1975 [241]. Este incremento de la supervivencia de los pacientes ha contribuido a que la mortalidad haya disminuido en los últimos años a pesar de que la incidencia haya continuado en auge hasta el año 2016 [241]. Esta tendencia ascendente de la incidencia también se ha observado a nivel mundial, con un aumento del 126 % entre los años 1990 y 2016 como consecuencia del crecimiento y envejecimiento de la población y del incremento en las tasas de incidencia específicas por edad [244].

Desafortunadamente, actualmente todavía se desconoce la etiología de esta neoplasia, aunque son numerosos los factores de riesgo que se han relacionado con ella, tanto ambientales como genéticos [209]. Además de los indicados anteriormente, otros factores de riesgo aceptados son el estatus socioeconómico, la historia familiar, la obesidad, la diabetes tipo II, la exposición a pesticidas, radiación o disolventes orgánicos como el diclorometano y padecer una enfermedad precursora, como MGUS (gammapatía monoclonal de significado incierto), SMM (mieloma múltiple indolente) o plasmocitoma solitario [209, 239]. De hecho, el MGUS se considera el principal factor de riesgo para desarrollar mieloma múltiple [209]. También el sedentarismo y las

enfermedades autoinmunes, del tiroides e inflamatorias se han relacionado con un mayor riesgo de padecer esta enfermedad [209]. Por el contrario, no está claro que el consumo de alcohol y la dieta actúen como factores de riesgo, y el tabaquismo no se considera como tal [209].

1.5.3. Definición y etapas de la enfermedad

La definición actual de mieloma múltiple fue establecida en 2014 por el Grupo Internacional de Trabajo sobre el Mieloma (IMWG) [245]. Según este consenso, el diagnóstico de esta discrasia sanguínea requiere la presencia de un porcentaje igual o superior al 10 % de células plasmáticas clonales en la médula ósea o la existencia de plasmacitoma óseo o extramedular detectado mediante una biopsia, así como la observación de al menos uno de los eventos definitorios de mieloma [245]. Estos eventos incluyen aquellos que provocan daño orgánico en última instancia, concretamente: hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas (también conocidos como “características CRAB”); y uno o más de los siguientes biomarcadores específicos: un porcentaje de células plasmáticas en la médula ósea igual o mayor al 60 %, una relación de cadenas ligeras libres implicadas/no implicadas en la enfermedad equivalente o superior a 100 y, como mínimo, la detección de una lesión focal mediante resonancia magnética nuclear [245].

Por lo general, el mieloma múltiple constituye el último eslabón de una cadena de transformaciones neoplásicas de las células plasmáticas, consecuencia de la combinación de diversos factores, entre los que se incluyen eventos genéticos primarios y secundarios, heterogeneidad genética con posterior evolución clonal y variaciones en el microambiente de la médula ósea [211, 246]. Probablemente, las alteraciones genéticas se acumulan durante décadas, lo que explicaría que, cuando no existen otros factores de riesgo o mutaciones predisponentes, el mieloma múltiple sea clínicamente apreciable solamente en la población envejecida [247].

Normalmente, el mieloma múltiple evoluciona a partir del estado pre-maligno MGUS, que se caracteriza por una baja infiltración de células plasmáticas clonales en la médula ósea, bajos niveles de proteína M en suero o en orina y la ausencia de síntomas [209, 248]. Este carácter asintomático implica que más de la mitad de las personas con MGUS la han padecido durante más de 10 años antes de ser diagnosticados clínicamente [248]. Durante esta etapa una célula plasmática de la médula ósea puede acumular varias mutaciones genéticas primarias, incluidas anomalías cromosómicas y/o translocaciones del gen *IGH*, que alterarían la expresión de genes diana clave y proporcionarían una ventaja proliferativa a las células mutadas frente a las sanas [211]. En ocasiones, tiene lugar un estadio pre-maligno más avanzado, aunque todavía asintomático, conocido como SMM [248]. En esta fase, hay una mayor presencia de células plasmáticas clonales en la médula ósea y un ligero aumento de los niveles de proteína M en el suero o en la orina [209, 246]. La tasa de progresión de SMM a mieloma múltiple está condicionada por la citogenética subyacente, pues la translocación t(4;14), la delección 17p y la

ganancia 1q implican un mayor riesgo de progresión a mieloma múltiple a partir de los estadios pre-malignos [248]. Además, el mieloma múltiple puede progresar de intramedular a extramedular en fases más avanzadas, lo que se conoce como leucemia de células plasmáticas, donde las células plasmáticas malignas alcanzan niveles elevados en la sangre periférica y suele asociarse con un peor pronóstico [211]. Asimismo, durante el desarrollo del mieloma múltiple pueden producirse alteraciones genéticas adicionales, entre ellas mutaciones, metilaciones o anomalías en los microRNAs (miRNAs), que determinarían la agresividad de la enfermedad y su respuesta al tratamiento [211].

1.5.4. Sintomatología

Las células plasmáticas con gran capacidad proliferativa presentan un fenotipo aberrante que es potenciado al sufrir mutaciones genéticas secundarias como deleciones y duplicaciones, que favorecen su acumulación en la médula ósea y la secreción de niveles elevados de inmunoglobulinas a la sangre, lo que termina desencadenando la manifestación de los síntomas definitorios de la enfermedad [247]. Dichos síntomas, por lo general, están relacionados con el daño ocasionado a los órganos diana en el momento del diagnóstico, y se conocen como “características CRAB”: lesiones óseas, hipercalcemia, insuficiencia renal y anemia [247].

Los síntomas más comunes a la hora del diagnóstico son los relacionados con el aparato locomotor, ya que el 80 % de los pacientes presentan lesiones óseas, fracturas u osteopenia (densidad ósea inferior a la normal) [247]. Estas lesiones pueden presentarse como una única lesión lítica discreta clásica, conocida como plasmocitoma, como múltiples lesiones líticas extendidas por el sistema esquelético que afectan preferentemente a la columna, el cráneo y los huesos largos, o como osteopenia generalizada [249]. Su aparición se debe a una remodelación ósea defectuosa fruto de las interacciones de las células de mieloma con el microambiente de la médula ósea [249]. En condiciones normales, existe un equilibrio entre la actividad osteoclástica (reabsorción de hueso viejo) y la actividad osteoblástica (formación de nuevo hueso); sin embargo, en el mieloma múltiple se produce un incremento de la reabsorción ósea y una disminución o supresión de la generación de hueso, procesos en los que están implicados numerosos factores, interleuquinas, quimioquinas y vías de señalización [249, 250].

Muy ligadas a estas lesiones están la hipercalcemia y la insuficiencia renal. La hipercalcemia es la consecuencia directa de una profusa liberación de calcio debida a una excesiva resorción ósea [251]. Se trata de la complicación metabólica más frecuente en los pacientes y su gravedad puede ir desde leve a potencialmente mortal, pudiendo ocasionar daño neurológico [208, 252]. Por su parte, el daño renal suele producirse como consecuencia de la acumulación y precipitación de las cadenas ligeras monoclonales en distintas estructuras renales, aunque la hipercalcemia es la causante habitual de la insuficiencia renal tardía [253, 254].

Por otro lado, el microambiente de la médula ósea se ve alterado por la secreción de múltiples citoquinas y quimioquinas por parte de las células de mieloma que se encuentran allí, lo que afecta a etapas iniciales y finales de la eritropoyesis que tienen lugar en la médula ósea [255, 256]. Esto desemboca en la complicación más común del mieloma múltiple, la anemia, que puede ir acompañada de fatiga o de disnea [208, 256].

El isotipo de inmunoglobulina secretada varía entre pacientes. La más común es la IgG (52 %), seguida de la IgA (21 %) y la secreción de cadenas ligeras únicamente (16 %); poco frecuente es la secreción de IgD (2 %) y extremadamente rara lo es la de IgM e IgE (0,5 % y 0,01 %, respectivamente) [257, 258]. Incluso se han descrito casos en los que se secretan dos proteínas M diferentes, lo que se conoce como mieloma múltiple biclonal (1 %), donde la combinación más común es IgG e IgA (33 %), seguida de IgM e IgG (24 %) [259]. De todas ellas, los fenotipos IgA e IgD son los que se asocian con un peor pronóstico [257].

1.5.5. Diagnóstico

Si bien en la actualidad no se realiza un cribado rutinario para detectar los estados precursores asintomáticos MGUS o SMM, los cuales suelen diagnosticarse de manera accidental durante el diagnóstico de afecciones no relacionadas, hay estudios que sostienen que su detección precoz supondría un gran beneficio clínico [208, 260]. En contrapartida, la sospecha clínica de mieloma múltiple requiere conocer el historial médico y familiar del paciente y realizar un examen físico exhaustivo, estudios de laboratorio, una biopsia de médula ósea y pruebas de imagen [208, 239].

Los antecedentes de familiares de primer grado diagnosticados de neoplasias hematológicas y los antecedentes médicos relativos al grado de fragilidad y discapacidad del paciente y de comorbilidades y enfermedades concomitantes son los principales aspectos del historial médico a tener en cuenta [208]. El estudio de laboratorio se basa en el análisis de muestras de orina de 24 horas y de suero sanguíneo, de las que se realiza un examen bioquímico exhaustivo para evaluar la presencia de proteína M y cadenas ligeras libres, así como múltiples parámetros relacionados con las funciones hepática y renal [208, 239]. Además, se requiere un aspirado y una biopsia de médula ósea que evidencie la presencia de al menos un 10 % de células plasmáticas clonales o de un plasmocitoma en otra zona para confirmar el diagnóstico [239, 247]. La biopsia se destina al análisis histopatológico y con el aspirado se llevan a cabo estudios morfológicos, de inmunofenotipado y el análisis citogenético mediante FISH [239]. Finalmente, el alcance de las lesiones óseas se evalúa mediante técnicas de imagen tradicional, como radiografías simples, aunque en la actualidad se recomiendan técnicas más sensibles como CT, MRI y PET-CT siempre que sea posible [208, 261].

1.5.6. Citogenética y su relación con la progresión de la enfermedad

El mieloma múltiple se caracteriza por presentar una elevada complejidad y heterogeneidad desde el punto de vista genético, pues la convergencia de varios eventos genómicos da lugar al desarrollo y la progresión del tumor, cuyos fenotipo clínico y desenlace pueden ser muy diversos [262, 263]. Los estudios citogenéticos han sido fundamentales para la identificación de multitud de alteraciones cromosómicas y genéticas recurrentes en esta neoplasia hematológica, que pueden clasificarse en tres categorías: alteración en el número de copias (CNA) y anomalías estructurales, mutaciones puntuales y alteraciones epigenéticas [208, 262, 263].

Las alteraciones cromosómicas relativas al número de copias pueden afectar a un cromosoma completo, lo que se conoce como aneuploidía, o a un brazo cromosómico [264]. En función del estado de ploidía, el mieloma múltiple se clasifica en hiperdiploide y no hiperdiploide [263]. La hiperdiploidía (de 48 a 74 cromosomas) es la CNA más frecuente y son las trisomías que afectan a los cromosomas impares 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 las alteraciones más frecuentemente observadas [262, 264]. Por otro lado, en el mieloma no hiperdiploide se incluyen casos de hipodiploidía (hasta 44/45 cromosomas), pseudodiploides (de 44/45 a 46/47 cromosomas) y casi tetraploides (más de 74 cromosomas), donde es común la pérdida de los cromosomas 13, 14, 16 y 22 [263]. También se han identificado cariotipos hiperhaploides, en los que se ha perdido casi un juego haploide de cromosomas y muchos autosomas se encuentran en monosomía, exceptuando los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19 y 21, que aparecen en disomía [263]. Por su parte, las células hipodiploides pierden genes con posible función supresora de tumores [264].

La ganancia o pérdida parcial o completa de cromosomas observadas en el mieloma comprenden la ganancia 1q y las deleciones 1p [del(1p)], 13/13q [del(13)/(13q)], 17p [del(17p)], así como las deleciones 16 [del(16q)] y 12 [del(12p)] (Tabla 1.4) [262]. A diferencia de la hiperdiploidía, estas ganancias o pérdidas acontecen más avanzada la enfermedad, exceptuando la ganancia de la primera copia de 1q, que parece tratarse de un evento temprano [262].

Tabla 1.4 | Alteraciones genéticas relevantes en el mieloma múltiple. Se incluye la incidencia, los genes asociados y los procesos celulares que se ven afectados en cada una de ellas, así como una relación de las líneas celulares establecidas que poseen dichas modificaciones [262–273].

Alteración genética	Incidencia	Genes asociados	Eventos celulares afectados	Líneas tumorales establecidas humanas
del(17p)	5-12 % NDMM 75 % sPCL	<i>TP53</i> y <i>POL2RA</i>	Reparación del DNA, ciclo celular y apoptosis	CMA-02, CMA-03, KMM-1, KMS-11, KMS-12, KMS-18, KMS-20, KMS-26, KMS-34, OPM-2, RPMI 8226, U266, SK-MM-2, L-363, XG-16, XG-13, XG-11, XG-27, XG-20, XG-19, XG-5, MOLP-2, XG-30
del(13q)	15 % MM ≈45 % (del(13q) y monosomía 13)	<i>RB1</i>	Ciclo celular	CMA-02, CMA-03, NCI-H929, KMM-1, KMS-12, KMS-18, KMS-20, KMS-28, KMS-34, LP-1, OPM-2, RPMI 8226, SK-MM-1, U266, SK-MM-2, XG-26, XG-1, XG-16, XG-13, XG-25, XG-7, XG-11, MM.1S, XG-6, XG-19, JJN-3, XG-28, MOLP-2
Ganancia 1q	≈50 % NDMM 68 % RRMM	<i>CKS1B</i> , <i>CD46</i> , <i>MUC1</i> , <i>MCL1</i> , <i>ANP32E</i> , <i>BCL9</i> , <i>PSMD4</i> y <i>PDZK1</i>	Remodelación de la cromatina, reparación del DNA, síntesis proteica, ciclo celular y apoptosis	CMA-02, NCI-H929, JJN-3, KMM-1, KMS-11, KMS-12, KMS-18, KMS-20, KMS-26, KMS-28, LP-1, OPM-2, RPMI 8226, SK-MM-1, U266, XG-16, XG-25, XG-7, Lopra, XG-27, MM.1S, AMO-1, XG-20, MOLP-8, MOLP-2, XG-30
del(1p)	30 % MM 60 % PCL	<i>FAM46C</i> , <i>CDC14A</i> , <i>MTF2</i> y <i>CDKN2C</i>	Síntesis proteica, ciclo celular y apoptosis	CMA-02, CMA-03, NCI-H929, KMM-1, KMS-11, KMS-12, KMS-20, KMS-26, KMS-28, LP-1, OPM-2, RPMI 8226, SK-MM-1, SK-MM-2, XG-26, XG-16, XG-12, XG-13, XG-25, XG-7, XG-11, XG-27, MM.1S, AMO-1, XG-20, XG-6, XG-19, XG-28, XG-5, MOLP-2, XG-30
t(4;14)	≈15 %	<i>FGFR3</i> y <i>MMSET</i>	Proliferación, adhesión y diferenciación celular y apoptosis	NCI-H929, JIM3, KMS-28, OPM-2, KMS-34, KMS-18, LP-1, KMS-11, KMS-26, XG-7, XG-20, XG-24, XG-26, XG28, MOLP-2
t(6;14)	1-4 %	<i>CCND3</i>	Ciclo celular	KMM-1, FR4,
t(11;14)	15-20 %	<i>CCND1</i>		KMS-12-BM, U266, XG-1, KMS-12, KMS-27, CMA-01, XG-5, XG-11, XG-23, XG-25, XG-29, SK-MM-2, MOLP-8
t(14;16)	5 %	<i>MAF</i>	Síntesis de DNA y ciclo celular	MM.1S, JJN-3, RPMI 8226, KMS-11, KMS-26, KM-4, CMA-02, XG-12, XG-13, XG-19, XG-30
t(14;20)	<2 %	<i>MAFB</i>	Síntesis de DNA, ciclo celular, proliferación celular y apoptosis	SK-MM-1
t(8;14)	<5 %	<i>MYC</i>	Proliferación celular y apoptosis	KMS-28, OPM-2, KMS-11, JJN-3, CMA-02, SK-MM-1, KMS-27, CMA-01, KMM-1, FR4, KMS-20, AMO-1, CMA-03
t(8;22)	5-16,5 %			NCU-MM-1

Las variaciones estructurales que tienen lugar habitualmente en las células de mieloma son las translocaciones que afectan a numerosos genes (Tabla 1.4 y Fig. 1.21), especialmente *IGH* y *MYC* [262]. Las translocaciones que involucran a *IGH* promueven la sobreexpresión de diversos oncogenes, facilitando el desarrollo tumoral, y se encuentran hasta en la mitad de los pacientes, siendo las más comunes las translocaciones t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) y t(14;20), con un pronóstico variable [262, 263]. Al igual que la hiperdiploidía, las translocaciones de *IGH* se catalogan como eventos tempranos en el desarrollo del mieloma, pues se producen en fases precursoras y son totalmente clonales [262]. Por el contrario, las translocaciones que implican a *MYC* son subclonales, se producen más adelante en la evolución de la enfermedad y, frecuentemente, se relacionan con una mala prognosis [262].

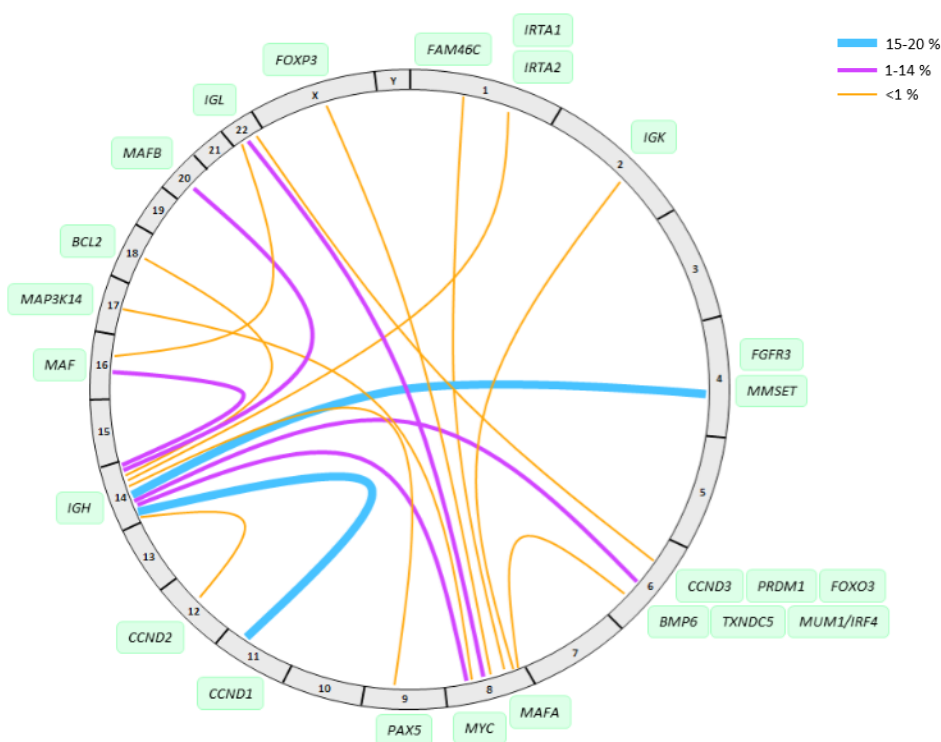


Figura 1.21 | Diagrama de Circos que expone las translocaciones observadas en el mieloma múltiple. Las líneas azules gruesas señalan las translocaciones más frecuentes, las fucsias intermedias las de frecuencia moderada y las naranjas finas las de baja frecuencia. Al lado de cada cromosoma implicado se muestran los genes afectados. Adaptado de [265] y ampliado con [262, 266, 267, 274–277].

Otros mecanismos que también provocan cambios a nivel estructural en el genoma son la cromotripsis, la cromoplexia y la “inserción de plantilla” [262]. La cromotripsis involucra a dos cromosomas como máximo y da lugar a variaciones estructurales complejas cuando un cromosoma se rompe y posteriormente se une de forma aparentemente aleatoria [262, 264]. La cromoplexia consiste en una cadena de translocaciones y/o inversiones que afectan a tres o más cromosomas, siendo los cromosomas 8, 11 y 14 los más damnificados, y que implican la pérdida de un gran número de copias [262, 264]. Finalmente, la inserción de plantilla se basa en la

duplicación, unión y reinserción en el genoma de partes de dos o más cromosomas y representa, aproximadamente, el 75 % de las translocaciones que implican a *MYC* [262].

Estudios de secuenciación completa del genoma y del exoma han permitido determinar que la tasa de mutación del mieloma (1,6 mutaciones por Mb) es intermedia entre la observada en las leucemias agudas y los tumores sólidos [263]. Sin embargo, no han señalado ninguna mutación universal, única y específica, como sucede con otras neoplasias hematológicas [263]. La mayoría de ellas son variantes de un solo nucleótido que afectan a la estructura de la proteína, pudiendo producirse a nivel clonal o subclonal y evolucionar con el desarrollo de la enfermedad [263]. Las más comunes involucran rutas esenciales para la supervivencia y proliferación del mieloma, incluidas las vías de las MAPK (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) y de NF- κ B (*TRAF3*, *CYLD*), las activadas por daño en el DNA y por su mecanismo de reparación (*TP53*), el ciclo celular (*RB1*), la diferenciación de las células plasmáticas (*SP140*), la activación de *MYC* (*HUWE1*) y la regulación de la expresión génica (*DIS3* y *FAM46C*), así como a procesos como la adhesión celular (*ROBO1*, *FAT3*), encontrándose mutaciones en los genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* en el 40-50 % de los pacientes de nuevo diagnóstico [262, 263]. A estas mutaciones hay que sumar otras nuevas detectadas en genes que codifican histonas y genes que regulan proteínas que se unen o regulan a *MYC* [262]. Además, *Hoang et al.* identificaron mutaciones codificantes en genes implicados en la vía de NF- κ B, así como mutaciones en regiones no codificantes que regulan a la baja los genes supresores de tumores *PAX5* y *HOXB3* y variaciones en el número de copias que afectan a regiones reguladoras no codificantes de *MYC* [262, 278]. También, existe la posibilidad de que mutaciones en genes que codifican para las dianas de tratamientos como lenalidomida, los inhibidores del proteasoma y los esteroides induzcan resistencia a dichos tratamientos [262]. De hecho, su prevalencia es mayor en pacientes con mieloma múltiple recidivante/refractario [262].

Por su parte, las variaciones epigénéticas halladas en el mieloma múltiple incluyen alteraciones en el patrón de metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas, lo que implica la remodelación de la cromatina, así como la desregulación de miRNAs [208, 279]. De hecho, mutaciones y variaciones en el número de copias y en la expresión de genes que controlan la acetilación y metilación de histonas, la metilación del DNA, los miRNAs y los remodeladores de la cromatina en estructuras de orden superior, sugieren que la epigenética desempeña un importante papel en la iniciación, progresión y recaída del mieloma múltiple [279].

Todas estas alteraciones genéticas no ocurren simultáneamente, sino que la patogenia del mieloma múltiple se divide en diversas etapas, pues a partir de un evento iniciador tiene lugar la progresión hacia el mieloma múltiple y los estadios más avanzados [263, 280] (Fig. 1.22). La hiperdiploidía y las translocaciones que involucran al gen *IGH* se consideran eventos genéticos primarios, aunque, en general, las células solamente presentan una de las dos modificaciones, ya que son eventos mutuamente excluyentes que se producen en los estados pre-malignos [280, 281].

A estas alteraciones les siguen otras, conocidas como eventos genéticos secundarios, que estimulan la progresión y la recaída del tumor, contribuyendo ambos eventos a generar el fenotipo maligno de las células tumorales [280]. Dentro de las anomalías secundarias se incluyen variaciones en el número de copias, translocaciones que afectan a *MYC*, mutaciones somáticas recurrentes y alteraciones epigenéticas [280, 281]. Por tanto, el evento iniciador marca la progresión genética y la acumulación de eventos, lo que se traduce en una gran heterogeneidad entre los pacientes [282, 283].

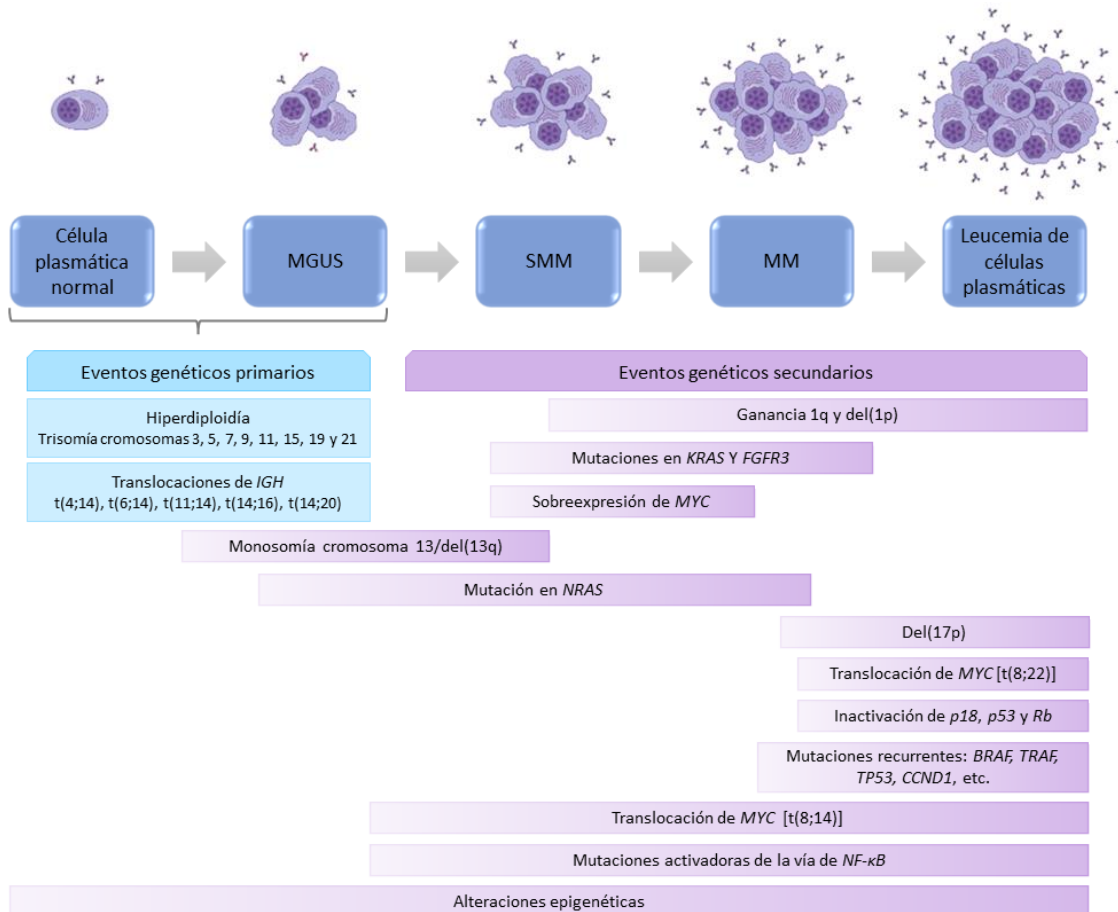


Figura 1.22 | Eventos genéticos implicados en la patogénesis del mieloma múltiple. Las células plasmáticas de la médula ósea comienzan a experimentar ciertos cambios genéticos conocidos como primarios (hiperdiploidía o translocaciones que involucran al gen *IGH*), dando origen al estadio precursor MGUS. Alteraciones posteriores, denominadas secundarias, incluyen ganancias o pérdidas cromosómicas, la sobreexpresión de *MYC* o translocaciones que lo involucran, mutaciones somáticas y modificaciones epigenéticas, que pueden suceder en cualquier fase de la mielomagénesis. Estas agravan el fenotipo aberrante y favorecen la acumulación de las células malignas en la médula ósea que, en consecuencia, secretan cantidades ingentes de inmunoglobulinas al torrente sanguíneo, lo que culmina en la manifestación de los síntomas que definen el mieloma múltiple, que puede terminar progresando a enfermedad extramedular. El degradado de color en los eventos genéticos secundarios hace referencia a la acumulación de clones malignos en las diferentes etapas de la enfermedad. Modificado de [211, 263, 280, 284]. Imagen creada parcialmente en BioRender.com.

La elevada complejidad del panorama genético asociado al mieloma múltiple lleva consigo una enorme inestabilidad genómica, pues todas las alteraciones genéticas expuestas impulsan la mielomagénesis y la progresión de la enfermedad [262, 263]. Por ello, conocer la citogenética es fundamental para realizar un pronóstico adecuado de la enfermedad y definir una estrategia terapéutica para cada paciente [285, 286].

1.5.7. Sistemas de estadificación y estratificación del riesgo

Los factores pronósticos y los sistemas de estadificación y estratificación del riesgo en el mieloma han ido variando con el desarrollo tecnológico [287]. En 1975 se ideó el primer sistema de estadificación con valor pronóstico para el mieloma, el sistema Durie-Salmon, el cual utilizaba diversos factores para predecir la carga tumoral y fue ampliamente utilizado durante más de 30 años [216, 287, 288]. No obstante, este sistema presentaba importantes limitaciones y fue sustituido por el sistema ISS en 2005, un sistema de estadificación simple que se basa en otros factores pronósticos pero que no contempla marcadores pronósticos conocidos de la enfermedad, como los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa sérica y las anomalías citogenéticas t(4;14), t(14;16) y del(17p) [288]. Por ello, ambos biomarcadores fueron incluidos en la revisión que se hizo de dicho sistema en 2015 (R-ISS) [288]. Además, el IMWG recomienda utilizar estas anomalías citogenéticas como criterio de estratificación del riesgo en los pacientes, e incluso sugiere ampliarlas al estado de ploidía, la ganancia 1q y las translocaciones y deleciones t(11;14), t(14;20), del(1p) y del(13q) [287, 289]. Análogamente, el modelo mSMART, desarrollado y actualizado en varias ocasiones por la Clínica Mayo, propone muchas de estas y otras anomalías genéticas además de otro tipo de marcadores para la estratificación del riesgo, y establece la definición de pacientes “doble *hit*” (aquellos que poseen dos alteraciones genéticas de alto riesgo) y “triple *hit*” (aquellos que portan al menos tres anomalías genéticas de alto riesgo) [285, 287, 290].

1.5.8. El mieloma múltiple y su microambiente en la médula ósea

La transformación maligna de las células plasmáticas en el mieloma múltiple viene marcada, además de por el componente genético, por el microambiente en el que estas se encuentran inmersas en la médula ósea, pues la comunicación que establecen las células tumorales con su entorno resulta decisiva en la iniciación, progresión y metastatización del mieloma, así como en la respuesta al tratamiento y en las posibles recaídas [279, 288]. El microambiente de la médula ósea está conformado por una compleja red celular compuesta de células endoteliales, osteoblastos y osteoclastos, células estromales de la médula ósea, células madre mesenquimales, fibroblastos, adipocitos y células del sistema inmune (incluidas células T, B y NK, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas y macrófagos asociados a tumores),

además de matriz extracelular, que da sustento tanto a las células hematopoyéticas normales como a las células neoplásicas a través de señales bioquímicas [208, 291–293] (Fig. 1.23).

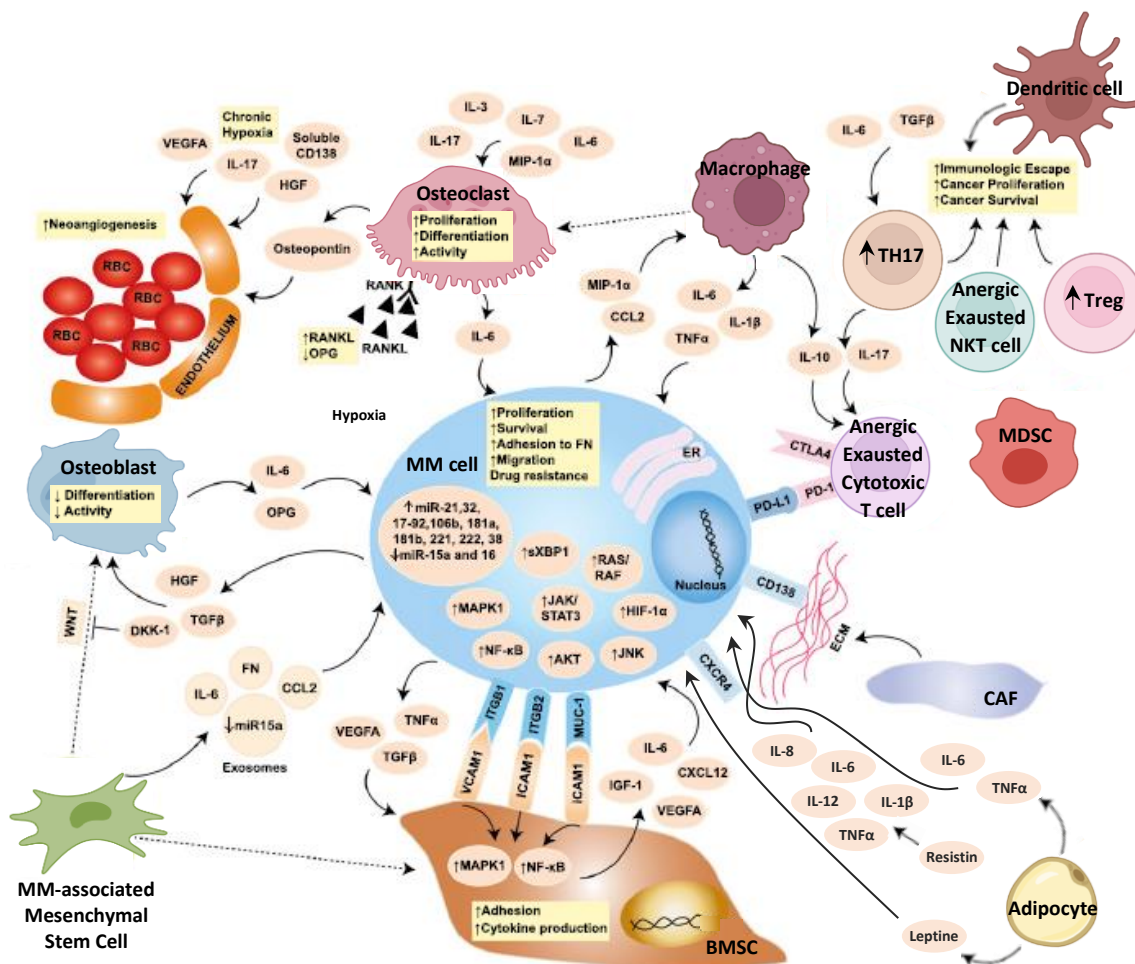


Figura 1.23 | Principales nodos de comunicación entre las células de mieloma y su microambiente en la médula ósea. Las flechas punteadas indican diferenciación y las flechas continuas, secreción y/o actuación sobre las células diana. Modificada de [294] y ampliado con [292, 295]. Imagen creada parcialmente en BioRender.com.

Las células estromales de la médula ósea (BMSC) constituyen el epicentro del microentorno en el mieloma múltiple, pues mediante contactos directa célula-célula y la secreción de citoquinas y quimioquinas generan un nicho que permite el crecimiento, la migración y la invasión de las células tumorales y las protege de la apoptosis y de los tratamientos [208, 294]. En concreto, las interacciones entre las células estromales y las de mieloma a través de los ejes VCAM-1/ITGB1, ICAM-1/ITGB2 y MUC1) desatan una cascada de señalización bidireccional que favorece la iniciación del mieloma y proporciona la denominada “resistencia a fármacos mediada por adhesión” [208, 294] (Fig. 1.23). Por otro lado, las células madre mesenquimales incrementan su producción de VEGF-A, TNF, IL-1 β e IL-6, lo que impide la diferenciación y función de los osteoblastos y estimula la proliferación de las células de mieloma [294]. Además promueven la tumorigénesis al secretar exosomas cargados de factores oncogénicos, entre los que se incluyen IL-6, CCL2 y fibronectina [294] (Fig. 1.23).

Las células de mieloma suelen establecerse alrededor de los osteoblastos, pues el nicho osteoblástico fomenta su supervivencia al conducirlos a un estado latente [293]. No obstante, la entrada en escena de los osteoclastos remodela el nicho y desactiva la latencia inducida en las células malignas, de manera que estas se reactivan y son desplazadas de su nicho [293]. En esta transición también participan las células de mieloma activando o inhibiendo diferentes vías de señalización y secretando múltiples factores [291, 294]. Además, la interacción de las células tumorales con las BMSC y los osteoblastos promueve la producción de RANKL y reduce la de osteoprotegerina (OPG), receptor señuelo de RANKL producido por los osteoblastos que mantiene inhibida la osteoclastogénesis [208, 296]. En consecuencia, RANKL puede asociarse con el receptor RANK, presente en los preosteoclastos, desencadenando la diferenciación y activación de los osteoclastos, en la que intervienen numerosas citoquinas y quimioquinas [208, 294, 296] (Fig. 1.23). Por su parte, los osteoclastos secretan IL-6 y osteopontina, que promueven la proliferación de las células de mieloma y la angiogénesis, respectivamente [294] (Fig. 1.23).

Las células de mieloma reclutan y activan a los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) a través de la secreción de TGF- β [297]. A cambio, estos fibroblastos secretan citoquinas, quimioquinas y factores que impulsan el crecimiento y la migración de las células malignas, a la vez que participan en la remodelación de la matriz extracelular en pro de la progresión de la enfermedad [297, 298] (Fig. 1.23). Por su parte, los adipocitos, a través de la secreción de adipoquinas, entre las que se incluyen citoquinas pro-inflamatorias, fomentan el crecimiento y la supervivencia de las células de mieloma a la vez que promueven la angiogénesis, la destrucción de hueso, la evasión del sistema inmune y la farmacorresistencia [295] (Fig. 1.23).

Dentro de las células del sistema inmune, determinadas células B reguladoras se enriquecen durante la transición de MGUS a mieloma múltiple en la médula ósea, donde producen IL-10 e impiden la lisis de las células malignas mediada por células NK [299]. Respecto a las células T, abundan los linfocitos Th17, los cuales anulan la vigilancia inmunitaria con la secreción de IL-10 e IL-17, actuando esta última también como factor estimulador de la osteoclastogénesis [294] (Fig. 1.23). Los linfocitos T reguladores (Treg) provocan la inmunosupresión de los linfocitos T citotóxicos y las células presentadoras de antígeno (Fig. 1.23) mediante contactos célula-célula, la elevada secreción de IL-10 y TGF- β y promoviendo la expresión de la enzima inmunosupresora IDO en las células dendríticas [294, 299]. Además, esta enzima y la adenosina (ADO) favorecen a la expansión de las células T reguladoras [299]. A este ambiente de tolerancia inmunológica también contribuyen las interacciones del receptor inhibitor PD-1 con sus ligandos PD-L1/PD-L2, expresados en los linfocitos citotóxicos y en las células de mieloma, respectivamente [294, 299] (Fig. 1.23). Asimismo, las células T modifican su patrón de secreción de citoquinas en un medio rico en IL-6 e IL-7, el cual potencia la osteoclastogénesis [294]. Por último, en relación con las células NK, la evolución de la enfermedad conlleva una disminución de la expresión y

actividad de receptores de activación (por ejemplo, NKG2D, DNAM-1 y CD161) y un aumento de la expresión de receptores de inhibición (CD158a) y de PD-1, lo que merma su funcionalidad [293, 299]. Asimismo, las células NKT, que expresan receptores de células NK y de linfocitos T, también exhiben una actividad citotóxica limitada [293] (Fig. 1.23).

Las células dendríticas se congregan en la médula ósea durante la progresión del mieloma, donde su interacción con las células malignas a través del complejo CD80/86-CD28 y la elevada expresión de PD-L1 en su superficie alteran la vigilancia inmunológica (Fig. 1.23), contribuyendo a la proliferación y supervivencia de las células de mieloma [293, 299]. Además, la IL-3 que secretan promueve su supervivencia, el crecimiento de las células malignas y también la lisis ósea, mientras que otras moléculas presentes en el microambiente como el TGF- β y la ADO potencian su tolerogenicidad [293, 299].

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC), por su parte, promueven la proliferación de las células de mieloma, la diferenciación de los linfocitos T reguladores y la angiogénesis a la vez que suprimen la activación, proliferación y capacidad citotóxica de las células NK y los linfocitos T efectoras; además, si el medio está enriquecido en RANKL son capaces de diferenciarse a osteoclastos [293, 294, 299]. Por su parte, las células de mieloma y las células estromales de la médula ósea promueven la supervivencia, proliferación y expansión de las MDSC mediante la secreción de diversas citoquinas, quimioquinas y exosomas, provocando estos últimos la sobreexpresión de Bcl-X_L y Mcl-1 en las MDSC [293, 299–301].

Por último, las células de mieloma reclutan a macrófagos asociados a tumores del tipo M2 mediante la liberación de quimioquinas y estos colaboran de varias formas en la patogénesis del mieloma [293, 294]. Por un lado, secretan grandes cantidades de citoquinas que favorecen al mieloma (Fig. 1.23); por otro, producen agentes inmunosupresores que inducen un estado de inmunotolerancia (Fig. 1.23); además, protegen a las células tumorales frente a la apoptosis inducida por quimioterapia mediante su interacción con ellas a través de los complejos selectina/PSGL-1 y LFA1/ICAM-1; y promueven la angiogénesis al liberar factores proangiogénicos [293, 294].

Sin embargo, en las fases avanzadas de la enfermedad las células de mieloma cesan su dependencia por las señales de crecimiento emitidas por el microambiente y son capaces de retornar al torrente sanguíneo y, con ello, alcanzar diferentes órganos [293].

Cabe resaltar que la hipoxia domina el microambiente de la médula ósea, por lo que la expresión de HIF-1 α y VEGF-A es elevada y se promueven procesos como la neoangiogénesis, el tráfico de las células tumorales y la metástasis [294].

1.5.9. Catálogo terapéutico y manejo clínico del mieloma múltiple

1.5.9.1. De la medicina tradicional a la inmunoterapia

El panorama terapéutico del mieloma múltiple ha evolucionado sobremedida desde que los primeros pacientes fueran tratados con remedios tradicionales e inespecíficos [212, 216]. Buena parte de estos avances han sido posibles gracias a la incorporación a la práctica clínica de nuevos agentes que han demostrado ser efectivos frente al mieloma, entre los que se incluyen inhibidores del proteasoma, inhibidores de histonas deacetilasas, fármacos inmunomoduladores y anticuerpos monoclonales [239, 302]. Estos avances, junto con las terapias más tradicionales basadas en agentes alquilantes, corticosteroides, antraciclinas y en el trasplante autólogo de células madre, ofrecen un amplio abanico de posibilidades terapéuticas en la actualidad [239, 302]. No obstante, el mieloma múltiple continúa siendo una enfermedad incurable como consecuencia de las recaídas o el desarrollo de resistencias a los tratamientos, lo que suele implicar un peor pronóstico [211, 302].

Antes de la aparición de los primeros agentes efectivos contra el mieloma, el uso de etilcarbamato (uretano) fue muy popular durante casi dos décadas, pero su utilización cesó en 1966, cuando un estudio demostró su falta de eficacia y su elevada toxicidad [216].

1.5.9.1.1. Agentes alquilantes

El descubrimiento en 1942 de la mostaza nitrogenada (mecloretamina) como agente quimioterápico supuso un punto de inflexión en la lucha contra el cáncer, ya que sirvió de base para la generación de los agentes alquilantes de DNA, los primeros compuestos antitumorales eficaces que se desarrollaron y que siguen siendo valiosos para el tratamiento de numerosos tipos de tumores [303]. Su actividad biológica se basa en su unión al DNA y el entrecruzamiento de sus hebras, impidiendo la transcripción y la replicación del DNA, lo que provoca la parada del ciclo celular y, en última instancia, la muerte de las células, especialmente de aquellas con elevada capacidad proliferativa [303, 304]. Estos agentes supusieron la primera herramienta con la que enfrentar el mieloma múltiple, y han constituido el pilar de los regímenes de tratamiento durante décadas hasta nuestros días, en que se combinan con otras terapias [304].

Tradicionalmente, melfalán y ciclofosfamida han sido los agentes alquilantes de primera y segunda elección, respectivamente, en el tratamiento del mieloma múltiple [304]. Pese a que su aplicación se asocia con efectos secundarios como la mielosupresión e infecciones, su combinación con otras terapias se ha evaluado y se sigue evaluando en numerosos ensayos clínicos, y en la actualidad se utilizan en múltiples pautas de tratamiento, mayoritariamente combinados con otros fármacos [239, 303–305]. El melfalán, además, también se combina con el trasplante autólogo de células madre [303]. Por otra parte, el uso de bendamustina en el mieloma múltiple es marginal, aunque la EMA aprobó su combinación con prednisona en pacientes

mayores de 65 años que no podían ser trasplantados ni tratados con talidomida o bortezomib [304, 306]. En la actualidad, su evaluación clínica continúa como agente único o combinada con terapias clásicas y novedosas [307].

A pesar de la relevancia histórica de estos agentes en la lucha contra el mieloma, se han visto desplazados por nuevos compuestos debido a los efectos adversos que provocan [308]. Con el objetivo de superar sus limitaciones ha surgido melfalán flufenamida o melflufen, un agente alquilante (melfalán) conjugado con un péptido que ha mostrado mayor actividad que melfalán libre frente al mieloma tanto *in vitro* como *in vivo*, y que combinado con bortezomib, lenalidomida o dexametasona da lugar a un efecto sinérgico anti-mieloma [303, 308]. Por ello, la FDA aprobó en 2021 su utilización en combinación con dexametasona en pacientes con mieloma refractario o recidivante que hubieran recibido previamente al menos cuatro líneas de tratamiento y cuya enfermedad fuera resistente, por lo menos, a un inhibidor del proteasoma, un fármaco inmunomodulador y un anticuerpo monoclonal anti-CD38 [303].

1.5.9.1.2. Glucocorticoides

Tomando como referencia la hormona cortisol, el glucocorticoide humano por excelencia, se han sintetizado pequeñas moléculas análogas desde el punto de vista estructural y farmacológico que poseen actividad vasoconstrictora, anti-proliferativa, inmunosupresora y anti-inflamatoria [309].

Dos de los glucocorticoides sintéticos con más de 60 años de trayectoria en el tratamiento del mieloma múltiple son prednisona y dexametasona [310]. Prednisolona, la forma activa de la prednisona, es alrededor de cuatro veces más potente que el cortisol [311, 312], mientras que dexametasona es seis veces más potente que la prednisona y aproximadamente 30 veces más que el cortisol [311, 313]. A pesar de los efectos secundarios asociados, que pueden ir de leves a potencialmente mortales y afectar a la práctica totalidad de los sistemas del organismo, se han convertido en estándares del tratamiento frente al mieloma múltiple, ya sea como agentes únicos o combinados con otros agentes [310, 313].

1.5.9.1.3. Antraciclinas

Una familia de antibióticos con actividad antitumoral es la de las antraciclinas [314]. En las pautas de tratamiento del mieloma múltiple, la antraciclina seleccionada para combinarla con otros fármacos es la doxorrubicina [239]. Producida por la cepa *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, su principal diana son las enzimas topoisomerasa I y II, ya que, al intercalarse entre las bases del DNA, impide desenrollarse a la doble hélice y, por ende, procesos como la replicación del DNA y la transcripción se bloquean [315, 316]. Esta situación provoca un daño en el DNA que las células intentan reparar sin éxito, de manera que detienen el ciclo en las fases G1 y G2 hasta que, finalmente, se desencadena la apoptosis [316]. A pesar de su popularidad como agente

antineoplásico, es poco efectiva como agente único en el mieloma múltiple y los efectos secundarios que conlleva son multidireccionales, lo que limita su utilización [248, 317]. Para intentar reducir los efectos adversos y aumentar su eficacia se han explorado diferentes estrategias, como el desarrollo de nuevas formulaciones [318]. Es el caso de la doxorrubicina encapsulada en liposomas recubiertos de polietilenglicol, que posee mejores propiedades farmacocinéticas, una menor toxicidad que la doxorrubicina libre y ha demostrado ser activa en el mieloma múltiple, por lo que la FDA aprobó en 2007 su uso combinado con bortezomib para el tratamiento del mieloma múltiple recidivante o refractario sometido al menos a una terapia previa que no incluya bortezomib, aunque su uso es marginal [248, 318–321].

1.5.9.1.4. Fármacos inmunomoduladores (IMiDs)

Una familia de agentes que permitieron un salto cualitativo en el tratamiento del mieloma son los denominados IMiDs, un grupo de compuestos derivados de la talidomida. Actualmente, esta familia de compuestos ofrece potentes armas para combatir el mieloma: talidomida y sus derivados lenalidomida y pomalidomida [322].

A nivel molecular, estos fármacos alteran diferentes vías y mecanismos en las células de mieloma, pues inducen la parada del ciclo celular en la fase G0/G1, eluden la activación de NF- κ B y, por tanto, la expresión de proteínas anti-apoptóticas disminuye, sensibilizan las células a TRAIL e inducen la activación de la caspasa-8, lo que termina desencadenando la apoptosis [323, 324]. La diana molecular de estos fármacos es la proteína cereblón (CRBN), la cual forma parte de un complejo con actividad ubiquitina ligasa E3 [208]. Su interacción promueve el reclutamiento y la posterior degradación mediante la vía del proteasoma de varios factores de transcripción, entre ellos Ikaros (IKZF1) y Aiolos (IKZF3), cuya eliminación regula negativamente el factor de transcripción IRF4 y, en consecuencia, Myc [208, 216, 322, 324]. Puesto que IRF4 es crítico para la supervivencia de las células de mieloma, los IMiDs son citotóxicos para las mismas [208, 324].

Su acción anti-mieloma es pleiotrópica, pues modulan la respuesta inmune y poseen actividad anti-inflamatoria, anti-angiogénica, anti-proliferativa y citotóxica [322, 325]. Concretamente, alteran la comunicación entre las células de mieloma y el microentorno de la médula ósea, inhiben la expresión de múltiples factores y citoquinas necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, así como para los procesos angiogénicos e inflamatorios, incrementan la proliferación de los linfocitos T y la actividad de las células citotóxicas del sistema inmune y, en el caso de la lenalidomida y la pomalidomida, mejoran la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y reprimen a los linfocitos T reguladores [211, 299, 323, 326].

A pesar de la mala fama pública inicial de la talidomida debido a su efecto teratogénico durante el desarrollo embrionario, su combinación con dexametasona fue autorizada en 2006 por la FDA en pacientes con mieloma múltiple de nuevo diagnóstico, pero en pacientes con enfermedad avanzada se opta por otras estrategias más efectivas y menos tóxicas [322, 324, 325]. En la actualidad, la combinación de lenalidomida con otros quimioterápicos, incluidos los agentes alquilantes, la dexametasona, los inhibidores de histona deacetilasas, los inhibidores del proteasoma y los anticuerpos monoclonales, constituye la base terapéutica para los pacientes de mieloma, especialmente en el mieloma recidivante/refractario [324]. Por ello, su combinación con dexametasona fue aprobada por la FDA en 2006 para pacientes con una línea de tratamiento fallida, y en 2015 consiguió su aval para los pacientes de mieloma de nuevo diagnóstico [216, 322, 324]. Pomalidomida, por su parte, es activa en modelos celulares y animales resistentes a lenalidomida y/o bortezomib [324, 326]. Además, su eficacia mejora al combinarla con dexametasona o inhibidores del proteasoma como bortezomib y ha demostrado ser eficaz en pacientes refractarios a lenalidomida en ensayos clínicos [211, 324]. Esto llevó a la FDA a aprobar en 2013 su aplicación en pacientes con dos líneas de tratamiento previas, incluyendo bortezomib y lenalidomida, y en 2015 autorizó su uso combinado con dosis bajas de dexametasona en pacientes con mieloma recidivante y/o refractario expuestos a al menos dos terapias previas, incluidas un inhibidor del proteasoma y lenalidomida [325, 327]. Hoy en día, la pomalidomida continúa evaluándose combinada con otros agentes, pero su utilización como agente de primera línea o tras el trasplante de médula ósea todavía no se ha estudiado [324, 326].

Pese a todo ello, se necesitan fármacos con eficacias superiores a las de los actuales que ataquen al mieloma refractario a lenalidomida y pomalidomida [308]. En este sentido, han surgido recientemente unos compuestos derivados de los IMiDs denominados CELMoDs, los cuales han generado resultados optimistas en modelos preclínicos y podrían vencer la refractariedad de sus predecesores, lo que ha permitido su evaluación en ensayos clínicos temprano en pacientes con mieloma recidivante/refractario [308].

1.5.9.1.5. Inhibidores del proteasoma (PIs)

Las células eucariotas se valen de la vía ubiquitina-proteasoma para garantizar la homeostasis proteica [328]. La sobreactividad del proteasoma en las células de mieloma conlleva una profusa degradación de moléculas como p53 e IκB, inhibidor de NF-κB [328]. Por el contrario, la inhibición o el mal funcionamiento del proteasoma provoca la acumulación de proteínas intracelulares mal plegadas y ubiquitinadas que activan la respuesta a proteínas desplegadas (vía UPR, por sus siglas en inglés) [326, 328]. La incapacidad de las células de sobreponerse al estrés mediante dicha vía y la acumulación de factores pro-apoptóticos terminan conduciendo a la muerte celular [326, 328]. Por ello, el advenimiento de los PIs supuso un acontecimiento trascendental en el manejo del mieloma múltiple, hasta el punto de haberse

convertido en uno de los pilares del tratamiento de la enfermedad [308]. De hecho, la FDA ha aprobado hasta el momento tres PIs para el tratamiento del mieloma múltiple recidivante/refractario: bortezomib en 2003, carfilzomib en 2012 e ixazomib combinado con lenalidomida y dexametasona en 2015 [216, 329]. Bortezomib, además, fue autorizado en 2008 para pacientes de nuevo diagnóstico [330]. Igualmente, existen otros tres PIs de nueva generación que han entrado en ensayos clínicos (marizomib, oprozomib y delanzomib), pero ninguno parece superar por el momento la eficacia de carfilzomib e ixazomib [308, 331].

Estos compuestos tienen como diana una o varias subunidades del proteasoma 20S [308]. Sus efectos en las células de mieloma pasan por la interrupción de la señalización de la vía de NF- κ B, la detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis, a la vez que también poseen actividad anti-angiogénica [211, 326, 331]. Además, se ha descrito que bortezomib inhibe la osteoclastogénesis y estimula la osteoblastogénesis, lo que permite la regeneración del hueso [211]. Asimismo, una peculiaridad de los estos compuestos es que son capaces de inducir muerte inmunogénica (ICD) [332].

El primer PI desarrollado fue bortezomib, un derivado del ácido borónico que inhibe lenta y reversiblemente la subunidad catalítica β 5 del proteasoma y, en menor medida, la subunidad β 1 [328, 331]. A este le siguió el PI de segunda generación carfilzomib, un tetrapéptido de epoxicetona que bloquea de manera irreversible la subunidad catalítica β 5 del proteasoma 20S con mayor especificidad que bortezomib [248, 308, 326, 328]. Además, es eficaz en líneas celulares de mieloma resistentes a bortezomib y provoca menos efectos secundarios [326, 331]. En la clínica se utiliza como agente único gracias a las buenas tasas de respuesta observadas en pacientes con mieloma recidivante/refractario, y combinado solo con dexametasona o también con lenalidomida debido a la notable mejora de la supervivencia libre de progresión detectada en los pacientes recidivantes [211]. Asimismo, carfilzomib también ha mostrado ser efectivo y bien tolerado en pacientes de nuevo diagnóstico, por lo que algunos países lo toman en consideración para tratar a estos pacientes [211]. Finalmente, ixazomib es un PI de segunda generación que puede administrarse por vía oral [331]. En su forma activa, este derivado del ácido borónico inhibe de manera reversible la subunidad β 5 del proteasoma 20 S y a dosis elevadas hace lo propio con la subunidad β 1 [326, 331]. A nivel preclínico es activo en líneas celulares resistentes a bortezomib y su administración junto con lenalidomida y dexametasona es sinérgica, una combinación que en ensayos clínicos ha conseguido incrementar la supervivencia libre de progresión de pacientes con mieloma recidivante/refractario [326]. Además, ha demostrado ser efectivo y aparentemente bien tolerado en pacientes de nuevo diagnóstico [211].

1.5.9.1.6. Inhibidores de histona deacetilasas

Dada la implicación de los factores epigenéticos en la patogénesis del cáncer, parte de las investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra la maquinaria epigenética en las células tumorales [333]. Entre ellos se incluyen los inhibidores de histona deacetilasas (HDACs), unos compuestos que modifican el equilibrio entre la acetilación y la deacetilación de las histonas y revierten el silenciamiento génico causado por la deacetilación de las mismas [334]. No obstante, la actividad de estos fármacos se extiende a otras proteínas distintas a las histonas, como reguladores, mediadores de la transducción de señal, chaperonas, factores de transcripción y proteínas reparadoras del DNA [335]. Puesto que se conocen casi una veintena de HDACs humanas, los numerosos inhibidores obtenidos pueden catalogarse, según su selectividad, como pan-inhibidores e inhibidores específicos de una o varias de ellas [336].

En el caso concreto del mieloma, los inhibidores de HDACs reactivan la expresión de genes silenciados e inducen daño en el DNA y la sobrerregulación de proteínas que promueven la parada del ciclo celular y la muerte de las células [308, 328]. De hecho, estos compuestos promueven la actividad de p53 y, en consecuencia, la transcripción de genes pro-apoptóticos aumenta [337]. Los estudios preclínicos han revelado una eficacia modesta de estos inhibidores como agentes únicos, pero han arrojado resultados alentadores cuando se combinan con lenalidomida, dexametasona o inhibidores del proteasoma [308, 336]. Esto ha permitido su progresión a la fase clínica, donde varios están siendo evaluados. De entre todos ellos destaca panobinostat, un inhibidor oral no selectivo cuyo buen rendimiento en ensayos clínicos le valió la aprobación de la FDA y la EMA en 2015 para su uso combinado con bortezomib y dexametasona en pacientes de mieloma sometidos a dos tratamientos previos, incluidos bortezomib y un agente inmunomodulador [326, 336, 338]. Sin embargo, la FDA retiró esta indicación en marzo de 2022, a petición del fabricante, por la imposibilidad de completar la investigación clínica posterior, necesaria para conservar la aprobación [339]. En cualquier caso, continúa evaluándose combinado con agentes habituales y emergentes [336].

Otros inhibidores de HDACs que se encuentran en ensayos clínicos en pacientes con recaída o mieloma refractario son vorinostat, romidepsina y ricolinostat, donde se evalúan como monoterapia o combinados con otros fármacos, y de los que se desprende que, en general, su combinación con inhibidores del proteasoma resulta especialmente prometedora [336, 340]. Otros, sin embargo, todavía están siendo evaluados solos o combinados con otras terapias en fase preclínica, donde algunos están proporcionando buenos resultados [279, 299, 340].

Por otra parte, la inhibición farmacológica de proteínas involucradas en la metilación y ubiquitinación de histonas y en la metilación del DNA, combinada o no con otros agentes, es eficaz en modelos preclínicos de mieloma, e incluso alguno de estos compuestos ha sido evaluado

en ensayos clínicos de fase I en esta enfermedad [279]. Asimismo, la actuación farmacológica sobre los miRNAs en el mieloma todavía se encuentra en la etapa preclínica de estudio [341].

1.5.9.1.7. Trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas

El trasplante autólogo de células madre (ASCT) se adoptó como una terapia de consolidación en el mieloma hace más de dos décadas y, desde entonces, varios ensayos clínicos de fase III han demostrado que mejora la supervivencia general [208]. De hecho, la administración de una terapia inicial seguida del trasplante es el tratamiento estándar de primera línea aplicado en muchos países debido a que se consigue una buena respuesta [239]. No obstante, no todos los pacientes son susceptibles de recibir este tratamiento, sino que son seleccionados en base a diversos criterios [239]. Generalmente, los pacientes beneficiados son los considerados “sanos”, es decir, menores de 65 años o menores de 70 en buen estado clínico [261]. Estos pacientes reciben varios ciclos de una terapia inicial (terapia de inducción) en la que se usan múltiples fármacos y seguidamente se recolectan las células madre hematopoyéticas procedentes de la sangre, que se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso [208, 239, 328]. A continuación, se les administra quimioterapia a dosis altas (mieloablativa, habitualmente melfalán) y, posteriormente, las células madre almacenadas se reintroducen en el torrente sanguíneo [239, 328]. Además, los pacientes reciben lenalidomida como terapia de mantenimiento desde 2017, año en que la FDA aprobó esta pauta de tratamiento tras el ASCT [328].

Si la terapia inicial logra arrancar una buena respuesta, se tiende a retrasar el trasplante hasta la recaída [239]; igualmente, si un primer ASCT ha conseguido una duración de la respuesta inicial de al menos 24 meses, se puede considerar un segundo trasplante [239]. Además, en pacientes de alto riesgo genético podría resultar efectivo un segundo ASCT realizado con una diferencia de 3 a 12 meses con respecto al primero, ya que responden bien al principio, pero recaen tempranamente [239, 328]; no obstante, esta estrategia se asocia con más efectos secundarios [328].

El ASCT ha contribuido a mejorar notablemente la supervivencia de los pacientes de mieloma múltiple, pues la mediana de supervivencia global en pacientes elegibles para el trasplante ronda los 10 años, aproximadamente el doble que la estimada en pacientes no elegibles [239, 328]. Sin embargo, una parte de los pacientes sufren recaídas en el plazo de un año tras el trasplante, lo que dificulta su manejo clínico y, probablemente, reduce su esperanza de vida [342, 343].

1.5.9.1.8. Inmunoterapia: de los anticuerpos monoclonales a la terapia celular adoptiva

Las opciones terapéuticas frente al mieloma han ido mejorando en los últimos años. Con los últimos avances conseguidos comienza una nueva era terapéutica para el mieloma que tiene como

epicentro la inmunoterapia [246]. De hecho, son varios los enfoques que pueden afianzarse en el tratamiento del mieloma múltiple: desde anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del mieloma, pasando por virus oncolíticos y vacunas tumorales, hasta los inhibidores de los puntos de control inmunitarios y la terapia celular adoptiva [246, 344].

1.5.9.1.8.1. Anticuerpos monoclonales y biespecíficos

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos específicos o sobreexpresados en las células tumorales cubren buena parte de la inmunoterapia anti-mieloma actual [345]. La interacción antígeno-anticuerpo conduce a la muerte de las células malignas a través de la ADCC, CDC (citotoxicidad mediada por el complemento) y ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos) [211]. Hasta el momento, daratumumab, elotuzumab e isatuximab son los tres anticuerpos monoclonales que la FDA ha autorizado para combatir el mieloma múltiple avanzado, bien como monoterapia (daratumumab, 2015) o bien combinados con otros tratamientos (elotuzumab, 2015; isatuximab, 2020) [299, 346]. Además, combinaciones basadas en daratumumab han sido aprobadas posteriormente para pacientes con mieloma recidivante o pacientes de nuevo diagnóstico que no pueden ser trasplantados [347].

Elotuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 dirigido contra la glicoproteína de superficie CS1 (o SLAMF7) que ejerce actividad citotóxica sobre las células tumorales y revierte el ambiente inmunosupresor creado por el microentorno celular en la médula ósea [299, 326, 348]. Aunque no es efectivo por sí solo, potencia los efectos de los IMiDs, glucocorticoides e inhibidores del proteasoma en pacientes con mieloma recidivante/refractario [211, 349]. Daratumumab, un anticuerpo monoclonal IgG1κ totalmente humano, tiene como diana la glicoproteína transmembrana CD38 y revierte la actividad inmunosupresora de linfocitos T reguladores CD38⁺, inhibe a las células B plasmáticas y a las células supresoras derivadas de mieloides a la vez que aumenta la población de linfocitos T citotóxicos [211, 246, 326, 349, 350]. Por sí solo ya despliega una potente actividad anti-mieloma pero su combinación con otros fármacos mejora sus beneficios [345]. Isatuximab, por su parte, es un anticuerpo monoclonal quimérico de tipo IgG1 dirigido contra un epítipo particular de CD38 que atenúa el microentorno inmunosupresivo de la médula ósea y es más potente que daratumumab estimulando la apoptosis de manera directa en las células de mieloma que sobreexpresan CD38, aunque también es capaz de involucrar a células del sistema inmune en su acción citotóxica [299, 345, 350]. Además, también puede inducir CDC, ADCC y ADCP y aumentar la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK [299]. Su actividad como agente único es similar a la de daratumumab en el mieloma recidivante/refractario, y combinado con otros agentes también es efectivo, lo que le convierte en una alternativa a daratumumab [248, 345].

La terapia con anticuerpos ha ido un paso más allá al diseñar anticuerpos monoclonales conjugados con una pequeña molécula citotóxica [349, 351]. Estos inmunoconjugados son

reconocidos e internalizados por las células diana, liberándose la fracción citotóxica al citosol, lo que les convierte en agentes quimioterapéuticos dirigidos [351]. Actualmente, aproximadamente una decena de inmunoconjugados se encuentran en estudio, pero solo belantamab mafodotina, un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1, afucosilado, dirigido contra BCMA y conjugado con un inhibidor de la polimerización de la tubulina (MMAF), ha sido autorizado en Europa y Estados Unidos en 2020 para su uso en el mieloma recidivante/refractario tras cuatro líneas de tratamiento, incluido un IMiD y un anticuerpo anti-CD38 [299, 326, 345, 351]. Dada su eficacia como agente único, también se está evaluando su combinación con otras terapias, incluso en etapas tempranas de la enfermedad [349, 351].

Una última estrategia basada en anticuerpos son los anticuerpos biespecíficos (BiTEs). Se trata de fragmentos de anticuerpos recombinantes constituidos por las regiones variables de cadenas pesada y ligera que ponen en contacto a las células tumorales (normalmente a través de BCMA) y los linfocitos T (generalmente a través de CD3) o las células NK, haciendo que las células citotóxicas se activen y destruyan a las tumorales [246, 345]. En la actualidad, hay diversos estudios evaluando varios BiTEs, en los que se comienza a apreciar su actividad como agentes únicos [349].

1.5.9.1.8.2. Terapia celular adoptiva

La terapia celular adoptiva podría considerarse la aproximación inmunoterapéutica más poderosa al poseer potencial curativo [352]. Su cometido es mejorar la actividad antitumoral de células efectoras alogénicas o autólogas mediante manipulaciones *ex vivo* y su posterior reinfusión en los pacientes, los cuales han sido sometidos previamente a tratamientos linfodepletivos para eliminar las células supresoras y facilitar la expansión de las células reinfundidas [344, 352]. Esto se podría conseguir mediante la extracción, activación y expansión, generalmente *ex vivo*, de diferentes subclases de linfocitos (DLIs, TILs, MILs o linfocitos T $\gamma\delta$) y su subsiguiente reinfusión en los pacientes, o a través de la extracción y modificación genética de células efectoras previamente a su activación y expansión *in vitro*, que finalmente son reinfundidas en los pacientes [352]. Las células efectoras empleadas son linfocitos T o células NK que portan receptores de antígenos quiméricos (conocidas como células CAR-T/NK) o linfocitos T con TCRs modificados genéticamente [352]. Ambas estrategias se encuentran bajo estudio clínico en el mieloma, pero aquella que emplea células modificadas genéticamente, concretamente células CAR-T, es la que ha experimentado mayores avances [352, 353].

Los constructos CAR que poseen las células CAR-T/NK las redirigen hacia moléculas de superficie de las células tumorales para que desplieguen su actividad citotóxica contra ellas, sin la restricción de la presentación antigénica mediada por MHC [352]. Los CARs de primera generación solamente contenían el dominio de activación de CD3 ζ , pero los de segunda y tercera

generación poseen además uno o dos dominios coestimuladores (normalmente 4-1BB y/o CD28), respectivamente, que mejoran la señalización, persistencia y eficacia de las células efectoras [352, 354]. La primera evidencia de que esta aproximación terapéutica podía resultar beneficiosa en el tratamiento del mieloma múltiple se obtuvo con células CAR-T dirigidas contra CD19 (CTL019), aunque el origen de su eficacia no está claro dado que las células de mieloma apenas expresan CD19 [352]. Sin embargo, los mejores resultados hasta ahora se han conseguido con células CAR-T dirigidas contra el antígeno BCMA en el mieloma recidivante/refractario [352]. Tal es así que dos de estas terapias, idecabtagene vicleucel y ciltacabtagene autoleucel, han sido aprobadas recientemente para el tratamiento de pacientes con mieloma recidivante/refractario previamente expuestos a cuatro pautas de tratamiento, incluidos un IMiD, un inhibidor del proteasoma y un anticuerpo monoclonal anti-CD38 [353]. No obstante, se están explorando otras potenciales dianas, como CD38, CD138 o SLAMF7 [352]. Por el contrario, el desarrollo de células CAR-NK está menos avanzado, con algunas de ellas dirigidas contra SLAMF7 mostrando actividad anti-mieloma en estudios preclínicos [328, 352]. Por el contrario, los linfocitos T con TCR modificado genéticamente dependen de la presentación antigénica a través del MHC y su eficacia clínica se ve comprometida por diversos factores [352].

1.5.9.1.8.3. Puntos de control inmunitarios, virus oncolíticos y vacunas tumorales

Otros enfoques inmunoterápicos que se encuentran en fases más preliminares de estudio en el mieloma múltiple son los inhibidores de los puntos de control inmunitarios, los virus oncolíticos y las vacunas tumorales [246]. Los primeros son anticuerpos monoclonales que bloquean, bien los receptores que inactivan a las células inmunitarias citotóxicas (entre ellos, PD-1 y CTLA-4), o bien sus respectivos ligandos, expresados en la superficie de las células diana (por ejemplo, PD-L1), lo que promueve la apoptosis de las células tumorales mediada por linfocitos T citotóxicos y células NK [345, 355]. En el mieloma múltiple se han testado más de una decena de inhibidores de este tipo, la mayoría dirigidos contra PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) o PD-L1 (atezolizumab, avelumab, durvalumab), y se ha llegado a la conclusión de que no son efectivos como monoterapia, pero la combinación de alguno de ellos (pembrolizumab) con otros tratamientos (lenalidomida/pomalidomida y dexametasona) parece prometedora [355]. Por su parte, los virus oncolíticos combinados con inhibidores de los puntos de control inmunitarios (anti-PD-L1) han arrojado buenos resultados *in vitro* e *in vivo*, por lo que algunos como reovirus, el virus del sarampión y el de la estomatitis vesicular están siendo estudiados en ensayos clínicos en combinación con inhibidores del proteasoma, agentes alquilantes y fármacos inmunomoduladores [356]. Por último, vacunas idiotípicas y basadas en células dendríticas, antígenos del cáncer de testículo y en el factor GM-CSF no son efectivas como monoterapia en

el mieloma múltiple pero su combinación con terapias inmunomoduladoras podría ser beneficiosa, pues podrían aumentar la probabilidad de respuesta o mejorar su duración [246, 357].

1.5.9.1.9. Nuevos enfoques

El amplio arsenal terapéutico disponible hoy en día ha facilitado la batalla contra el mieloma múltiple. Sin embargo, la recaída de la mayoría de los pacientes parece inevitable y muchos desarrollan una enfermedad refractaria a todas las clases de fármacos, lo que se asocia con un pronóstico adverso [211, 239, 248]. De hecho, la farmacorresistencia es la principal causante de las recaídas y, en consecuencia, encarna uno de los mayores obstáculos en el tratamiento del mieloma múltiple [211, 328]. Por ello, las investigaciones continúan explorando aproximaciones terapéuticas novedosas que permitan vencer definitivamente a la enfermedad.

Una de ellas podrían ser los **inhibidores selectivos de la exportación nuclear (SINEs)** [308]. En el mieloma, las exportinas como XPO1 se encuentran sobreexpresadas, favoreciendo la salida del núcleo al citosol de infinidad de proteínas y mRNAs de oncoproteínas, lo que permite escapar a estas células de la regulación del ciclo celular y de la vigilancia inmunitaria [211]. Selinexor, el primer SINE desarrollado que tiene como diana a XPO1, impide el transporte de estas moléculas y desencadena en última instancia la apoptosis exclusivamente en las células malignas [211, 308]. Su buen rendimiento a nivel preclínico llevó a su aprobación por parte de la FDA y la EMA en 2019 y 2021, respectivamente, para su uso en combinación con dexametasona en pacientes con mieloma avanzado que hayan recibido previamente al menos cuatro líneas de tratamiento y cuya enfermedad sea refractaria a al menos dos inhibidores del proteasoma, dos fármacos inmunomoduladores y un anticuerpo monoclonal anti-CD38 [358, 359]; más adelante, su combinación con bortezomib y dexametasona ha sido autorizada por ambos organismos en pacientes de mieloma que hayan recibido al menos un tratamiento previo [359, 360]. Esta línea de investigación continúa con SINEs de segunda generación como eltanexor, que también ha entrado en ensayos clínicos en el mieloma y produciría menos efectos secundarios [308].

Por otro lado, las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 se encuentran sobreexpresadas en el mieloma, aunque la dependencia para la supervivencia de cada una de ellas es heterogénea entre pacientes [308]. De hecho, aquellos con la translocación t(11;14) poseen niveles elevados de Bcl-2 y bajos de Mcl-1/Bcl-X_L, mientras que muchos pacientes sobreexpresan Mcl-1 [308]. Por ello, la utilización de **miméticos BH3** en estas situaciones podría resultar beneficiosa. Concretamente, venetoclax ha mostrado actividad frente a células de mieloma y se ha evaluado en ensayos clínicos centrados en pacientes con la translocación t(11;14) recidivantes o refractarios, donde está demostrando ser efectivo en monoterapia y en combinación con dexametasona y PIs, ya que se ha visto que ambos potencian la expresión de Bcl-2 y los PIs, además, neutralizan a Mcl-1 [263, 308]. Puesto que la sobreexpresión de Mcl-1 está asociada con

la resistencia a venetoclax, nuevos inhibidores de Mcl-1 están siendo evaluados a nivel preclínico, e incluso algunos como S64315 y AZD5991 se encuentran en las primeras fases de ensayos clínicos [308]. Por tanto, esta relación justificaría la inhibición dual de Bcl-2 y Mcl-1 [308].

La desregulación del ciclo celular es un evento común en las células tumorales humanas, incluido el mieloma múltiple [361]. Por tanto, la **actuación sobre diferentes reguladores del ciclo celular** se postula como una estrategia prometedora. En concreto, inhibidores de la dinámica de los microtúbulos, de proteínas Aurora, CDKs, proteínas motoras, PLK y del complejo APC/C están siendo testados a nivel preclínico, donde algunos han mostrado actividad frente al mieloma y han comenzado a evaluarse clínicamente [361]. Vincristina es el agente anti-microtúbulos más habitual en la terapia anti-mieloma, pero se asocia con el desarrollo de multiresistencias, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevos agentes anti-microtúbulos (5HPP-33, CYT997, etc.) que están siendo estudiados [328, 361]. Por otro lado, puesto que la desregulación de la ciclina D es característica del mieloma múltiple, multitud de pan-inhibidores de CDKs (flavopiridol, dinaciclib, etc.) e inhibidores selectivos de CDK4/6 (por ejemplo, palbociclib) se están testando *in vitro* e *in vivo*, y algunos como dinaciclib y palbociclib han entrado en ensayos clínicos para ser evaluados en solitario o combinados con otras terapias [361, 362]. En la misma situación se encuentran muchos pan-inhibidores de la familia Aurora (VX-680, AT9283, entre otros) e inhibidores de Aurora A (alisertib) [361, 363–365]. Sin embargo, los inhibidores de Aurora B como barasertib solamente han sido evaluados a nivel preclínico en el mieloma [361]. Asimismo, inhibidores de proteínas motoras como Eg5 (filanesib), PLK1 (BI2536) y del complejo APC/C se encuentran bajo estudio preclínico y/o clínico como agentes únicos o combinados con otros tratamientos [328, 361].

Del mismo modo, están emergiendo nuevos fármacos que actúan contra proteínas desreguladas en el mieloma, implicadas en rutas de señalización relacionadas con la diferenciación, supervivencia, proliferación, migración, angiogénesis, apoptosis y el desarrollo de resistencias a fármacos [328]. Incluso algunos de ellos ya se encuentran siendo evaluados en la fase clínica [328].

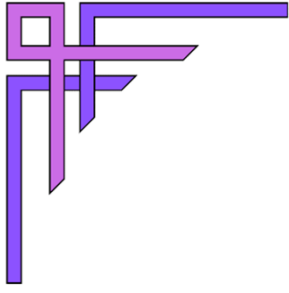
1.5.9.2. Manejo clínico del mieloma múltiple

En la actualidad, solamente los pacientes con mieloma múltiple activo reciben tratamiento, mientras que aquellos con MGUS y SMM son monitorizados y solo son tratados cuando la enfermedad se torna sintomática [210, 261]. Sin embargo, hay datos que avalan que el tratamiento temprano de estos estados pre-malignos puede alterar la historia natural de la enfermedad y mejorar la supervivencia [260].

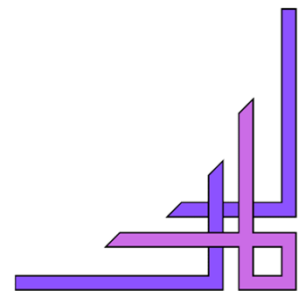
Los pacientes de nuevo diagnóstico reciben una primera terapia de inducción, seguida o no de ASCT, y tratamiento de consolidación y/o mantenimiento [366]. En cambio, para el mieloma

recidivante/refractario no existe un tratamiento de referencia establecido, sino que en estos casos la elección de la terapia se hace teniendo en cuenta factores relativos al paciente, la enfermedad y los tratamientos previos, así como cuestiones económicas y de disponibilidad, con el objetivo de conseguir una remisión de la enfermedad lo más duradera posible [239, 366]. Por tanto, en este contexto, la evaluación en ensayos clínicos de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos en pacientes con enfermedad avanzada y pésimo pronóstico está justificada [239].

Un aspecto importante en el manejo clínico del mieloma múltiple son los cuidados paliativos, los cuales intentan prevenir y aliviar los síntomas derivados de la progresión de la enfermedad y de los tratamientos, y conseguir mejorar así la calidad de vida de los pacientes [208]. Las complicaciones a las que suelen enfrentarse los pacientes son enfermedad ósea, infecciones, enfermedad cardiovascular y tromboembólica, neuropatía periférica e insuficiencia renal [239]. Los bisfosfonatos y denosumab consiguen prevenir las lesiones óseas, mientras que la radioterapia local puede ayudar a mitigar el dolor, y la cirugía repara o previene fracturas [239]. La profilaxis antimicrobiana frente a bacterias, virus y hongos debe valorarse ante la alta susceptibilidad de los pacientes a sufrir infecciones durante el transcurso de la enfermedad y como consecuencia de algunos tratamientos [210, 239]. También la tromboprofilaxis es altamente recomendable si se administran IMiDs. La intervención farmacológica para tratar la neuropatía periférica puede realizarse, aunque cuando está vinculada a talidomida y bortezomib, basta con modificar la práctica clínica sustituyéndolos por otros inhibidores de su misma clase [239]. En el caso de pacientes con insuficiencia renal aguda, el tratamiento debe iniciarse de inmediato, preferiblemente con bortezomib o melfalán/lenalidomida a dosis bajas [239]. Por otro lado, los pacientes con trastornos cardiovasculares derivados de ciertas terapias o causados por el avance de la enfermedad deben ser estrechamente vigilados, pues no existe una estrategia preventiva a seguir [239, 367].



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



2. Antecedentes y objetivos

A pesar de la creencia popular de que el cáncer es una única enfermedad, lo cierto es que con esta denominación nos referimos a un grupo de más de un centenar de enfermedades diferentes, caracterizadas por el crecimiento desmedido de células anómalas en prácticamente cualquier órgano o tejido y su propagación descontrolada hacia otras localizaciones, lo que puede acarrear la muerte si no se combate [368–370]. De hecho, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, con alrededor de 10 millones de decesos en 2020, superado solamente por las enfermedades cardiovasculares [371, 372].

Dentro de la gran variedad de tipos de cáncer que pueden desarrollarse, estos pueden catalogarse en dos grandes grupos: cánceres sanguíneos y tumores sólidos [373]. Los cánceres sanguíneos, también conocidos como tumores hematológicos o tumores líquidos, afectan a las células de la sangre, mientras que los tumores sólidos forman uno o varios focos neoplásicos en cualquier órgano o tejido del organismo [373, 374].

De entre todos los tipos de tumores que se conocen, en esta tesis se han estudiado cuatro: los cánceres de pulmón, colon, páncreas y, especialmente, el mieloma múltiple. En el año 2020, los cánceres de pulmón y colorrectal fueron el segundo y el tercer tipo de cáncer más común en lo que a nuevos casos se refiere a nivel mundial, respectivamente, y también fueron los tumores más letales ese año [371]. El cáncer de páncreas, en cambio, tiene una prevalencia menor que los anteriores, y aunque en 2018 fue el undécimo tipo de cáncer más común en el mundo, hoy en día se le considera uno de los más letales, ya que no suele manifestar síntomas hasta estadios avanzados y la quimioterapia es muy poco eficaz [375, 376]. El mieloma múltiple, por su parte, representa el 1 % de todos los cánceres y alrededor del 10 % de todas las neoplasias hematológicas, lo que le convierte en el segundo cáncer sanguíneo más frecuente [211, 377]. Caracterizado por una excesiva proliferación de células plasmáticas clonales que se infiltran en la médula ósea y por la secreción de grandes cantidades de una inmunoglobulina monoclonal, denominada proteína M, el mieloma múltiple es una enfermedad bastante compleja y heterogénea debido a su elevada inestabilidad genética [208, 210, 211]. De hecho, la acumulación de aberraciones genéticas se asocia con la progresión y la agresividad de la enfermedad, así como con la falta de respuesta a los tratamientos actuales [211].

La terapia antitumoral convencional comprende el uso individual o combinado de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia [378]. La quimioterapia en particular ha constituido durante mucho tiempo la principal arma terapéutica para combatir el cáncer, pero su incapacidad para discernir entre células normales y tumorales conlleva importantes efectos secundarios y toxicidades [379]. Esto ha hecho que, en las dos últimas décadas, el enfoque terapéutico haya evolucionado hacia el uso de fármacos dirigidos, ya que estos atacan específicamente a las células

malignas y, de esta forma, se consigue mejorar la eficacia del tratamiento y reducir la toxicidad [379].

La terapia del mieloma múltiple se ha beneficiado de este nuevo enfoque terapéutico al incorporar a los inhibidores del proteasoma, los fármacos inmunomoduladores (IMiDs), los inhibidores de histona deacetilasas y los anticuerpos monoclonales a la pauta de tratamiento de la enfermedad [380]. No obstante, la aparición de las recaídas y el desarrollo de resistencias terapéuticas en los pacientes agravan el pronóstico de la enfermedad y conducen a su incurabilidad [302, 381]. En el caso de los cánceres de colon, pulmón y páncreas, la aprobación por parte de los organismos reguladores de inhibidores de EGFR, PARP, algunas quinasas y puntos de control inmunitarios, entre otros, ha mejorado la supervivencia de los pacientes con estas enfermedades, pero los datos demuestran que no es suficiente [382–385]. Por tanto, el panorama actual en estos tipos de cáncer incita a encontrar nuevas estrategias que mejoren el desenlace de estas enfermedades.

Una de las familias de fármacos cuyo diseño ha virado hacia un enfoque dirigido han sido los antimitóticos. Dado que una de las principales características del cáncer es su elevada capacidad proliferativa, estos compuestos tratan de neutralizar dicha capacidad actuando sobre la maquinaria mitótica [181]. La diana de los primeros fármacos de este tipo fueron los microtúbulos, pues su polimerización y despolimerización resultan vitales para la correcta formación del huso mitótico y la segregación cromosómica durante la mitosis [181]. El bloqueo de su dinámica provoca fallos en las estructuras del huso mitótico que retrasan la progresión de la división celular o impiden su salida de la mitosis, causando la muerte de las células [181, 185]. Tradicionalmente, los agentes anti-microtúbulos se clasifican en estabilizadores del huso, como los taxanos, y desestabilizadores, como los alcaloides de la vinca [181]. Ambos tipos de compuestos son ampliamente utilizados en la clínica en solitario o combinados con otras terapias y continúan siendo evaluados en estudios preclínicos/clínicos, demostrando su eficacia en múltiples tipos de cáncer [386–393]. No obstante, los microtúbulos desempeñan otras funciones fuera de la mitosis, ya que, como elemento fundamental del citoesqueleto, regulan acciones como el transporte intracelular, la motilidad y la señalización celulares [156]. Por tanto, los agentes anti-microtúbulos también atacan a células en interfase, lo que explicaría los graves efectos secundarios que llevan asociados, tales como neurotoxicidad y neutropenia [156, 177]. Este tipo de compuestos son efectivos tanto en tumores sólidos como sanguíneos, pero presentan importantes efectos adversos y las células tumorales pueden acabar desarrollando resistencias a los mismos [156]. Por ello, los esfuerzos de los últimos años se han centrado en superar dichos inconvenientes, ya sea mediante la obtención de nuevos agentes anti-microtúbulos o de compuestos dirigidos contra moléculas que controlan la mitosis o la progresión de la fase M del ciclo celular [156, 394]. Dentro de las nuevas dianas mitóticas se encuentran las proteínas Aurora,

una familia de serín/treonín quinasas que en los mamíferos consta de tres miembros (Aurora A, Aurora B y Aurora C) [156]. Mientras que Aurora A orquesta la entrada en mitosis, la maduración de los centrosomas y la formación del huso mitótico, Aurora B se encarga de garantizar una adecuada segregación cromosómica y controlar la citoquinesis; Aurora C, por su parte, es clave en la espermatogénesis y su función durante la mitosis se solapa con la de Aurora B. [181, 192].

Hasta ahora se han sintetizado más de una quincena de compuestos que compiten por el sitio de unión a ATP de estas proteínas y, si bien algunos de ellos inhiben simultáneamente a Aurora A y B o a todos los miembros de la familia, otros bloquean específicamente a Aurora A o B [156]. A este último grupo pertenecen alisertib (MLN8237) y barasertib (AZD1152), inhibidores selectivos de las quinasas Aurora A y B, respectivamente, que originan fallos en la mitosis y la citoquinesis que pueden desembocar en aneuploidía, poliploidía, senescencia y muerte celular [156, 181, 199, 205]. Pese a que los cánceres sanguíneos responden mejor que los tumores sólidos a este tipo de compuestos, alisertib y barasertib se han mostrado activos frente a ambos tipos de cáncer a nivel preclínico, lo que ha permitido su evaluación en ensayos clínicos en todo tipo de tumores, ya sea como monoterapia o combinados con otros agentes anti-neoplásicos [197, 200–202, 205, 364, 395–399]. Sin embargo, factores como la escasa eficacia exhibida por ambos inhibidores en los ensayos clínicos impiden su aprobación para el uso en pacientes [365, 400].

Otra diana terapéutica atractiva en el cáncer es la familia de proteínas Bcl-2, que regula la inducción de la apoptosis a través de la vía intrínseca [401]. Las interacciones entre los miembros anti-apoptóticos, pro-apoptóticos multidominio y “solo-BH3” deciden el destino de las células a favor de su supervivencia o muerte [401]. Además, tanto la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas como la baja expresión de las pro-apoptóticas fomentan el desarrollo tumoral y la resistencia al tratamiento [401]. En el caso de los tumores sólidos es frecuente la sobreexpresión de Bcl-X_L y/o Mcl-1, mientras que en el mieloma múltiple se han descrito niveles elevados de las tres principales proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1) en función del subtipo estudiado [402–406].

En este contexto se han desarrollado los denominados miméticos BH3, unas pequeñas moléculas que buscan emular la actividad pro-apoptótica de las proteínas “solo-BH3”, uniéndose y neutralizando a los miembros anti-apoptóticos de la familia [94]. El primer mimético BH3 validado fue ABT-737, dirigido contra Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w, aunque fue ABT-263 (navitoclax), un análogo oral con idénticas dianas, similar eficacia y mejores propiedades farmacológicas, el primer compuesto de este tipo en alcanzar la fase clínica [95, 97]. Sin embargo, la trombocitopenia inducida por ambos compuestos al inhibir Bcl-X_L supuso un importante factor limitante para el uso de ABT-263 en la clínica [94, 97]. El desarrollo de ABT-199 (venetoclax) solventó este efecto adverso al inhibir específicamente a Bcl-2, y los buenos resultados obtenidos en solitario o combinado con otros agentes en la CLL, el SLL y la AML condujeron a su

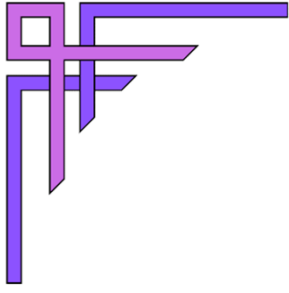
aprobación por los organismos reguladores para el tratamiento de estas neoplasias hematológicas [94, 104, 105]. Otros miméticos BH3 novedosos, entre los que se incluyen WEHI-539, A-1155463 y A-1331852, están dirigidos selectivamente contra Bcl-X_L, siendo A-1331852 el inhibidor más potente obtenido hasta el momento [65]. No obstante, pese a que todos ellos son activos frente a tumores sólidos y sanguíneos en ensayos preclínicos, la toxicidad que despliegan sobre las plaquetas dificulta por el momento su utilización en ensayos clínicos [40, 107]. Finalmente, la obtención de antagonistas de Mcl-1 ha sido más lenta debido a factores limitantes como las particularidades estructurales que presenta esta proteína o efectos tóxicos asociados a su inhibición [93, 94, 107]. Pese a todo, compuestos como A-1210477, S63845, S64315 y AMG-176 han resultado efectivos a nivel preclínico en distintos tipos de tumores, por lo que algunos de ellos están siendo evaluados en ensayos clínicos [93, 95, 102, 106, 115]. Excepto en algunos cánceres de la sangre como la neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN) y la CLL, la actividad antitumoral mostrada por los miméticos BH3 en ensayos clínicos ha sido más bien modesta, pero su combinación con otros agentes terapéuticos mejora la respuesta antitumoral tanto a nivel preclínico como en ensayos clínicos [407].

Además de los fármacos antimetabólicos y los miméticos BH3, existen otras familias de compuestos con potencial aplicación en la terapia antitumoral, entre las que se incluyen los inhibidores de la chaperona Hsp90, inhibidores de CDKs, inhibidores de histona deacetilasas e inhibidores metabólicos. Todos ellos han demostrado ser efectivos en ensayos *in vitro* e *in vivo*, así como en ensayos clínicos, frente a cánceres de distinta naturaleza, incluido el mieloma múltiple, aunque el beneficio terapéutico aportado por estos compuestos suele ser mayor cuando se combinan con otros tratamientos [408–417].

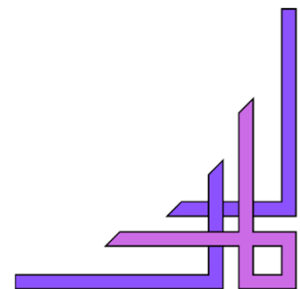
El grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer” posee amplia experiencia en el estudio de la mayoría de estos compuestos en diversos modelos tumorales, incluidos los empleados a lo largo de esta tesis. Varios de sus trabajos han desvelado que los fármacos antimetabólicos, los miméticos BH3, el inhibidor de CDKs dinaciclib y los inhibidores metabólicos dicloroacetato (DCA) y metformina exhiben diferentes grados de toxicidad en monoterapia en un amplio panel de células de tumores sólidos y sanguíneos y en muestras de pacientes *ex vivo* de diferentes neoplasias hematológicas [418–434]. Además, su combinación entre sí o con otros agentes antitumorales produce en algunos casos un efecto sinérgico o aditivo [418, 420–425, 428–431, 433, 434]. En cambio, en un modelo *in vivo* de mieloma múltiple, la combinación de miméticos BH3 con el inhibidor del proteasoma ixazomib no supuso una ventaja terapéutica comparado con la administración de cada compuesto por separado [421]. Por otro lado, algunos de sus estudios han demostrado que el inhibidor de la quinasa Aurora B barasertib detiene el ciclo celular e induce senescencia en células de cáncer de pulmón y de colon [418, 425, 426].

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, en esta tesis hemos querido profundizar en el mecanismo de acción de los miméticos BH3 y los inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma múltiple. Por otro lado, se ha examinado el potencial terapéutico de fármacos antimitóticos, miméticos BH3 e inhibidores de Hsp90 en células de tumores sólidos y de mieloma múltiple cuando actúan en solitario y, además, se ha evaluado la eficacia de la combinación de los miméticos BH3 con fármacos antimitóticos e inhibidores de Hsp90 en ambos tipos de tumores, y la de la combinación de inhibidores de Aurora quinasa entre sí o con dinaciclib, panobinostat y los inhibidores metabólicos en el mieloma múltiple (estructuras químicas en Anexo I). En concreto, los objetivos específicos abordados en este trabajo han sido los siguientes:

1. Determinar la sensibilidad de líneas celulares de tumores sólidos y de mieloma múltiple a miméticos BH3 (ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845), inhibidores de Hsp90 (17-AAG y KW-2478) e inhibidores de Aurora quinasa (alisertib y barasertib).
2. Profundizar en el mecanismo de acción de distintas familias de agentes anti-neoplásicos. En particular:
 - 2.1. Evaluar el papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte desencadenada por fármacos antimitóticos (vincristina, docetaxel, alisertib y barasertib) y los miméticos BH3 en células de mieloma múltiple.
 - 2.2. Determinar la implicación de las mitocondrias, las caspasas, la necroptosis y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el mecanismo de muerte inducido por los inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma, así como estudiar la implicación de la vía apoptótica extrínseca en la muerte provocada por los inhibidores de Hsp90 en dicha enfermedad.
 - 2.3. Analizar el efecto de los inhibidores de Hsp90, miméticos BH3 e inhibidores de Aurora quinasa en el ciclo celular de células tumorales de pulmón y de mieloma múltiple.
 - 2.4. Analizar el efecto de los inhibidores de Aurora quinasa en la expresión de proteínas reguladoras de la mitosis en células de mieloma múltiple.
 - 2.5. Estudiar la activación de la autofagia en células de carcinoma de pulmón y de mieloma múltiple expuestas a los miméticos BH3 y los inhibidores de Aurora quinasa.
 - 2.6. Evaluar la senescencia inducida en células tumorales pancreáticas y de mieloma por la acción de los inhibidores de Aurora quinasa y estudiar el efecto de los miméticos BH3 en células tumorales senescentes de pulmón y de páncreas.
3. Explorar nuevas estrategias combinatorias basadas en la combinación de fármacos con distintos mecanismos de acción (miméticos BH3, fármacos antimitóticos, inhibidores de Hsp90, dinaciclib, panobinostat, DCA y metformina) en células de tumores sólidos y de mieloma múltiple.



MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y métodos

3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares de mieloma múltiple NCI-H929 y U266 fueron cedidas por el Dr. Antonio Campos Caro (Hospital Puerta del Mar, Cádiz); la línea celular RPMI 8226 fue cedida por la Dra. Martine Amiot (CRCINA, Nantes); y las líneas celulares MM.1S y OPM-2 se obtuvieron de la ATCC (Virginia, Estados Unidos) y del DSMZ (Alemania), respectivamente (Tabla 3.1). Las líneas cedidas fueron verificadas mediante análisis de STR (del inglés, *short tandem repeat*). Por otra parte, la línea celular de leucemia pro-monocítica humana U937 fue cedida por el Dr. Jeremy Brock (Universidad de Glasgow, Reino Unido) (Tabla 3.1). Finalmente, la línea celular A549, derivada de un adenocarcinoma de pulmón, fue adquirida de la ATCC; la línea MIA PaCa-2, procedente de un adenocarcinoma de páncreas, fue cedida por el Dr. Guillermo Velasco (Universidad Complutense de Madrid, Madrid); y la línea celular HCT-116, proveniente de un carcinoma de colon, fue cedida por el Dr. Christopher Börner (*Institute of Molecular Medicine and Cell Research*, Universidad de Freiburg, Alemania) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 | Líneas celulares *wild-type* utilizadas.

Línea celular	Código de acceso (RRID)	Descripción
A549	CVCL_0023	Carcinoma de pulmón humano
MIA PaCa-2	CVCL_0428	Carcinoma de páncreas humano
HCT-116	CVCL_0291	Carcinoma de colon humano
NCI-H929	CVCL_1600	Plasmacitoma/mieloma humano (IgA-kappa) procedente de médula ósea
MM.1S	CVCL_8792	Mieloma humano (IgA-lambda) procedente de sangre periférica
U266	CVCL_0566	Mieloma/plasmacitoma humano (IgE; cadena ligera lambda) procedente de sangre periférica
RPMI 8226	CVCL_0014	Plasmacitoma/mieloma humano (cadena ligera lambda) procedente de sangre periférica
OPM-2	CVCL_1625	Mieloma múltiple humano (IgG lambda) procedente de sangre periférica
U937	CVCL_0007	Linfoma histiocítico humano pro-monocítico procedente de un derrame pleural (AML)

A partir de las cinco líneas celulares de mieloma *wild-type* se han ido generando en nuestro laboratorio una amplia variedad de sublíneas (Tabla 3.2) empleando diferentes técnicas. Las sublíneas RPMI 8226 que sobreexpresan las proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L y Mcl-1 se generaron mediante infección retroviral con los plásmidos MMP1-AU1-Bcl-X_L y pLZR-IRES-GFP-Mcl-1, respectivamente, según se ha descrito anteriormente [435–437]. Las

sublíneas NCI-H929, MM.1S, U266 y RPMI 8226 BimKO, así como las sublíneas MM.1S BaxKO, BakKO y DKO fueron generadas mediante la técnica CRISPR-Cas9 con el plásmido pLenti CRISPR V2; y la sublínea OPM-2 shBim fue generada mediante silenciamiento de RNA con el plásmido pLVTHM. Todas ellas se obtuvieron según lo descrito por *Bauer et al.* [438]. Por otro lado, la sublínea U937 ρ^0 , derivada de las células U937 y que carece de DNA mitocondrial, se obtuvo en nuestro laboratorio mediante la exposición prolongada a bajas concentraciones de bromuro de etidio, comprobando mediante PCR que las células habían perdido el DNA mitocondrial [439] (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 | Líneas celulares modificadas utilizadas.

Línea celular	Descripción
NCI-H929 ϕ C1	NCI-H929 pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 1
NCI-H929 ϕ C2	NCI-H929 pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 2
NCI-H929 BimKO C3	NCI-H929 <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 3
NCI-H929 BimKO C4	NCI-H929 <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 4
MM.1S ϕ C1	MM.1S pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 1
MM.1S ϕ C2	MM.1S pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 2
MM.1S BimKO C1	MM.1S <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 1
MM.1S BimKO C2	MM.1S <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 2
MM.1S BaxKO	MM.1S <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bax
MM.1S BakKO	MM.1S <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bak
MM.1S DKO	MM.1S <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bax y Bak
U266 ϕ C3	U266 pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 3
U266 BimKO C2	U266 <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 2
RPMI 8226 ϕ C1	RPMI 8226 pLenti CRISPR V2 vector vacío, clon 1
RPMI 8226 BimKO C6	RPMI 8226 <i>knockout</i> por CRISPR-Cas9 para Bim, clon 6
RPMI 8226 pLZR	RPMI 8226 pLZR vector vacío
RPMI 8226 Bcl-X _L	RPMI 8226 que sobreexpresan Bcl-X _L
RPMI 8226 Mcl-1	RPMI 8226 que sobreexpresan Mcl-1
OPM-2 pLVTHM C3	OPM-2 pLVTHM vector vacío, clon 3
OPM-2 shBim D5	OPM-2 silenciada mediante shRNA para Bim, clon D5
U937 ρ^0	U937 desprovistas de DNA mitocondrial

3.1.2. Material utilizado para el cultivo celular

El cultivo de las líneas celulares derivadas de tumores sólidos se realizó en medio DMEM completo, mientras que las líneas provenientes de tumores hematológicos se cultivaron en medio RPMI 1640 completo. Estos consistían en medio DMEM y RPMI 1640 comercial que ya llevaban incorporada L-alanil-L-glutamina (GlutaMAX™) (Gibco) y que fueron suplementados con suero fetal bovino (Gibco o Sigma-Aldrich) al 5 % (DMEM) o 10 % (RPMI 1640) (v/v) y una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (PAN-Biotech). No obstante, el cultivo de las líneas celulares RPMI 8226 y U937 ρ^0 conllevaba ciertas particularidades, ya que las células RPMI 8226 se cultivaron con medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino previamente decomplementado (calentado a 56 °C durante 30 minutos para inactivar los componentes termolábiles del sistema del complemento) y en ausencia de antibiótico, y las células U937 ρ^0 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 que, además de contener suero fetal bovino al 10 % y la mezcla de antibióticos, se suplementó con glucosa (2,5 mg/ml) (concentración final de glucosa: 4,5 mg/ml), piruvato (100 µg/ml) y uridina (50 µg/ml) dado que la glucólisis resulta crítica para su supervivencia [439, 440]. Además, puesto que las células de mieloma son muy sensibles a las fluctuaciones en las condiciones de cultivo, cuando la viabilidad celular, detectada por citometría de flujo, fue inferior al 80 %, las células se centrifugaron a 115 xg (*Allegra® X-15R Centrifuge*, [Beckman Coulter]) durante 5 minutos y se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo con un porcentaje superior de suero (15 %) o en una mezcla de 5 % de suero fetal bovino, 30 % de medio condicionado filtrado de la línea celular en cuestión y 65 % de medio RPMI 1640 completo.

Los frascos de cultivo de 25 cm² y 75 cm², los rascadores de 24 cm utilizados para levantar las células de mieloma adheridas al fondo de los frascos, las placas de Petri de 60.1 cm² y las placas de 96 pocillos de fondo redondo se adquirieron de TPP. Las pipetas de 5, 10 y 25 ml, los tubos de fondo cónico de 15 y 50 ml y los tubos para citometría de flujo fueron suministrados por Corning™. Las placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos de fondo plano se obtuvieron de las casas comerciales citadas. Los microtubos de 1,5 ml (de ahora en adelante, tubos Eppendorf) se adquirieron de Deltalab. Los tubos criogénicos utilizados para la criopreservación de las células fueron proporcionados por Nunc. El azul Trypan y el dimetilsulfóxido (DMSO) utilizados para el recuento celular y para reconstituir los compuestos utilizados o criopreservar las células, respectivamente, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Las puntas de micropipeta, los tubos Eppendorf y el material de vidrio utilizados en la manipulación de las células se esterilizaron previamente en autoclaves (Autester Mod 437 G o Presoclave 75, Selecta) durante 20 minutos a 1 atm de presión. Las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron, bien en autoclaves, o bien por filtración, utilizando filtros de 0,22 µm de

tamaño de poro y 25 mm de diámetro (Acrodisc®, *Pall Corporation*) y jeringuillas acopladas a estos filtros (Terumo™, *Fisher Scientific*).

3.1.3. Mantenimiento de los cultivos celulares

La manipulación de las líneas celulares se realizó en campana de flujo laminar vertical (Bio-II-A/P, *Telstar*), manteniendo las condiciones de esterilidad, y los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado (Heraeus Heracell 150i, *Thermo Fisher Scientific*) a 37 °C, con un 5 % de CO₂ y aire saturado de humedad. Todos los cultivos se observaron diariamente al microscopio invertido (Eclipse TE300 o Eclipse Ts2, *Nikon*) para controlar su morfología y crecimiento, así como para detectar posibles contaminaciones.

Se realizaron subcultivos de manera rutinaria en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² (volumen final de 5-15 ml y 20-40 ml, respectivamente, en función del tipo celular) una vez que los cultivos alcanzaban la fase de confluencia. Las células en suspensión alcanzan dicho estado cuando su densidad celular oscila entre 8·10⁵ y 10⁶ células/ml, mientras que las células adherentes llegan a esta fase cuando su densidad es, aproximadamente, de 10⁵ células/cm². Para establecer subcultivos, las células adherentes se trataron con el volumen necesario de una preparación comercial de tripsina/EDTA (*PAN-Biotech*, Anexo II) para cubrir la monocapa celular y se mantuvieron de 5 a 10 minutos en el incubador termostatzado. Tras este tiempo, las células se observaron en el microscopio invertido y, si estas se habían despegado del fondo del frasco, se les añadía el medio completo correspondiente para neutralizar la acción de la tripsina. Finalmente, se determinaron la densidad (nº de células viables/ml) y viabilidad (nº células viables/nº células totales) celulares y se iniciaron nuevos subcultivos con 2·10⁵ o 5·10⁵ células totales en función del tamaño del frasco de cultivo y del tiempo estimado para realizar el siguiente pase. Por su parte, el mantenimiento de las células en suspensión únicamente requirió la determinación de la densidad y viabilidad de los cultivos para el establecimiento de nuevos subcultivos con densidades de entre 10⁵ y 3·10⁵ células/ml, dependiendo también del tamaño del frasco y del tiempo previsto para el siguiente pase. Independientemente del tipo celular, la densidad y viabilidad celulares se determinaron mediante recuento con azul Trypan (Anexo II) en un hemocitómetro bajo el microscopio óptico.

3.1.4. Test de micoplasmas

La posible contaminación de los cultivos por micoplasmas se analizó de manera periódica mediante los kits comerciales *Mycoplasma Gel Detection Kit* (*Biotoools*) o *MycoStrip*TM (*InvivoGen*) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El primero de ellos se basa en la amplificación por PCR convencional de una región conservada del RNA ribosómico 16S de múltiples especies contaminantes de micoplasmas y el análisis posterior mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, mientras que el segundo se vale de la PCR isotérmica para amplificar

el gen del RNA ribosómico 16S y la inmunocromatografía para visualizar los resultados. En aquellos casos en los que se detectó contaminación y no se disponía de células criopreservadas para iniciar nuevos cultivos, las células se trataron con el kit de descontaminación *BM-Cyclin* (Roche) según las indicaciones del fabricante.

3.1.5. Criopreservación de las líneas celulares

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido y se descongelaron cuando fue necesario. Para la criopreservación se dispusieron $6 \cdot 10^6$ células totales de cada línea celular en suspensión y $4 \cdot 10^6$ células totales de las células adherentes en tubos de fondo cónico, que se centrifugaron a 235-335 xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes se desecharon y el precipitado celular se resuspendió en 800 µl de una mezcla compuesta por un 50 % de suero fetal bovino, un 40 % de medio RPMI 1640 completo y un 10 % de DMSO (crioprotector que ayuda a minimizar el daño celular ocasionado durante la congelación) en el caso de las células de origen hematopoyético; por su parte, las células adherentes se resuspendieron en 800 µl de medio DMEM completo suplementado con un 10 % de DMSO. Cada suspensión celular se trasvasó a un vial de congelación, que se guardó rápidamente en un congelador a -80 °C durante al menos 24 horas y, transcurrido este tiempo, los criotubos se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido (-196 °C), en el que permanecieron hasta su descongelación.

Por su parte, la descongelación celular se realizó añadiendo lentamente a los criotubos pequeños volúmenes de medio RPMI 1640 o DMEM completo a partir de 10 ml previamente preparados en un tubo de fondo cónico hasta descongelar completamente su contenido, con el fin de diluir el DMSO. Las células se centrifugaron a 115-235 xg durante 5 minutos, los sobrenadantes se eliminaron y los pellets se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM completo en el caso de las células adherentes o en 10 ml de medio RPMI 1640 completo suplementado con un 5-15 % extra de suero fetal bovino en el caso de las células de mieloma o de AML. Así, con estas suspensiones celulares se iniciaron nuevos cultivos en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm².

3.2. Estudio de la proliferación, muerte celular y autofagia

3.2.1. Determinación de la proliferación celular mediante ensayo de reducción del MTT

Uno de los pilares de los estudios en biología celular es la determinación de la sensibilidad celular a distintos tipos de estrés, incluidos los nuevos fármacos antitumorales, con la que se pretende cuantificar la viabilidad y la proliferación celulares e incluso el nivel de activación celular en dichas situaciones [441, 442]. Con este fin se han utilizado inicialmente técnicas como el recuento de células o núcleos celulares o las que se basan en isótopos radiactivos, como la

liberación de proteínas marcadas con ^{51}Cr tras la lisis de las células o la incorporación de nucleótidos como $[^3\text{H}]$ timidina mientras las células se encuentran en la fase de crecimiento [443]. Sin embargo, estas metodologías requieren mucho trabajo y tiempo, implican grandes costes económicos, generan residuos que son difíciles de manipular y/o eliminar y no son adecuadas para el procesamiento de un número elevado de muestras [441, 444]. Por esta razón, han surgido otras alternativas, como los ensayos colorimétricos, que solventan las limitaciones de los ensayos tradicionales [441].

Uno de los ensayos colorimétricos más habituales es el ensayo de reducción del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], desarrollado inicialmente por Tim Mosmann en 1983 y modificado posteriormente por numerosos autores [441, 445–448]. Esta sal de tetrazolio presenta un color amarillo en solución acuosa pero en el interior de las células es reducida por deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H localizadas en el citoplasma y asociadas al retículo endoplásmico, endosomas/lisosomas y a la membrana plasmática, generando cristales de formazán [(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán] de color púrpura-azul que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos, incluidos diferentes alcoholes y aceite mineral, aunque el DMSO se ha descrito como el disolvente óptimo [442, 443, 445, 448, 449]. Una vez solubilizados los cristales, es posible determinar variaciones en la viabilidad o proliferación de las células de manera cuantitativa al medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de entre 540 y 600 nm, ya que existe una relación lineal entre el color generado y la actividad metabólica de las células [442, 443, 445, 449, 450]. Así, las células sanas y en crecimiento exponencial reducen activamente el MTT, a diferencia de las células muertas o inactivas, que no pueden metabolizarlo [449].

La simplicidad, precisión y rapidez, su bajo coste y su carácter cuantitativo, la seguridad que ofrece frente al uso de radioisótopos y la posibilidad de procesar un gran número de muestras hacen que esta técnica sea una referencia a nivel preclínico para el estudio del potencial antitumoral de nuevos fármacos y sus combinaciones con otros compuestos [443, 445, 451].

En concreto, esta técnica se ha utilizado en esta tesis para evaluar el efecto de los miméticos BH3 (concretamente, ABT-199, ABT-737, A-1155463 y S63845, *MedChemExpress*) en células MIA PaCa-2 senescentes a consecuencia de su exposición a barasertib (*MedChemExpress*), y de alisertib (*MedChemExpress*) y barasertib en las líneas celulares *wild-type* de mieloma múltiple a diferentes tiempos. En todos los casos la siembra se realizó en 100 μl del medio completo correspondiente en placas de 96 pocillos de fondo plano al menos por cuadruplicado. Las células adherentes se sembraron en medio DMEM completo suplementado al 10 % con suero fetal bovino y a una densidad de 10^5 células/ml para inducir senescencia y de 10^4 células/ml en los controles y en tratamientos con los miméticos BH3. Tras cultivar las células durante 24 horas se les añadió barasertib cuando correspondiera a una concentración final de 5 μM y este se dejó actuar durante

48 horas. Tras este tiempo, el medio se reemplazó por 100 μl de medio fresco, las células se mantuvieron en cultivo durante cinco días más y, finalmente, se añadieron los miméticos BH3 a dosis subletales, los cuales se incubaron durante 48 horas adicionales. Por otro lado, las células de mieloma se sembraron a una densidad de entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml y se expusieron a concentraciones crecientes de los compuestos (0-5 μM) durante 24-72 horas. Concluidos los tratamientos en todas las líneas celulares, se adicionaron 10 μl de una disolución de MTT (5 mg/ml) (Anexo II) a cada pocillo y las placas se incubaron dos horas a 37 °C, tiempo tras el cual los cristales se hicieron visibles. Seguidamente, las placas que contenían las células de mieloma se centrifugaron a 3720 xg durante 20 minutos, se retiraron 50 μl de sobrenadante de cada pocillo para reducir las interacciones del disolvente orgánico con el medio y favorecer así la disolución de los cristales, y se añadieron 100 μl de una solución de isopropanol/HCl 0,05 M. En cambio, en el caso de las células MIA PaCa-2, el sobrenadante se eliminó al completo y se adicionaron 100 μl de DMSO. Los cristales de cada pocillo se resuspendieron para favorecer su disolución y estos terminaron de disolverse en un agitador de placas (*Bioblock*). Finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan EX, *Thermo Scientific*).

3.2.2. Análisis de la muerte inducida por citometría de flujo mediante (doble) marcaje con Anexina V (y 7-AAD)

Uno de los eventos iniciales que tienen lugar cuando las células entran en apoptosis es la exposición de los residuos de fosfatidilserina (PS) desde la semicapa interna a la externa de la membrana plasmática, lo que altera su asimetría, aunque su integridad se conserva [452]. La PS es reconocida *in vivo* por células fagocíticas, que eliminan rápidamente las células apoptóticas [8, 453]; sin embargo, este fenómeno puede ser detectado *in vitro* mediante el uso de Anexina V, una proteína que se une específicamente y con gran afinidad a la PS en presencia de calcio y que puede conjugarse con diferentes fluoróforos [452]. Concretamente, en el presente trabajo se ha utilizado Anexina V recombinante unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC; $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm) o DY634 ($\lambda_{\text{ex}} = 635$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 658$ nm) (*Immunostep*), las cuales han sido generadas en el laboratorio siguiendo las indicaciones y el protocolo descrito por *Logue et al.* y *Dyomics GmbH* [454, 455].

In vitro, las células apoptóticas no están expuestas a los macrófagos y, en consecuencia, no son fagocitadas, lo que les permite alcanzar la fase tardía de la apoptosis (necrosis secundaria), caracterizada por la rotura de la membrana plasmática y la desintegración celular [8, 456]. El hecho de que las células con morfotipo necrótico pierdan la integridad de la membrana celular permite la detección de este estadio mediante sondas como el yoduro de propidio ($\lambda_{\text{ex}} = 535$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 617$ nm) o la 7-aminoactinomicina D (7-AAD, $\lambda_{\text{ex}} = 546$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 647$ nm; *Biolegend*), que

se intercalan en el DNA, pero no son permeables en células vivas. Por lo tanto, el empleo de estos fluorocromos como marcadores de necrosis complementa el marcaje con Anexina y permite un análisis más completo del tipo de muerte celular que se está estudiando.

Este análisis se llevó a cabo en las líneas celulares de tumores sólidos y en un amplio panel de líneas y sublíneas celulares de mieloma sometidas a distintos tratamientos. En el caso de las células adherentes se sembraron $5 \cdot 10^4$ células totales en 500 μ l de medio DMEM completo en placas de 24 pocillos; por su parte, las células de mieloma se sembraron a una densidad de entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml en 500 μ l de medio RPMI 1640 completo en placas de 24 o 48 pocillos. Las células se trataron con miméticos BH3 (concretamente, ABT-199, ABT-737, A-1155463 y S63845, *MedChemExpress*), compuestos antimitóticos (vincristina, docetaxel, alisertib y barasertib, *MedChemExpress*), inhibidores de Hsp90 (17-AAG o tanespimicina y KW-2478, *MedChemExpress*), inductores e inhibidores de la autofagia (rapamicina y cloroquina, respectivamente, *Enzo Life Sciences*) y múltiples combinaciones (miméticos BH3 e inhibidores de Hsp90 y fármacos antimitóticos combinados entre sí o con miméticos BH3, inhibidores metabólicos [DCA y metformina, *Sigma-Aldrich*], panobinostat [inhibidor de histona deacetilasas, *MedChemExpress*] y dinaciclib [inhibidor de CDKs, *MedChemExpress*]) durante tiempos variables en función del experimento. Además, en ocasiones las células se pre-incubaron con antioxidantes (GSH 5 mM, *Sigma-Aldrich*) durante un mínimo de 30 minutos o con inhibidores de caspasas (Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK y Z-DEVD-FMK, de aquí en adelante Z-VAD, Z-IETD y Z-DEVD *MedChemExpress*) y de la necroptosis (inhibidor de RIPK1 necrostatina-1, *MedChemExpress*) a una concentración final de 30 μ M durante al menos una hora, siendo necesaria la renovación de los inhibidores de caspasas y de la necroptosis cada 24 horas. Concluidos los tratamientos, las suspensiones celulares se trasvasaron a tubos de citómetro, estos se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos y se retiraron los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en 100 μ l de una mezcla de tampón ABB (*Annexin Binding Buffer*, Anexo II) 1x que contenía 0,15 μ l de Anexina V-FITC stock o 0,05 μ l de Anexina V-DY634 stock y, en algunos casos, 1 μ l de 7-AAD por punto experimental, y se incubaron durante 10-15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se diluyeron en 200 μ l de ABB 1x y se analizaron por citometría de flujo (BD FACSCalibur™, *BD Biosciences*), agitando los tubos en un vórtex antes de colocarlos en el citómetro. Los datos se obtuvieron y procesaron con los programas informáticos CellQuest Pro (*BD Biosciences*) FlowJo 10.8.1 (*Becton Dickinson (BD)*) y GraphPad Prism 8.0.1 (*GraphPad Software*).

3.2.3. Evaluación de la activación de la autofagia mediante el uso de CYTO-ID®

La inducción de autofagia en las células de mieloma y en la línea celular A549 como consecuencia del tratamiento con los inhibidores de Aurora quinasa y los miméticos BH3 se determinó mediante citometría de flujo y microscopía de epifluorescencia (Eclipse 50i, *Nikon*)

gracias al kit comercial de detección de autofagia CYTO-ID® *Autophagy detection kit 2.0* (Enzo Life Sciences) (Anexo II). Con él es posible monitorizar de forma rápida y cuantitativa los compartimentos autofágicos y estimar el flujo autofágico en células vivas. Para ello, el kit emplea una sonda que brilla con intensidad al incorporarse a las vacuolas autofágicas (pre-autofagosomas, autofagosomas y autofagolisosomas).

Para este ensayo se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células totales de líneas de mieloma *wild-type* en 500 μ l de medio RPMI 1640 completo en placas de 24 o 48 pocillos o 10^5 células A549 totales en 1 ml de medio DMEM completo en placas de 12 pocillos. En ambos tipos celulares se utilizó rapamicina como control positivo de inducción de autofagia y se escogieron dosis subtóxicas de los miméticos BH3 ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845, así como del antimitótico alisertib, y en las células A549, además, se incluyó barasertib. En el caso de las células de mieloma, los compuestos se dejaron actuar durante 24 horas, mientras que en las células A549 el tratamiento se extendió hasta las 48 horas. Finalizados los tratamientos, se evaluó el flujo autofágico con CYTO-ID mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante.

3.3. Determinación de la caspasa-3 activa

Puesto que la caspasa-3 es la principal caspasa ejecutora de la apoptosis [457], se decidió evaluar su activación en las células de mieloma múltiple *wild-type* o modificadas tras su exposición durante 72 horas a distintas dosis de los inhibidores de Aurora quinasa, en presencia y en ausencia del inhibidor de caspasas Z-VAD. Para ello, se sembraron un total de $3 \cdot 10^5$ células en 1 ml del medio RPMI 1640 completo adecuado para cada línea celular en placas de 12 pocillos. Cuando correspondió, las células se pre-incubaron con Z-VAD a una concentración final de 30 μ M durante al menos una hora, tiempo tras el cual se añadieron los compuestos antimitóticos. Estos se dejaron actuar durante 72 horas y Z-VAD se renovó cada 24 horas. Finalizados los tratamientos, las células se trasvasaron a tubos de citómetro, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las células se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones, se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído al 4 % (Merck, Anexo II) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se realizó una nueva centrifugación, los pellets se lavaron con 500 μ l de PBS y, tras otra centrifugación, las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón de permeabilización (Anexo II) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la entrada del anticuerpo. Seguidamente, las células se centrifugaron de nuevo, se lavaron con 500 μ l de PBS, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en 100 μ l de una solución que contenía PBS con un 5 % de suero fetal bovino y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-caspasa-3 activa, conjugado con FITC (#559341, BD Pharmingen), a una dilución 1:20. Las

células se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos, momento tras el cual se centrifugaron, se lavaron con 500 μ l de PBS, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 300 μ l de PBS para su análisis por citometría de flujo.

3.4. Estudio de parámetros mitocondriales

3.4.1. Evaluación del potencial transmembrana mitocondrial

Durante la respiración mitocondrial, los complejos I, III y IV generan un gradiente electroquímico de protones que la ATP sintasa utiliza para obtener energía en forma de ATP [458, 459]. Esta acumulación de protones en el espacio intermembrana mitocondrial origina un potencial eléctrico a ambos lados de la membrana mitocondrial interna conocido como potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), característico de la funcionalidad mitocondrial [459]. En condiciones fisiológicas, el potencial mitocondrial de las células oscila entre -100 y -140 mV en función del tipo celular, pero la permeabilización irreversible de la membrana mitocondrial externa, acompañada de la salida del citocromo c, que tiene lugar al activarse la vía intrínseca de la apoptosis provoca la despolarización de la membrana mitocondrial y, con ello, la pérdida de funcionalidad mitocondrial, incluyendo la síntesis de ATP y la capacidad de importar determinadas proteínas [8, 460, 461]. Esta variación en el potencial mitocondrial puede detectarse mediante sondas lipofílicas fluorescentes catiónicas que son capaces de penetrar en la célula y acumularse selectivamente en la matriz mitocondrial de las células sanas, entre las que se incluyen JC-1 (yoduro de 5,5,6,6-tetracloro-1,1,3,3-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; monómero: λ_{ex} = 510 nm, λ_{em} = 527 nm; agregado: λ_{ex} = 585 nm, λ_{em} = 590 nm), DiOC₆(3) (yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina; λ_{ex} = 482 nm, λ_{em} = 504 nm) o TMRE (tetrametilrodamina etil éster; λ_{ex} = 549 nm, λ_{em} = 575 nm) [462]. En concreto, en este trabajo se han usado DiOC₆(3) y TMRE (*Sigma-Aldrich*).

La caída del potencial mitocondrial se evaluó en células de mieloma múltiple *wild-type* expuestas a diferentes dosis de los inhibidores de Aurora quinasa durante 72 horas en presencia y en ausencia de Z-VAD. Para ello, las células se sembraron a una densidad de entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml en 500 μ l del medio RPMI 1640 completo adecuado en placas de 24 o 48 pocillos. Cuando correspondió, las células se pre-incubaron con Z-VAD a una concentración final de 30 μ M durante al menos una hora y, a continuación, se añadieron los compuestos, que se dejaron actuar durante 72 horas, renovando Z-VAD cada 24 horas. Finalizados los tratamientos, las células se trasvasaron a tubos de citómetro, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 50 μ l de una solución de ABB 1x que contenía las sondas DiOC₆(3) o TMRE a una concentración final de 10 nM o 60 nM, respectivamente. Las células se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 30 minutos y, a continuación, se adicionaron otros 50 μ l de una mezcla de ABB 1x que contenía 0,05 μ l de

Anexina V-DY634 stock por punto experimental. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente para, finalmente, analizarlas mediante citometría de flujo.

3.4.2. Determinación de la salida del citocromo c de la mitocondria

Dada la relevancia del citocromo c en la vía apoptótica mitocondrial, se evaluó la salida del citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol en células de mieloma múltiple *wild-type* y modificadas tratadas con distintas dosis de alisertib y barasertib, en presencia y en ausencia de Z-VAD, durante 72 horas. Para ello, se sembraron 10^6 células MM.1S *wild-type* y DKO en 10 ml de medio RPMI 1640 completo en placas de 6 pocillos y, cuando correspondió, las células se pre-incubaron con Z-VAD a una concentración final de 30 μ M durante al menos una hora. Tras este tiempo, se añadieron los inhibidores de Aurora quinasa, que se dejaron actuar durante 72 horas, y Z-VAD se renovó cada 24 horas. Acabados los tratamientos, las células se recogieron en tubos de fondo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 520 xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes se descartaron, las células se lavaron con 1 ml de PBS, se trasvasaron a tubos Eppendorf estériles y se centrifugaron a 166 xg durante otros 5 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón de permeabilización (Anexo II), excepto los controles positivos, a los que se adicionaron 200 μ l de PBS a 4 °C. Todas las muestras se incubaron en hielo y en la nevera durante 5 minutos, tiempo tras el cual se les añadió 1 ml de PBS frío y se centrifugaron a 2150 xg durante 3 minutos a 4 °C. Las células se fijaron con 500 μ l de paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 2150 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con 500 μ l de PBS y se resuspendieron en 100 μ l de solución de bloqueo (Anexo II), que se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se adicionaron a cada muestra 0,5 μ l del anticuerpo primario monoclonal anti-citocromo c, obtenido en ratón (clon 6H2.B4, #556432, BD Pharmingen), o 2,5 μ l de un anticuerpo primario anti-IgGk de ratón (clon 107.3, #554721 BD Biosciences) (control de isotipo) y las células se mantuvieron en agitación a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se añadió 1 ml de PBS a cada muestra, estas se centrifugaron a 2150 xg durante 3 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con 500 μ l de PBS y se resuspendieron en 50 μ l de una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo de un anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón, obtenido en cabra, conjugado con Alexa 488 (#A11029, ThermoFisher Scientific) (2 μ l de anticuerpo por cada 10^6 células). Las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifugaron a 166 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en 300 μ l de PBS para su análisis por citometría de flujo.

3.4.3. Detección de ROS mitocondriales y evaluación de la masa mitocondrial

Las alteraciones en la masa mitocondrial y los niveles de ROS generados específicamente por las mitocondrias se midieron utilizando sondas mitocondriales: MitoTracker Green FM para

la masa mitocondrial (*ThermoFisher*) y MitoSOXTM Red para los ROS mitocondriales (*ThermoFisher*). MitoTracker Green FM (sonda fluorescente verde; $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$) se acumula selectivamente en la matriz mitocondrial al unirse covalentemente a través de los grupos tiol libres de los residuos de cisteína de proteínas mitocondriales; por su parte, MitoSOXTM Red (sonda fluorescente roja; $\lambda_{\text{ex}} = 396 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$) también se acumula en la mitocondria, se oxida con facilidad en presencia de superóxido, pero no de otros sistemas generadores de ROS o RNS, y además, la superóxido dismutasa impide su oxidación [463, 464].

En concreto, estos ensayos se realizaron en células de mieloma múltiple *wild-type* tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. Las células se sembraron a una densidad de entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml en 500 μl del medio RPMI 1640 completo correspondiente en placas de 24 o 48 pocillos, y fueron expuestas a distintas dosis de los fármacos durante 24-72 horas. Entonces, las células se recogieron en tubos de citómetro, se centrifugaron a 335 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en 100 μl de medio completo que contenía las sondas MitoSOXTM o MitoTracker Green FM a una concentración final de 5 μM o 200 nM, respectivamente. Por último, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad y se añadieron 150 μl de PBS previamente a su análisis por citometría.

3.5. Estudio del ciclo celular

Las alteraciones en el ciclo celular inducidas por diferentes fármacos antitumorales se analizaron mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Este compuesto es un agente intercalante que puede unirse al DNA de doble hebra o al RNA y emite fluorescencia roja [465, 466]. Al tratarse de una molécula impermeable, únicamente se incorpora a las células que tienen comprometida la integridad de la membrana, por lo que su aplicación en la evaluación de la muerte celular está muy extendida [465]. Además, también es bastante común su uso en el estudio del ciclo celular, ya que permite conocer la distribución de las células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular en función de su contenido en DNA (G0/G1, S y G2/M) y determinar la existencia de poblaciones celulares apoptóticas y poliploides, pero para ello se requiere previamente la fijación de las células y la digestión con RNasas para evitar la posible interferencia del RNA [467].

En este trabajo, el estudio del ciclo celular se ha llevado a cabo en distintos escenarios. Por un lado, las células A549 se expusieron a diferentes concentraciones de los inhibidores de Hsp90 durante 24-72 horas; asimismo, estas células se trataron durante 48 horas con dichos inhibidores y, tras este tiempo, se dejaron en cultivo durante cinco días en ausencia de los fármacos. Por otra parte, un panel de cinco líneas celulares de mieloma múltiple *wild-type* fue tratado con alisertib y barasertib a una concentración final de 100 nM y 5 μM , respectivamente, durante 24-72 horas.

Además, se evaluó el efecto del mimético BH3 A-1155463 a una concentración subtóxica durante cortos espacios de tiempo (0-24 horas) en la línea celular U266.

Para los ensayos de 24-72 horas con las células adherentes, se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^5$ células totales en el caso de los controles y $5 \cdot 10^5$ células totales para las tratadas, mientras que en los ensayos de larga duración las células totales sembradas inicialmente fueron $2 \cdot 10^4$ en los controles y $6 \cdot 10^4$ en las células tratadas. En todos los casos la siembra se realizó en 3 ml de medio DMEM completo en placas de 6 pocillos y los compuestos se adicionaron pasadas 24 horas. Además, en los ensayos de larga duración los compuestos se retiraron de los cultivos a las 48 horas, se adicionaron 5 ml de medio fresco y las células se mantuvieron en cultivo durante cinco días adicionales. Las células de mieloma, por su parte, se sembraron en 1 ml de medio RPMI 1640 completo en placas de 12 pocillos (10^6 células totales para los controles y los tratamientos, excepto para el control de las 72 horas de las células RPMI 8226, de las que se tomaron $5 \cdot 10^5$ células totales). Los compuestos se incubaron a las concentraciones y tiempos estipulados para cada ensayo y, una vez finalizados los tratamientos, las células se trasvasaron a tubos de fondo cónico de 15 ml, se centrifugaron a 233 xg durante 5 minutos, se eliminaron los sobrenadantes y los pellets se lavaron con 3 ml de PBS. Se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones, las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se transfirieron a tubos Eppendorf estériles, que se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 73 xg (*Microfuge 16 Centrifuge*, [Beckman Coulter]). Los sobrenadantes se retiraron por aspiración y las células se fijaron añadiendo 700 μ l de etanol al 70 % gota a gota en un vórtex para evitar la formación de agregados. Una vez fijadas, las muestras se guardaron a -20 °C durante un mínimo de 24 horas, tiempo tras el cual los Eppendorf se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos a 4 °C (*Microfuge 22R Centrifuge*, [Beckman Coulter]), se realizó un nuevo lavado con PBS frío y se centrifugaron de nuevo a las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ l de una solución comercial que contenía yoduro de propidio y RNasa (*Immunostep*; Anexo II) y se incubaron en oscuridad durante 15-20 minutos antes de analizarlas por citometría de flujo.

3.6. Detección de senescencia celular mediante la medición de la actividad de la β -galactosidasa lisosomal

En 1995, *Dimri et al.* demostraron que las células senescentes poseen una actividad β -D-galactosidasa lisosomal diferente a la detectada en la mayoría de las células a la que denominaron actividad “ β -galactosidasa asociada a senescencia” (SA β -gal) [171]. Esto se debe a un aumento de los niveles de mRNA del gen codificante para la enzima, *GLB1*, así como a un incremento de los niveles de expresión de la proteína en las células senescentes como consecuencia de una mayor biogénesis lisosomal para intentar compensar la acumulación de moléculas no degradables y orgánulos dañados en lisosomas secundarios. Así, la elevada

expresión de esta enzima implica una mayor actividad hidrolasa que es posible detectar a pH 6, a diferencia de lo que sucede en condiciones fisiológicas, donde la β -D-galactosidasa lisosomal es activa a un pH más ácido, concretamente a pH 4 [169]. Además, también se ha descrito que la actividad SA β -gal está inversamente relacionada con la edad celular, ya que esta actividad aumentaba en fibroblastos de la dermis y queratinocitos de la epidermis con baja capacidad replicativa; sin embargo, esta actividad no se ha observado en fibroblastos presenescentes ni quiescentes, queratinocitos terminalmente diferenciados ni en células tumorales inmortalizadas [171].

Tradicionalmente, la senescencia celular ha sido identificada *in vitro* e *in vivo* principalmente mediante la medición de la actividad SA β -gal y la expresión de p16^{INK4a} [169, 170]. Sin embargo, la naturaleza heterogénea y dinámica de las células senescentes ha dificultado la aparición de un biomarcador universal específico y altamente sensible que permita diferenciarlas de células quiescentes, de células terminalmente diferenciadas y de otros tipos celulares que no se dividen [165]. No obstante, existen marcadores con cierta validez universal y otros que quedan restringidos a detectar ciertos tipos específicos de senescencia [167]. Por ello, la Asociación Internacional de Senescencia Celular (ICSA) ha propuesto recientemente la combinación de tres marcadores para una detección más precisa. Concretamente, recomiendan realizar un cribado inicial empleando un marcador citoplasmático, como puede ser la medición de la actividad SA β -gal y/o la acumulación de lipofusina (agregados insolubles de azúcares y lípidos) en los lisosomas; verificar a continuación mediante co-tinción con otros marcadores frecuentes (por ejemplo, un aumento de la expresión de p21^{Waf1/Cip1} y la ausencia de lámina B1); y finalmente, identificar marcadores específicos que puedan verse alterados por tipo de senescencia celular en particular, como el SASP o la implicación de distintas vías de señalización, entre otros [167]. No obstante, la actividad SA β -gal continúa siendo uno de los biomarcadores más ampliamente utilizados en la detección de senescencia celular tanto en cultivos celulares como *in vivo* [169], por lo que esta técnica ha sido la elegida en este trabajo.

La metodología típica para evaluar la actividad SA β -gal es el ensayo citoquímico, una técnica sencilla y rápida que puede aplicarse tanto a cultivos celulares como a muestras de tejidos frescos o congelados [169, 468]. Este se basa en la actividad hidrolasa de la enzima la β -D-galactosidasa lisosomal para liberar β -galactosa de gangliósidos u otros tipos de glicoconjugados [169]. En el ensayo, las células senescentes hidrolizan el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido, más conocido como X-gal, originando cristales insolubles de color azul visibles al microscopio invertido a las 12-16 horas de realizar la tinción, aunque en ocasiones ya son detectables a las 2 horas [169]; no obstante, si las muestras se fijan, se secan y se protegen de la luz, la tinción puede mantenerse estable durante meses [169]. En cualquier caso, la reacción debe producirse en un tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio a pH 6

para poder distinguir la actividad SA β -gal de la que tiene lugar a pH más ácido, y en ausencia de CO_2 para evitar la bajada del pH como consecuencia del equilibrio $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ [169].

Esta técnica tiene carácter cualitativo, ya que la cuantificación en microscopía de campo claro de las células coloreadas es subjetiva y laboriosa [169]. Por ello, se han desarrollado nuevos métodos basados en la emisión de fluorescencia que permiten cuantificar la actividad SA β -gal mediante citometría de flujo, microscopía de fluorescencia o chips microfluídicos, e incluso se ha propuesto el acoplamiento de la microscopía electrónica de transmisión a la tinción tradicional de tejidos (GAL-EM) para llevar a cabo un análisis ultraestructural que permita la identificación, cuantificación y localización de células senescentes en relación con las características del tejido [169, 468].

En la presente tesis, la medición de la actividad SA β -gal se realizó en las células adherentes A549 y MIA PaCa-2 por un lado, y por otro, en todas las líneas celulares *wild-type* de mieloma múltiple disponibles, así como en las MM.1S modificadas. De las células MIA PaCa-2 se sembraron 10^3 células control y $3 \cdot 10^4$ células a tratar, mientras que de las células A549 se sembraron $3 \cdot 10^3$ y $3 \cdot 10^4$ células totales, respectivamente. La siembra en todos los casos se realizó en 1 ml en placas de 12 pocillos y, pasadas 24 horas, se adicionaron los compuestos: barasertib a una concentración final de 5 μM a las células MIA PaCa-2 a mayor densidad y 17-AAG a 100 nM o KW-2478 a 1-2 μM a las células A549 más concentradas. Los tratamientos se dejaron actuar durante 48 horas y, en ese momento, el medio se sustituyó por 1 ml de medio fresco, dejando las células en cultivo durante cinco días más. En el caso de las células de mieloma, se sembraron $1,5 \cdot 10^4$ células (control) y $1,5 \cdot 10^5$ células (tratadas) en 500 μl en placas de 24 o 48 pocillos y se adicionaron alisertib y barasertib a una concentración final de 5 μM cuando correspondió. Los fármacos se dejaron actuar durante 48 y 72 horas y, seguidamente, las células se recogieron en tubos de fondo cónico de 15 ml, se centrifugaron a 520 xg durante 5 minutos, se resuspendieron en 1 ml de medio fresco y se volvieron a depositar en la placa, dejándolas en cultivo durante cinco días. Tras este tiempo, para continuar con el protocolo en las células de mieloma, fue necesario transferirlas a una placa de 24 pocillos que contenía cubreobjetos, los cuales se conservaban sumergidos en etanol al 96 %, y previamente a su uso, fueron pre-tratados con 100 μl de poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*) 0,1 mg/ml durante media hora y esterilizados mediante exposición a luz ultravioleta durante 20 minutos. Entonces, la placa con las células se centrifugó a 2851 xg durante 3 minutos.

A partir de aquí, el protocolo a seguir para ambos tipos de células fue idéntico. Se retiró el sobrenadante, las células se lavaron con 1 ml de PBS y se fijaron con 1 ml de solución fijadora (Anexo II), incubando la placa a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró la solución fijadora, se realizó un nuevo lavado con 1 ml de PBS y se añadió 1 ml de la mezcla de tinción (Anexo II) con el sustrato X-gal a una concentración final de 1 mg/ml. Seguidamente, se sellaron

los bordes de las placas con parafilm para evitar el intercambio de CO₂ y, por tanto, la caída del pH del tampón, las placas se incubaron a 37 °C y se controló el desarrollo del color azul durante las siguientes horas. Finalmente, se tomaron imágenes de las células a las 24 horas de la tinción utilizando el programa informático ACT-1 (*Nikon*) en un microscopio invertido con un sistema de fotografía digital acoplado (Digital camera DXM1200F, *Nikon*).

3.7. Análisis de la morfología nuclear mediante microscopía de fluorescencia

Los cambios morfológicos inducidos por alisertib a nivel nuclear en las células de mieloma *wild-type* y modificadas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia con la sonda permeable Hoechst 33342 (sonda fluorescente azul; $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$), ya que su interacción con regiones del surco menor del DNA ricas en adenina-timina permite visualizar núcleos celulares en interfase y en las distintas fases mitóticas [469].

Para ello, se sembraron entre 10^5 y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μl de medio RPMI 1640 completo en placas de 24 o 48 pocillos, y estas se trataron con alisertib a una dosis final de 100 nM durante 24-72 horas. Tras el tratamiento, las células se incubaron con la sonda Hoechst 33342 a una concentración final de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se trasvasaron a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 166 xg durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes y las células se lavaron con 500 μl de PBS y se dispusieron sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina, colocados en placas de 24 pocillos. Las placas con las suspensiones celulares se centrifugaron a 2851 xg durante 3 minutos, se retiró el PBS, las células se fijaron con 500 μl paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se lavaron de nuevo con 500 μl de PBS. A continuación, los cubreobjetos se extrajeron de los pocillos, se colocaron sobre una gota de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*) depositada sobre un portaobjetos y las preparaciones se sellaron con esmalte de uñas y se guardaron en oscuridad a 4 °C. Finalmente, las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia que tenía acoplado el sistema de fotografía digital mencionado en el apartado anterior, lo que permitió tomar imágenes utilizando el programa informático ACT-1 (objetivo de 40 aumentos).

3.8. Análisis de la expresión de proteínas por *Western Blot*

La expresión de diferentes proteínas se evaluó mediante ensayos de *Western Blot*. Por un lado, se determinó el nivel de expresión de proteínas clave en el proceso autofágico (p62, Beclina 1 y LC3B-I/II) en las células A549 tras su exposición a los miméticos BH3 ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845 durante 48 horas. Por otra parte, en las células *wild-type* de mieloma se evaluaron los niveles de expresión de algunas de las proteínas autofágicas (p62 y LC3B-I/II) y de distintas proteínas de la familia Bcl-2, incluyendo proteínas anti-apoptóticas (Mcl-1, Bcl-X_L y

Bcl-2) y pro-apoptóticas “solo-BH3” (Bim y PUMA), cuando fueron tratadas con cada uno de los miméticos BH3 durante breves periodos de tiempo; asimismo, la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 mencionadas y de proteínas implicadas en la regulación de la mitosis (BUBR1, ciclina B1 y MAD2) se determinó en dichas células tras 72 horas de exposición a los inhibidores de Aurora quinasa.

3.8.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales

En el caso de las células adherentes, se sembraron para cada condición experimental 10^6 células totales en 5 ml de medio DMEM completo en frascos de cultivo de 25 cm², y se incluyó un frasco más con $5 \cdot 10^5$ células totales en 5 ml de medio que se utilizó como control. Por su parte, para cada línea celular de mieloma se sembraron en 10 ml de medio RPMI 1640 completo en placas de 6 pocillos un total de $3 \cdot 10^6$ células que fueron tratadas, o bien con los miméticos BH3 durante 6, 16 y 24 horas, o bien con alisertib y barasertib durante 72 horas, y se tomaron como control entre $7,5 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^6$ células.

Finalizados los tratamientos, se determinaron la densidad y viabilidad celulares de cada condición y las células se centrifugaron en tubos de fondo cónico de 15 ml a 520 xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes se eliminaron y cada pellet se lavó con 1 ml de PBS estéril, pasando el contenido de cada tubo de fondo cónico a tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron a 460 xg durante 5 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y los pellets se incubaron durante 2 minutos en hielo para, seguidamente, resuspenderlos en el volumen correspondiente de tampón de lisis 1x (Anexo II) según la relación $5 \cdot 10^4$ células/ μ l, permitiendo así la extracción de las proteínas citoplasmáticas. Las muestras se incubaron en hielo un mínimo de 30 minutos y, posteriormente, se centrifugaron a 18000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Por último, los sobrenadantes, que albergaban las proteínas celulares, se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf estériles y estos se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

3.8.2. Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Con el fin de cargar la misma cantidad de proteína de cada muestra, se determinó la cantidad de proteína total que contenía cada extracto celular mediante el método del BCA (ácido bicinconínico; *Micro BCATM Protein Assay Kit*, [Thermo Scientific]), una técnica colorimétrica de gran sensibilidad que no es interferida por la presencia de detergentes. La cuantificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y la lectura de las absorbancias se realizó a 550 nm en un lector de placas ELISA.

Una vez conocido el volumen necesario para cargar 20 μ g de proteína de cada extracto, se adicionaron entre 3 y 4 μ l de tampón de carga concentrado 3x (Anexo II) a cada muestra, estas se

incubaron a 95 °C durante 5 minutos en un bloque térmico sin agitación (*Eppendorf*) y se centrifugaron brevemente.

Los extractos, junto a 3 µl del marcador de peso molecular relativo (*BlueStar Plus Prestained Protein Marker*, [*Nippon Genetics*]), se cargaron en geles de poliacrilamida al 10 o 15 % (composición química en Anexo II) que contenían el agente desnaturizante SDS al 0,1 %, permitiendo la separación de las proteínas extraídas en función de su peso molecular. Las electroforesis se desarrollaron en cubetas *Mini Protean 3* (*Bio-Rad*) con tampón de electroforesis (Anexo II) a unas condiciones de 180 V y 20 mA/gel durante un mínimo de 80 minutos.

3.8.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas en los geles, estas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Thermo Scientific*). En cada transferencia, los geles se colocaron sobre las membranas y este montaje a su vez se dispuso en un sándwich de hojas de papel Whatman (*GE Healthcare*), todo ello previamente impregnado en tampón de transferencia (Anexo II), evitando la formación de burbujas para que estas no interfirieran en el proceso. Las transferencias se llevaron a cabo en equipos de transferencia semi-secos (*Bio-Rad*) a unas condiciones de 20 V y 400 mA durante una hora y cuarto, tiempo tras el cual se recuperaron las membranas y se tiñeron con rojo Ponceau (*Sigma-Aldrich*, Anexo II) para comprobar el correcto desarrollo de las transferencias.

3.8.4. Análisis de proteínas mediante inmunotransferencia y detección de inmunocomplejos

Las proteínas transferidas a las membranas se analizaron utilizando los anticuerpos específicos adecuados para su detección y los marcadores de peso molecular relativos. Tras la tinción con rojo Ponceau, las membranas se lavaron con agua destilada para retirar los restos de colorante y se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) disuelta en tampón B (solución de lavado, Anexo II) (Anexo II) durante un mínimo de 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se lavaron durante 10 minutos con tampón B bajo agitación a temperatura ambiente para eliminar los restos de leche y, finalmente, se incubaron con los anticuerpos primarios adecuados en función de la proteína a detectar (Tabla 3.3) con agitación durante dos horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 3.3 | Relación de los anticuerpos primarios específicos utilizados para los ensayos de Western Blot. Las abreviaciones “mc” y “pc” corresponden a “monoclonal” y “policlonal”, respectivamente. La dilución de los anticuerpos se realizó en tampón *Antibody solution* [Anexo II]).

Nombre (clon)	α -Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Mcl-1 (22)	Ratón mc	1:250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	sc-12756
Bcl-X _L (54H6)	Conejo mc	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#2764
Bcl-2 (100/D5)	Ratón mc	1:250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	sc-56015
Bim (C34C5)	Conejo mc	1:1000	<i>Cell Signaling</i>	#2933
PUMA (SR42-09)	Conejo mc	1:1000	<i>Novus</i>	NBP2-67326
p62/SQSTM1 (D-3)	Ratón mc	1:250	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	sc-28359
Beclina 1 (20/Beclin)	Ratón mc	1:1000	<i>BD Biosciences</i>	612113
LC3B	Conejo pc	1:1000	<i>Sigma-Aldrich</i>	L7543
Ciclina B1 (GNS1)	Ratón mc	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	sc-245
MAD2 (48/MAD2)	Ratón mc	1:500	<i>BD Biosciences</i>	610678
BUBR1 (9/BUBR1)	Ratón mc	1:500	<i>BD Biosciences</i>	612503
β -Actina (AC-15)	Ratón mc	1:10000	<i>Sigma-Aldrich</i>	A1978
α -Tubulina (B-5-1-2)	Ratón mc	1:10000	<i>Sigma-Aldrich</i>	T6074

Finalizada la incubación, los anticuerpos se recuperaron, las membranas se lavaron tres veces con tampón B durante 5 minutos y, seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Tabla 3.4) en agitación a temperatura ambiente durante una hora u hora y media. Transcurrido este tiempo, se eliminó el anticuerpo secundario, se realizó un nuevo lavado de las membranas y estas se incubaron con el sustrato de la peroxidasa (kit *PierceTM ECL Western Blotting Substrate*, [Thermo Scientific]) durante dos minutos. A continuación, se retiró el exceso de sustrato, las membranas se colocaron en una funda de plástico transparente evitando la formación de burbujas y, finalmente, estas se revelaron por quimioluminiscencia en un lector de imágenes (Amersham Imager 600, *GE Healthcare*).

Tabla 3.4 | Relación de los anticuerpos secundarios utilizados para los ensayos de Western Blot. La abreviación “pc” corresponde a “policlonal”. La dilución de los anticuerpos se realizó en una mezcla compuesta por leche desnatada y tampón B a partes iguales.

Nombre	α -Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
<i>Rabbit IgG-Peroxidase</i>	Cabra pc	1:20000	<i>Sigma-Aldrich</i>	A9169
<i>Mouse IgG-Peroxidase</i>	Conejo pc	1:10000/20000	<i>Sigma-Aldrich</i>	A9044

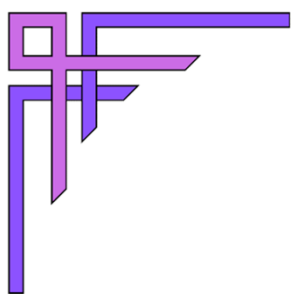
De manera análoga a la detección de las proteínas de interés, en cada *Western Blot* se evaluó la expresión de β -actina o α -tubulina (Tabla 3.3), que se utilizaron como controles de carga, permitiendo la realización de análisis cuantitativos de las bandas obtenidas por quimioluminiscencia mediante el programa informático ImageJ (*National Institutes of Health*). En dicho programa es posible transformar las bandas de las proteínas reveladas en áreas cuantificables, lo que permite compararlas de manera más precisa con el control de carga y eliminar el factor del tamaño celular, que puede interferir en la cuantificación.

3.9. Análisis estadístico de los datos

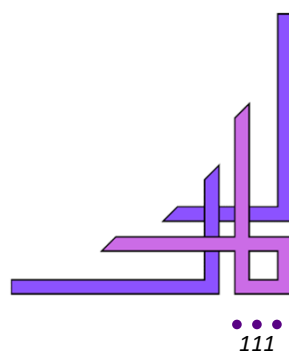
El análisis estadístico de la significancia de los datos se realizó mediante el programa GraphPad Prism 8.0.1. Como se indica en cada figura, los datos se analizaron estadísticamente mediante el uso de distintas pruebas estadísticas, las cuales se recogen a continuación:

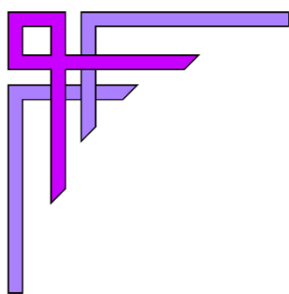
- *t-Student* o *t-test* desapareado de dos colas para el análisis de dos variables en muestras independientes.
- *t-Student* o *t-test* apareado de dos colas para el análisis de dos variables en muestras emparejadas o relacionadas.
- *One-way ANOVA* o *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett para comparar dos o tres variables, respectivamente, entre dos o más grupos independientes con respecto a un grupo control.
- *One-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak para comparar dos variables entre grupos independientes pre-seleccionados.
- *Two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak para comparar tres variables entre dos grupos independientes.
- *Two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey para comparar tres variables entre tres o más grupos independientes.

Por otro lado, en este punto es necesario especificar el método utilizado para evaluar la eficacia de las combinaciones entre dos fármacos. Para ello, se emplearon la muerte específica observada experimentalmente (OBS) y la muerte específica hipotética esperada (ESP), usada anteriormente por *Nijhof et al.* [470]. A esta última se le supone un efecto aditivo al combinarse dos fármacos y se calcula mediante la fórmula $[(\% \text{ muerte fármaco 1} + \% \text{ muerte fármaco 2}) - (\% \text{ muerte fármaco 1} \times \% \text{ muerte fármaco 2})/100]$, utilizada previamente por *Cuenca et al.* [471]. Por tanto, una combinación se considera sinérgica cuando la diferencia entre la muerte específica observada y la esperada (OBS-ESP) es igual o superior a 10, aditiva cuando oscila entre 0 y 10 y antagónica cuando es menor que cero.



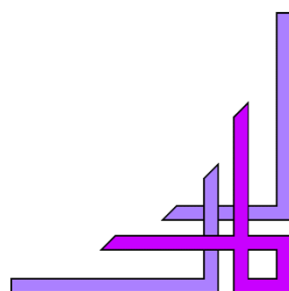
RESULTADOS Y DISCUSIÓN





PARTE I

Estudio del mecanismo de acción de diferentes agentes quimioterápicos y evaluación de nuevas combinaciones en líneas celulares de tumores sólidos



4. Resultados y discusión – Parte I: Estudio del mecanismo de acción de diferentes agentes quimioterápicos y evaluación de nuevas combinaciones en líneas celulares de tumores sólidos

La supervivencia de los pacientes que padecen cáncer colorrectal, de pulmón o de páncreas se ha incrementado en los últimos años gracias, en parte, a la introducción de nuevos agentes quimioterápicos en las pautas de tratamiento y al refinamiento de las terapias antitumorales tradicionales [472–475]. Sin embargo, pese a ello, estos tipos de tumores se asocian con un mal pronóstico y una elevada letalidad [472, 474–476]. Esto pone de manifiesto, por tanto, la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para este tipo de cánceres y, en este sentido, los miméticos BH3 se erigen como prometedores candidatos antitumorales cuando se combinan con diferentes agentes anti-neoplásicos en tumores sólidos a nivel preclínico [477–479]. Por ello, esta primera parte de la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la combinación de miméticos BH3 con fármacos antimitóticos (actualmente utilizados en el tratamiento de un amplio espectro de tumores sólidos) [181] e inhibidores de la chaperona Hsp90 (sobrexpresada en multitud de este tipo de cánceres) [408], a la vez que se ha profundizado en el mecanismo de acción de estas tres familias de compuestos.

4.1. La inhibición farmacológica de Aurora B induce senescencia en células tumorales pancreáticas

Es bien sabido que los fármacos antimitóticos, incluidos los inhibidores de Aurora quinasa, interfieren en el correcto desarrollo de los eventos mitóticos, provocando fallos en la formación del huso mitótico y la segregación cromosómica, entre otros [480]. En estas situaciones de alta inestabilidad genómica, las células activan el mecanismo oncosupresor denominado catástrofe mitótica para evitar la acumulación de células con potencial cancerígeno en el organismo [8, 144]. Así, las células entran en un estado de arresto mitótico, durante el cual algunas de ellas morirán, mientras que otras conseguirán sortearlo y llevarán a cabo mitosis aberrantes, generando células aneuploides, o alcanzarán la fase G1 de la siguiente interfase sin realizar la citocinesis, generando células tetraploides [144]. Estas últimas pueden optar por continuar realizando mitosis que incrementen el grado de ploidía, morir más tarde o más temprano en la nueva interfase o entrar en un estado de senescencia [144]. No obstante, los mecanismos que les permiten decantarse por uno de ellos todavía se desconocen [144].

Puesto que varios trabajos previos del grupo de investigación [418, 426] ponen de manifiesto que la entrada en senescencia es una respuesta que las células tumorales de pulmón y de colon

pueden adoptar frente a barasertib, se decidió evaluar si células tumorales de origen pancreático también entraban en senescencia tras el tratamiento con dicho fármaco (Fig. 4.1A).

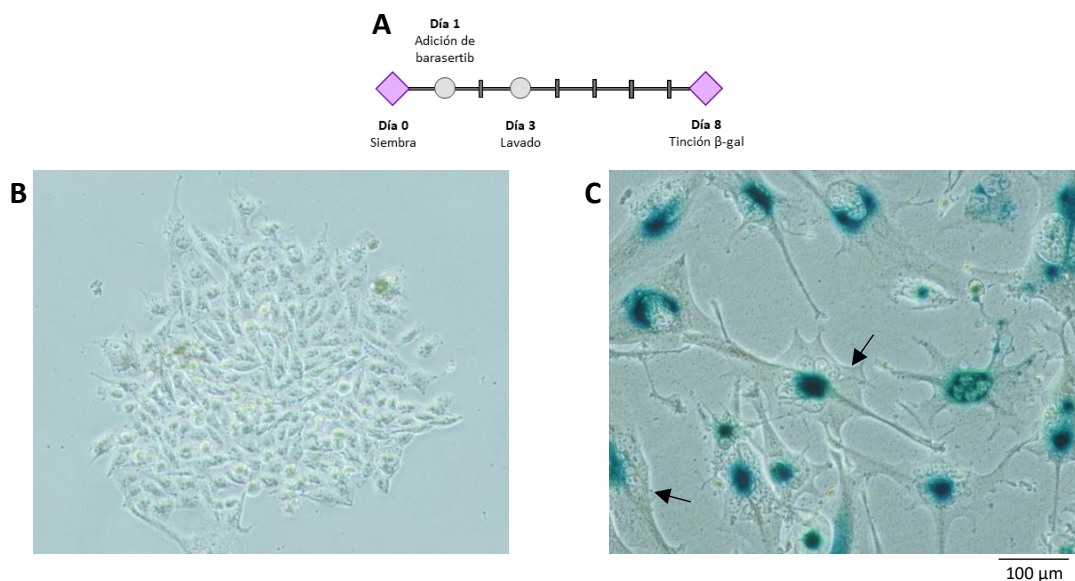


Figura 4.1 | Detección de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia en las células MIA PaCa-2 tratadas con barasertib. (A) Línea temporal que representa de forma cronológica el tratamiento al que fueron sometidas las células. Se sembraron en 1 ml en placas de 12 pocillos, por un lado, 10³ células que no se trataron (B), y por otro, 3·10⁴ células que fueron expuestas a barasertib a una dosis de 5 μM durante 48 horas (C). Seguidamente, el medio se reemplazó por 1 ml de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, se evaluó la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia según se indica en el apartado 3.6 de Materiales y métodos y se tomaron imágenes de las células transcurridas 24 horas desde la tinción. Imágenes de microscopía invertida (x100) representativas de tres experimentos independientes. Las flechas señalan células multinucleadas.

La visualización de las células al microscopio invertido reveló más diferencias que semejanzas entre las células tratadas y sin tratar. Mientras que las células control se mostraron totalmente sanas y creciendo de forma exponencial, una proporción significativa de las células expuestas a barasertib sobrevivieron al tratamiento, pero no proliferaron. Estas compartían con las células no tratadas su propiedad de adherencia, pero, sin embargo, mostraban una morfología irregular y aplanada y un incremento espectacular del tamaño celular y nuclear comparado con las células sin tratar, las cuales exhibían una morfología de tipo epitelial y un tamaño considerablemente menor (Figs. 4.1B y C). Además, las imágenes permiten distinguir células multinucleadas como consecuencia del tratamiento (flechas en la Fig. 4.1C). Estas observaciones son compatibles con una salida rápida de la mitosis y la entrada de las células en un estado de senescencia, que se confirmó mediante la medición de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-gal). Como se esperaba, dicha actividad no se detectó en las células control, pero sí en las células en las que se había inhibido Aurora B, pues prácticamente la totalidad de las células supervivientes se colorearon de azul en virtud de la intensa actividad SA β-gal que presentaban (Figs. 4.1B y C).

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que las células MIA PaCa-2 que sobreviven al tratamiento con barasertib alcanzan el estado de senescencia, al igual que sucede en las células A549 y HCT-116 [418, 426]. Además, este efecto también ha sido descrito con paclitaxel, palbociclib (inhibidor de CDK4 y CDK6) e incluso doxorrubicina en células de cáncer de mama, con inhibidores de PLK1 tanto *in vitro* como *in vivo* y con otros inhibidores de la familia Aurora en células de glioblastoma y de cáncer de mama [481–483].

4.2. Estudio de la sensibilidad de células de tumores sólidos a miméticos BH3

La sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 representa uno de los principales mecanismos moleculares que las células tumorales adoptan para evadir la apoptosis [93]. De hecho, en muchos tumores de origen hematológico es habitual encontrar niveles elevados de Bcl-2, a diferencia de los tumores sólidos, en los que prima la sobreexpresión de Bcl-X_L y/o Mcl-1 [93, 106]. En cualquier caso, las células sobreviven debido a la capacidad de estas proteínas anti-apoptóticas de mantener inactivas a Bax y Bak, bien uniéndose directamente a ellas, bien a través del secuestro de proteínas “solo-BH3” [484]. Estas interacciones han captado la atención de la comunidad científica en los últimos años, favoreciendo el desarrollo de una batería de compuestos miméticos de BH3 que buscan erigirse como una terapia antitumoral de referencia en el ámbito clínico. Desde la aparición de los primeros compuestos de esta familia, no han cesado los estudios enfocados en la evaluación de su selectividad, potencia, eficacia y toxicidad a nivel preclínico, e incluso alguno de ellos ha alcanzado la fase clínica, obteniendo en algunos casos resultados extraordinariamente beneficiosos [485–490]. Tal es el caso de ABT-199 o venetoclax, que se ha convertido en el primer mimético BH3 aprobado por los organismos reguladores de Europa y Estados Unidos como monoterapia para el tratamiento de la CLL y combinado con otras terapias para esta misma enfermedad, así como en el SLL y la AML [104, 105].

Partiendo de esta base, se decidió evaluar el potencial citotóxico de miméticos BH3 en fase de estudio (ABT-737 [inhibidor de Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w], A-1155463 [inhibidor específico de Bcl-X_L] y S63845 [inhibidor selectivo de Mcl-1]) o que ya se emplean en la clínica (ABT-199 [inhibidor específico de Bcl-2]) en líneas celulares de tumores sólidos humanos de mal pronóstico, concretamente de carcinoma de pulmón (A549), de colon (HCT-116) y de páncreas (MIA PaCa-2). La experiencia previa del grupo indica que la actividad citotóxica de los ABTs a 24 horas es bastante modesta en estas mismas líneas celulares [418], por lo que en este trabajo se optó por ampliar el tiempo de exposición a 48 horas.

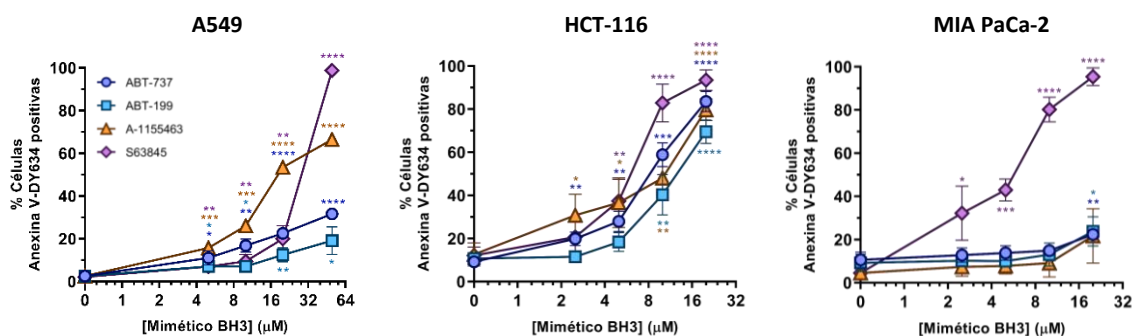


Figura 4.2 | Sensibilidad de diferentes líneas celulares de tumores sólidos a miméticos BH3. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células A549, HCT-116 y MIA PaCa-2 en 500 μ l en placas de 24 pocillos y 24 horas después se añadieron concentraciones crecientes de los miméticos BH3 (0-50 μ M para A549 y 0-20 μ M para HCT-116 y MIA PaCa-2). Tras 48 horas en presencia de los compuestos se determinó la muerte celular mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-5$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* desapareado de dos colas, comparando cada concentración de cada mimético BH3 respecto a su control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Analizando el efecto de los mimético BH3 en cada línea celular (Fig. 4.2), en las células A549 se observa una acción citotóxica limitada de los ABTs, especialmente de ABT-199, con porcentajes de muerte celular del 20-30 % con las concentraciones más altas. El inhibidor de Mcl-1, S63845, también promueve la apoptosis en un pequeño porcentaje de células (en torno del 10-20 %) excepto con la dosis más alta, con la que prácticamente la totalidad de las células sucumben. Finalmente, el inhibidor de Bcl-X_L, A-1155463 es el único que muestra un patrón de incremento progresivo de la muerte inducida en función de la dosis, alcanzando con la dosis más elevada un máximo de toxicidad del 60-70 %. En el caso de las células HCT-116, estas responden de manera más homogénea a los compuestos, ya que con todos ellos se produce un aumento gradual de la muerte celular dependiente de la dosis, alcanzando en todos los casos niveles máximos de muerte de entre el 70 % y el 90 %. Por último, en las células MIA PaCa-2 se distinguen con claridad dos patrones de toxicidad. Concretamente, estas células apenas son sensibles a los ABTs y el inhibidor de Bcl-X_L, ya que en el mejor de los casos estos compuestos desencadenan la apoptosis de, aproximadamente, un 20 % de las células, pero muestran una elevada sensibilidad al inhibidor de Mcl-1, pues ya a dosis relativamente bajas su toxicidad ronda el 30 %, y esta escala de forma progresiva hasta más del 90 % con la concentración más elevada.

Estos resultados sugieren que la supervivencia de cada línea celular se apoya sobre distintas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. En las células A549, Bcl-2 parece poco relevante para su supervivencia debido al bajo porcentaje de apoptosis que es capaz de inducir ABT-199. Algo similar podría estar sucediendo con Mcl-1, aunque el potencial citotóxico de su inhibidor específico a dosis de 50 μ M es extraordinario; no obstante, este efecto podría ser un efecto *off-target*, es decir, dosis tan elevadas del compuesto podrían estar afectando de manera inespecífica a otras vías moleculares en lugar de actuar específicamente sobre Mcl-1. De hecho, *Reljic et al.*

propusieron que este tipo de efecto se producía al utilizar dosis de ABT-737 muy superiores a las necesarias para inhibir a las proteínas anti-apoptóticas (10-50 μ M), pues en ese caso se inducía autofagia a través de un mecanismo independiente de Bax y Bak [491]. Por tanto, la única de las proteínas anti-apoptóticas evaluadas que sí sería importante para la supervivencia de las células A549 es Bcl-X_L, pues el inhibidor de esta proteína es más tóxico que los compuestos mencionados. Cabe destacar que el efecto citotóxico mostrado por ABT-737, que incluye a Bcl-X_L entre sus proteínas diana, es considerablemente menor que el producido por A-1155463, el inhibidor específico de Bcl-X_L. Posiblemente, esta diferencia se deba a cuestiones farmacodinámicas, pues la misma dosis de A-1155463 y ABT-737 no tendrá el mismo efecto sobre Bcl-X_L, ya que el primer compuesto es más potente inhibiendo a esta proteína y actuará íntegramente sobre ella, mientras que ABT-737 no es tan potente y deberá repartirse entre sus múltiples dianas, haciendo necesaria una dosis mayor de este compuesto para conseguir el mismo efecto que con el inhibidor selectivo. Esto también explicaría que la actividad citotóxica de ABT-737 sea intermedia respecto a la observada para los inhibidores selectivos de Bcl-X_L (mayor) y de Bcl-2 (menor). En el caso de las células MIA PaCa-2, la dependencia de Mcl-1 es indiscutible, pues estas células solamente ven comprometida su supervivencia cuando se exponen al inhibidor selectivo de esta proteína. Sin embargo, la función anti-apoptótica de Bcl-2 y Bcl-X_L no es relevante para estas células, tal y como atestigua la baja sensibilidad a los inhibidores específicos de ambas proteínas y el multi-inhibidor. Por último, en las células HCT-116 la supervivencia no parece sustentarse sobre una proteína anti-apoptótica en concreto, sugiriendo co-dependencia de las tres proteínas.

Estas observaciones respaldan la teoría de que la supervivencia de varios tipos de tumores sólidos se basa en Bcl-X_L y/o Mcl-1, proteínas a las que son “adictos”. Se ha descrito, por ejemplo, que los cánceres colorrectal y de vejiga son dependientes de Bcl-X_L, mientras que los cánceres hepatocelular y de mama son fundamentalmente “adictos” a Mcl-1 [93]. Si bien Bcl-2 se encuentra sobreexpresada en muchos tumores de origen hematológico debido a eventos genéticos o epigenéticos como translocaciones o mutaciones en el gen *BCL2*, Bcl-X_L y Mcl-1 se sobreexpresan a menudo en tumores sólidos como consecuencia de amplificaciones genéticas, un evento que, por el contrario, es bastante inusual en este tipo de tumores para el gen *BCL2* [93, 106]. Por tanto, estas alteraciones a nivel genético pueden conceder una valiosa ventaja a las células malignas para su supervivencia e impulsar la tumorigénesis. Concretamente, se ha descrito que Bcl-X_L y Mcl-1 se sobreexpresan en los cánceres de pulmón y de páncreas, mientras que Bcl-X_L es la única proteína anti-apoptótica sobreexpresada en el cáncer colorrectal, lo que se asocia con la aparición de resistencias y un peor pronóstico [402–405, 492]. Además, un gran número de tumores sólidos, entre los que se incluyen los cánceres gástrico, de ovario, de cérvix uterino y el melanoma, muestra co-dependencia por ambas proteínas [93]. Los resultados aquí

obtenidos podrían apuntar hacia esa dirección en el caso de las células HCT-116, pero para confirmar la posible co-dependencia se necesitan estudios donde se valore el efecto del silenciamiento génico de ambas proteínas o de la inhibición simultánea de Bcl-X_L y Mcl-1 con sus respectivos inhibidores. Otra herramienta especialmente útil en la identificación de dependencias por las proteínas anti-apoptóticas en el cáncer que podría aplicarse en este caso es la denominada *BH3-profiling*, desarrollada por el grupo de Letai [407, 493], que consiste en la exposición de las células a una serie de péptidos sintéticos de unos 20 residuos que imitan la función pro-apoptótica de las proteínas “solo-BH3” y determinar si se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y se desata la apoptosis [92].

4.3. Los miméticos BH3 y los inhibidores de Aurora quinasa activan la autofagia en células de cáncer de pulmón

La autofagia y la apoptosis son dos mecanismos cruciales que regulan del destino celular en condiciones fisiológicas y patológicas [27]. Ambas vías interactúan entre sí de manera excluyente, pues la activación de la cascada apoptótica inhibe la maquinaria autofágica, mientras que la autofagia bloquea la inducción de la apoptosis [124, 125]. De hecho, la autofagia inducida por agentes quimioterápicos aumenta el metabolismo de las células tumorales, lo que se traduce en un efecto citoprotector y en la inducción de farmacoresistencia [494]. No obstante, la activación excesiva de la autofagia o la alteración de los mecanismos asociados a este proceso provocan la muerte de las células [495].

A nivel molecular, las proteínas de la familia Bcl-2 son vitales para la regulación de ambos procesos [27]. La proteína Beclina 1, un mediador clave en la activación de la autofagia, posee un dominio de tipo BH3 filogenéticamente conservado que le permite interactuar con el bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w y Mcl-1 localizadas en el retículo endoplásmico [496]. Cuando se produce alguna de estas interacciones, Beclina 1 no puede unirse con las proteínas VPS34, VPS15, UVRAG, Ambra1 y Bif-1, quedando inhibida la inducción de la autofagia [497]. Sin embargo, los complejos formados por Beclina 1 y las proteínas anti-apoptóticas pueden disociarse mediante proteínas “solo-BH3” como Bad o BNIP3 y compuestos miméticos de BH3 como ABT-737, que compiten por el bolsillo hidrofóbico de las proteínas anti-apoptóticas, quedando libre Beclina 1 para iniciar el proceso autofágico [496, 498]. No obstante, si bien la mayoría de las proteínas “solo-BH3” parecen potenciar la vía autofágica, Bim por su parte la inhibe en condiciones basales al unirse directamente a Beclina 1 y reclutarla al complejo motor de dineína basado en microtúbulos [499]. Por todo esto, se ha querido estudiar con mayor detalle la relación existente entre los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y la autofagia en presencia de diferentes miméticos BH3, así como evaluar el potencial de alisertib y barasertib, inhibidores selectivos de las quinasas mitóticas Aurora A y B, respectivamente, para

inducir autofagia, ya que son varios los estudios que señalan la capacidad de estos compuestos de activar la ruta autofágica en diferentes tipos de células tumorales [500–503].

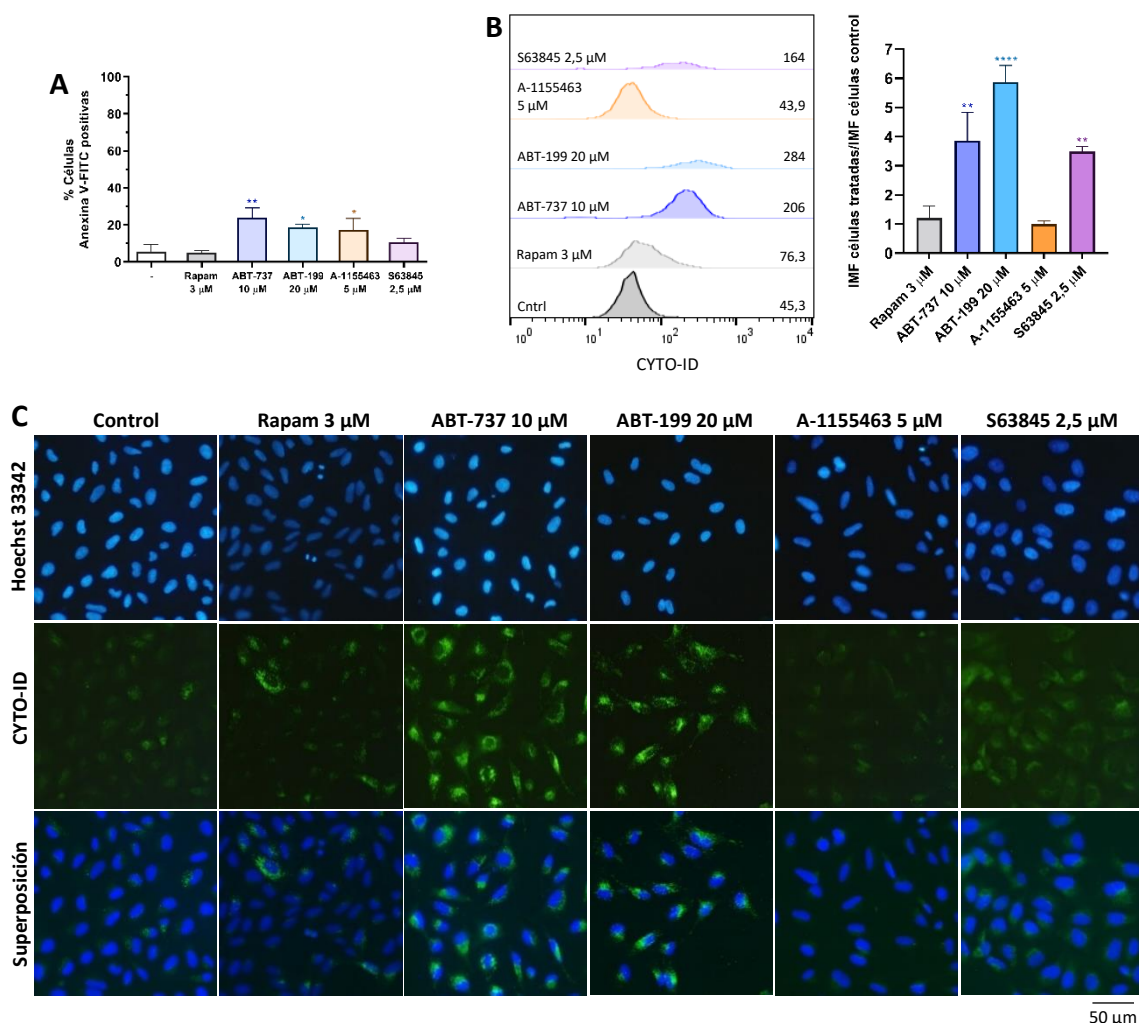


Figura 4.3 | Efecto de los miméticos BH3 sobre la vía autofágica en las células A549.

Análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se sembraron 10⁵ células en 1 ml en placas de 12 pocillos. A las 24 horas se añadieron los miméticos BH3 y rapamicina como control positivo a las dosis indicadas, y estos se incubaron durante 48 horas. Finalmente, se determinó la muerte desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-FITC (**A**) y se evaluó el flujo autofágico con el kit comercial CYTO-ID[®] por citometría de flujo (**B**) y microscopía directa de fluorescencia (**C**). Los histogramas son representativos de al menos dos experimentos independientes, y en ellos se indica la intensidad media de fluorescencia para cada tratamiento. Los resultados de citometría son la media $\pm$ SD de n=2-3 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada fármaco con respecto al control. *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001. Imágenes de microscopía directa de fluorescencia (x200) representativas de tres experimentos independientes.

Se seleccionaron concentraciones subtóxicas de los miméticos BH3 tras 48 horas de tratamiento para evitar que la muerte que estos pudieran inducir interfiriera en estos experimentos (Fig. 4.3A). Así, los ensayos de citometría con CYTO-ID muestran cambios relevantes en la intensidad media de fluorescencia relativa, concretamente con los ABTs y el inhibidor de Mcl-1 (Fig. 4.3B). Con ellos se produce un incremento de dicha intensidad respecto al control positivo

de 3 a 6 veces. La excepción se produce con A-1155463, pues en este caso la intensidad media de fluorescencia relativa es equiparable a la observada con rapamicina y las células sin tratar (Fig. 4.3B). Estos resultados indican, por tanto, que existe flujo autofágico en presencia de ABT-737, ABT-199 y S63845. Las imágenes de microscopía de fluorescencia complementan estas observaciones, pues en ellas se confirma la ausencia de muerte con cada tratamiento gracias al marcaje con la sonda nuclear Hoechst 33342, y el marcaje específico de autofagia desvela un patrón punteado muy intenso y generalizado con los ABTs, más discreto con el inhibidor de Mcl-1 e inexistente con el inhibidor de Bcl-X_L y en las células sin tratar (Fig. 4.3C). En el caso de rapamicina, un conocido inductor de autofagia que inhibe el complejo 1 de mTOR de forma incompleta [504], se percibe más heterogeneidad en el punteado, pues hay células que sí lo presentan y otras que no, lo que parece indicar que existen subpoblaciones en las que sí se estaría produciendo autofagia y otras en las que no. De hecho, según estos resultados, ABT-737 y ABT-199 serían mejores inductores de la autofagia que el control positivo. Tal vez si se aumentara la dosis de rapamicina pero sin que llegara a ser tóxica o si se sustituyera por otros inductores de autofagia más potentes como Torina 1, que inhibe ambos complejos de mTOR, esta heterogeneidad desaparecería [504].

Con el fin de ahondar en el mecanismo molecular subyacente a la activación de la autofagia que producen estos compuestos, se evaluó la expresión de proteínas críticas en la vía autofágica. Concretamente, se estudiaron: el receptor p62, que interviene en las etapas iniciales conduciendo su carga diana a la maquinaria autofágica e iniciando la formación de autofagosomas dirigidos *in situ* [122]; Beclina 1, que participa en la fase de nucleación del fagóforo [505]; y LC3B, cuya forma citosólica (LC3B-I) se conjuga reversiblemente con fosfatidiletanolamina, dando lugar a la forma lipídica LC3B-II, que se asocia de manera estable a la membrana del autofagosoma, donde interacciona con otras proteínas autofágicas al inicio, incluida p62, y más tarde participa en el transporte del autofagosoma [506].

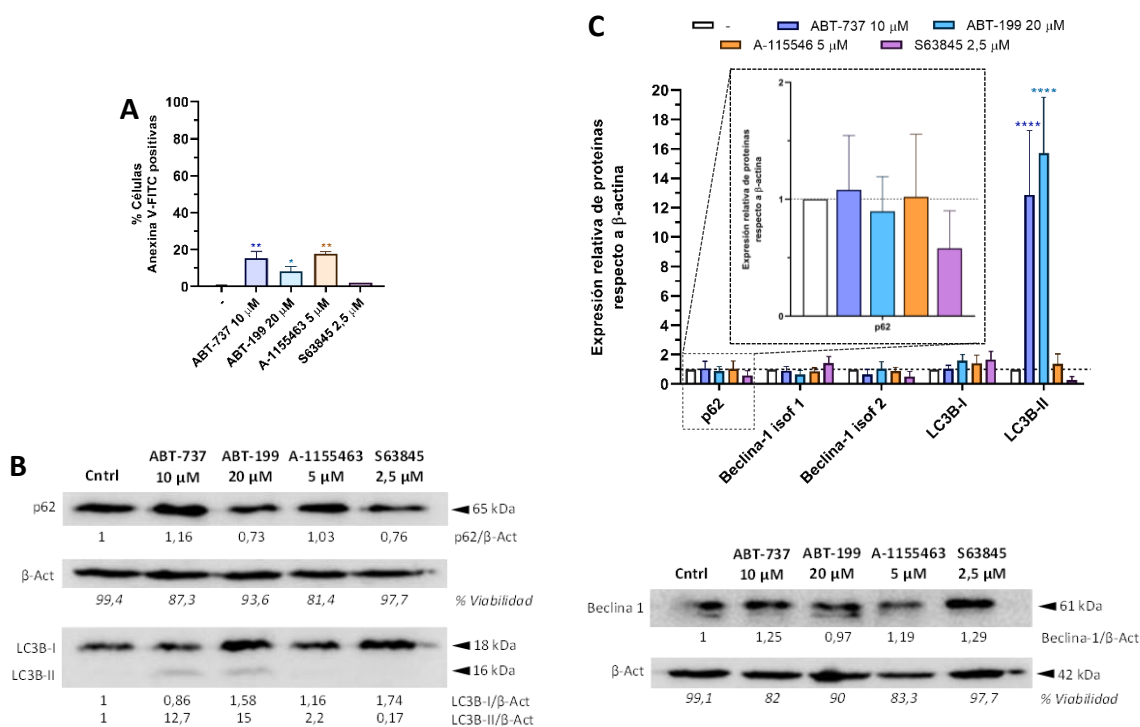


Figura 4.4 | Efecto de los miméticos BH3 sobre la vía autofágica en las células A549. Expresión de proteínas implicadas en el proceso autofágico.

Se sembraron entre $5 \cdot 10^5$ y 10^6 células en 5 ml en frascos de cultivo de 25 cm² para cada condición, y tras 24 horas se adicionaron los miméticos BH3 a la concentración indicada, los cuales se dejaron actuar durante 48 horas. A continuación, se determinó la muerte celular provocada por cada tratamiento mediante Anexina V-FITC y citometría de flujo (A) y se prepararon extractos celulares de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Finalmente, se evaluó la expresión de las proteínas indicadas, utilizando β -actina como control de carga (B), y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto a β -actina (C). Imágenes representativas de n=3-6 experimentos independientes. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones. Los resultados de citometría y de la cuantificación son la media $\pm$ SD de n=3-6 experimentos independientes. Para la muerte celular se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada compuesto respecto al control, y para la cuantificación se ha llevado a cabo el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando la cuantificación de cada proteína para cada tratamiento respecto a su estado basal (control). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Si la vía autofágica canónica se activa, Beclina 1 se expresa, los niveles de LC3B-II aumentan y p62 disminuye al degradarse en los autolisosomas [507, 508]. En vista de los resultados obtenidos por *Western Blot* (Figs. 4.4B y C), Beclina 1 se expresa con todos los tratamientos sin experimentar variaciones importantes. Por su parte, p62 y LC3B-II tampoco experimentan cambios significativos en su expresión debido a la acción de A-1155463. En cambio, la exposición a ABT-737 y ABT-199 induce la expresión de la forma lipídica de LC3B, aunque p62 apenas sufre alteraciones en su expresión. Para comprobar si los niveles de p62 disminuyen finalmente con estos compuestos habría que prolongar los tratamientos, por ejemplo, hasta 72 horas, y determinar entonces la expresión de esta proteína. Finalmente, con el inhibidor

de Mcl-1 se produce una caída en los niveles de p62, aunque no llega a ser estadísticamente significativa, pero no se detecta LC3B-II. No obstante, la menor expresión de p62 con este compuesto sugiere que LC3B se estaría procesando, y quizá con un mayor tiempo de exposición de la membrana se podría observar la banda de LC3B-II, pues durante el proceso autofágico normal la caída de p62 ocurre más o menos simultáneamente a la lipidación de LC3B [507]. Sin embargo, otra explicación a este resultado podría radicar en variables incontroladas, ya que cada experimento se realizó en momentos diferentes, y factores como los múltiples pases realizados para mantener las células en cultivo podrían alterar de alguna manera el proteoma de la familia Bcl-2, afectando a la inducción de autofagia. Por ello, sería conveniente repetir los ensayos con S63845 aplicando los cambios sugeridos para poder concluir si es capaz de inducir autofagia.

En general, los resultados desprendidos de cada tipo de ensayo se complementan y correlacionan entre sí. Todos ellos apuntan a que los ABTs activarían la vía autofágica, pero esta sería deficiente y no llegaría a culminar, tal y como reflejan la expresión de la forma lipidada de LC3B y la no degradación de p62. En el caso del inhibidor de Mcl-1 es posible que la autofagia se esté completando aunque no se detecte LC3B-II, pues la expresión de p62 parece disminuir y el marcaje con CYTO-ID indica que existe flujo autofágico, aunque habría que confirmar esta hipótesis. Sin embargo, los resultados con el inhibidor de Bcl-X_L parecen indicar que este compuesto no induce autofagia.

Existen numerosos estudios que respaldan la hipótesis de que las proteínas de la familia Bcl-2 y la autofagia están interconectadas. Por ejemplo, varios estudios realizados también en células A549 proponen que el mimético BH3 (-)-gospol activa la vía autofágica dependiente de Atg5 y de Beclina 1 al bloquear la interacción Bcl-2/Beclina 1 y regular negativamente Bcl-2 y positivamente la transcripción de Beclina 1 [509]. Además, *Cai et al.* demostraron que gospol acetato, la fórmula de gospol más común en la clínica, activa la autofagia a través de la vía de señalización AMPK/mTORC1/ULK1 en células A549 y HCT-116 [510]. Otros miméticos BH3 como SM3 y AT-101 activarían la autofagia, también en A549, debilitando la interacción de Beclina 1 con Bcl-2 y Bcl-X_L, respectivamente, y la autofagia inducida por AT-101 estaría asociada con la inhibición de mTOR [511, 512]. Analizando otros estudios en los que se emplean los miméticos BH3 utilizados en esta tesis se desprende que ABT-737 interrumpe el complejo formado por Beclina 1 y Bcl-2 y que la autofagia activada implica las vías de AMPK, mTOR e IKK; que ABT-199 provoca la conversión de LC3-I a LC3-II, la disociación del complejo Bcl-2/Beclina 1, la formación del complejo Beclina 1/VPS34 y la activación de la vía JNK-Akt en células HCT-116 Bax/Bak KO; y que A-1155463 provoca la caída de p62 y regula positivamente Beclina 1 y LC3B-II, activando la autofagia en células malignas de mesotelioma pleural, mientras que en células mesoteliales normales no se observa variación en la conversión de LC3B-I a LC3B-II respecto al control [513–516]. Hasta la fecha no se ha evaluado el efecto

sobre la autofagia de miméticos BH3 dirigidos específicamente contra Mcl-1, pero se sabe que esta proteína interviene en la regulación de la mitofagia, y su inhibición podría resultar en la activación de la apoptosis o de la autofagia en función de los niveles de Beclina 1 y otras proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [517]. En este sentido, se ha visto que inhibidores multiquinasa como sorafenib y SC-59 disocian el complejo Mcl-1/Beclina 1 e inducen muerte dependiente de autofagia mediante un mecanismo dependiente de SHP-1/STAT3 tanto *in vitro* como *in vivo* [518].

Por el contrario, las investigaciones de *Lindqvist et al.* demostraron que los niveles de autofagia no aumentaban en presencia de ABT-737 ni disminuían cuando se sobreexpresaban las proteínas anti-apoptóticas en células carentes de Bax y Bak, lo que les llevó a suponer que la interacción entre Beclina 1 y las proteínas anti-apoptóticas no se produce en condiciones fisiológicas, o que si tiene lugar, no es lo suficientemente intensa como para inhibir la función autofágica de Beclina 1 [519]. En cambio, *Reljic et al.* apuestan por un modelo en el que la inhibición de proteínas anti-apoptóticas y la liberación de Bax y Bak desencadenan la activación de la autofagia a través de un mecanismo todavía desconocido pero que no implica la disociación del complejo Beclina 1/Bcl-2 [491]. Además, los autores de dicho estudio observan que ABT-737 induce este efecto a concentraciones muy superiores a las necesarias para inducir muerte [491]. Sin embargo, nuestros resultados evidencian que este compuesto y otros miméticos BH3 son capaces de activar la autofagia cuando se usan a concentraciones poco tóxicas. No obstante, es posible que el modelo de estudio empleado en ambos trabajos haya influido en los efectos observados, pues en el citado estudio utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), células de timoma de ratón y las células de carcinoma de colon humanas HCT-116 [491], mientras que en este trabajo se han usado las células de carcinoma de pulmón humanas A549. En vista de los resultados del mencionado estudio, sería interesante averiguar si los compuestos utilizados en esta tesis son capaces de activar la autofagia en otros tipos celulares de tumores sólidos, como pueden ser las MIA PaCa-2 (células tumorales pancreáticas), y determinar si Bax y Bak están implicadas en dicho proceso aprovechando que el grupo de investigación posee células MIA PaCa-2 deficientes en ambas proteínas pro-apoptóticas.

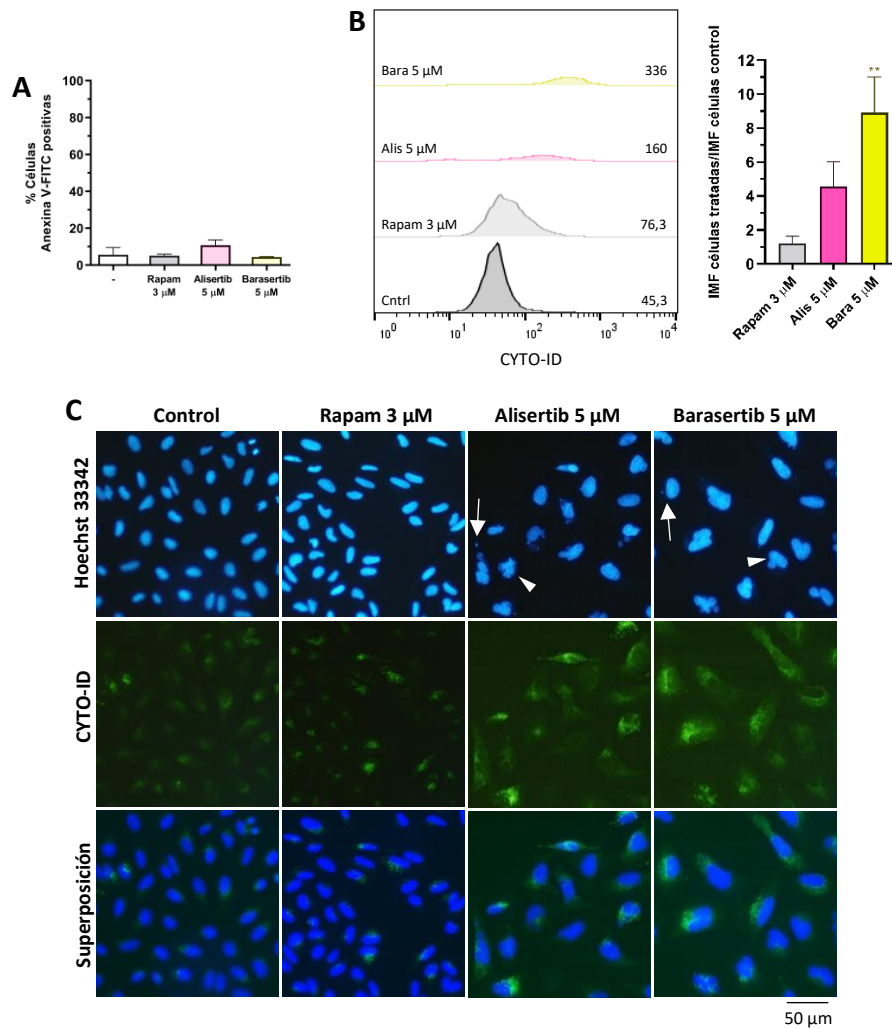


Figura 4.5 | Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la vía autofágica en las células A549. Análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Se sembraron 10^5 células en 1 ml en placas de 12 pocillos. A las 24 horas se añadieron los inhibidores de Aurora quinasa y rapamicina como control positivo a las dosis señaladas, y estos se incubaron durante 48 horas. Finalmente, se determinó la muerte desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-FITC (**A**) y se evaluó el flujo autofágico con el kit comercial CYTO-ID® por citometría de flujo (**B**) y microscopía directa de fluorescencia (**C**). Los histogramas son representativos de al menos dos experimentos independientes, y en ellos se indica la intensidad media de fluorescencia para cada tratamiento. Los resultados de citometría son la media $\pm$ SD de n=2-3 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada inhibidor con respecto al control. $**p < 0,01$. Imágenes de microscopía directa de fluorescencia (x200) representativas de tres experimentos independientes. Las flechas blancas señalan células con micronúcleos y los triángulos blancos muestran células multinucleadas.

Análogamente a los miméticos BH3, se seleccionaron concentraciones subletales de los inhibidores de Aurora quinasa (Fig. 4.5A). Los resultados derivados de la citometría revelan que alisertib y barasertib incrementan, aproximadamente, 5 y 10 veces la intensidad media de fluorescencia relativa respecto a rapamicina, respectivamente (Fig. 4.5B). Las imágenes de microscopía (Fig. 4.5C), por su parte, ponen de relieve el buen estado en el que se encontraban

las células no tratadas y las sometidas a rapamicina, así como el aumento del tamaño y la alteración de la morfología nuclear que sufren habitualmente las células en presencia de los inhibidores de Aurora A y B cuando se tiñen con Hoechst 33342. Estas alteraciones se caracterizan por la formación de morfologías nucleares aberrantes que incluyen la multinucleación y la micronucleación [520, 521]. Respecto al marcaje específico de autofagia, es posible distinguir el patrón punteado muy marcado y generalizado con alisertib y barasertib, mientras que este apenas se aprecia en las células control y, al igual que antes, es heterogéneo en las células tratadas con rapamicina. Además, el hecho de que este punteado se distribuya por todo el citoplasma también permite intuir el notable incremento del tamaño celular tras la exposición a los fármacos, el cual podría haber contribuido, en parte, al aumento de la intensidad media de fluorescencia relativa registrada. No obstante, el conjunto de resultados apunta a la formación de autofagosomas tras el tratamiento con los inhibidores de Aurora quinasa, siendo barasertib un inductor más potente, aunque sería conveniente complementar nuestros resultados con estudios adicionales que evalúen la expresión de proteínas autofágicas.

Son numerosos los estudios que informan de que alisertib impulsa la autofagia inhibiendo principalmente la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y modulando la vía de p38 MAPK o la AMPK en células de osteosarcoma, glioblastoma, melanoma, cáncer hepatocelular, gástrico, de ovario y de mama [501, 522–527]. Del mismo modo, se ha descrito que danusertib, un pan-inhibidor de Aurora quinasa, activa la autofagia en células de carcinoma hepatocelular al inhibir la vía de PI3K/Akt/mTOR, mientras que en células de cáncer de mama activa las vías p38 MAPK y Erk1/2 e inhibe la vía Akt/mTOR [528]. Finalmente, el pan-inhibidor VX-680 (tozasertib) inactiva mTOR y RPS6KB1, el cual interviene más adelante en la vía de señalización [529, 530]. Por el contrario, hasta el momento no existen estudios que reflejen la capacidad de inducir autofagia de inhibidores específicos de Aurora B como barasertib en tumores sólidos, aunque hay estudios que señalan que el silenciamiento de esta quinasa fomenta la autofagia mediante la regulación negativa de la vía de señalización de mTOR/ULK1 en osteosarcoma, bloqueando su potencial metastático [531].

En definitiva, de los resultados de este trabajo se puede deducir que los fármacos ensayados a las concentraciones testadas no provocan una muerte celular excesiva, pero sí que generan cierto nivel de estrés en las células A549, activando la mayoría de ellos la autofagia para tratar de compensarlo. Concretamente, avalan que los miméticos BH3 ABT-737, ABT-199 y, posiblemente, S63845 son capaces de inducir autofagia en estas células, mientras que A-1155463 no poseería dicha capacidad. Por otra parte, alisertib y barasertib también activarían la ruta autofágica, aunque son necesarias nuevas investigaciones para desvelar si esta consigue llegar a término. Igualmente, se requieren más estudios para esclarecer el mecanismo mediante el cual estas familias de compuestos modulan dicha vía.

4.4. Mecanismo de acción de inhibidores de Hsp90 en células de cáncer de pulmón

La proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90), una chaperona ubicua que media en el plegamiento, la estabilización y la degradación de más de 400 proteínas cliente, desempeña funciones pleiotrópicas en las células, ya que interviene en procesos celulares y vías reguladoras esenciales como la apoptosis, la supervivencia y diferenciación celulares, la respuesta a estrés celular o la inducción de inmunidad adaptativa, entre otros [532–534]. Hsp90 se encuentra regulada positivamente en muchos tipos de cáncer y se relaciona con todas las señas de identidad del cáncer, ya que muchas de sus proteínas cliente son oncoproteínas [408, 535]; sin embargo, algunos tejidos normales como el bazo, el cerebro o la vejiga también poseen niveles elevados de esta proteína, pero en estos casos no implica tumorigénesis [534]. En este sentido, se ha propuesto que Hsp90 presenta conformaciones distintas en células sanas y células tumorales, siendo la forma que se expresa en estas últimas la que muestra mayor afinidad por fármacos inhibidores [534]. Puesto que uno de los tipos de cáncer en los que Hsp90 se sobreexpresa es el de pulmón [408], se decidió estudiar el efecto y el mecanismo de acción de dos inhibidores de esta chaperona en las células A549: 17-AAG (tanespimicina) y KW-2478, un inhibidor de segunda generación que solventa las limitaciones de solubilidad y hepatotoxicidad que presenta 17-AAG [536].

4.4.1. Estudio de la sensibilidad de células de cáncer de pulmón a inhibidores de Hsp90

En primer lugar, se evaluó el potencial citotóxico de ambos inhibidores a 24, 48 y 72 horas en la línea celular mencionada.

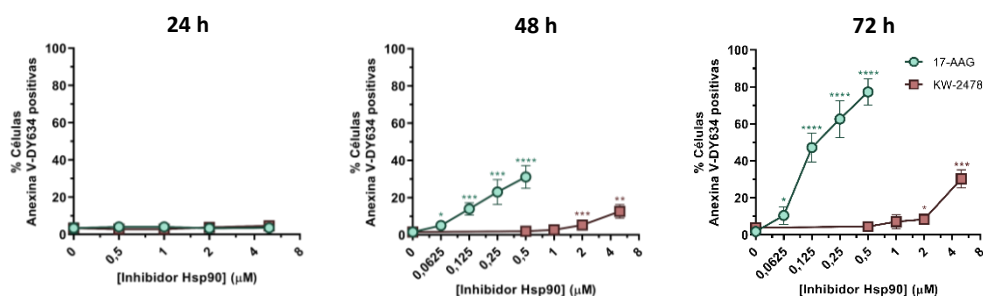


Figura 4.6 | Sensibilidad de las células A549 a los inhibidores de Hsp90. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células A549 en 500 μ l en placas de 24 pocillos. 24 horas después se añadieron concentraciones crecientes de los inhibidores de Hsp90 (0-5 μ M) y estos se incubaron durante los tiempos indicados. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte celular inducida por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-4$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* desapareado de dos colas, comparando cada concentración de cada inhibidor respecto a su control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las gráficas de la Figura 4.6 desvelan que la actividad antitumoral de los inhibidores de Hsp90 en las células A549 incrementa de manera gradual con el tiempo y la dosis, un

comportamiento que también se advirtió en la visualización de las células al microscopio invertido previa al análisis por citometría (datos no mostrados). Ambos compuestos son inocuos tras 24 horas de tratamiento a las concentraciones testadas, pero a partir de las 48 horas ya comienzan a ser citotóxicos, aunque a diferentes niveles. 17-AAG resulta nocivo para, alrededor del 30 % y el 80 % de las células tras 48 y 72 horas de incubación con la concentración más elevada, respectivamente, mientras que KW-2478 a la dosis máxima (5 μ M) y a los mismos tiempos produce la muerte de, aproximadamente, el 10 y el 30 % de las células. Resulta llamativa la respuesta tan dispar de las células con cada uno de ellos a la dosis de 0,5 μ M, sobre todo a las 72 horas de tratamiento, pues en estas condiciones 17-AAG es mucho más tóxica que KW-2478. Los datos sugieren, por tanto, que 17-AAG es un agente antitumoral mucho más potente que KW-2478 en las células A549.

Hsp90 posee cuatro isoformas principales conocidas, dos de ellas citosólicas (Hsp90 α y Hsp90 β), una localizada en el retículo endoplásmico (Grp94) y otra en la matriz mitocondrial (Trap1) [537, 538]. Aunque funcionalmente son distintas, todas ellas comparten dominios sumamente conservados con una identidad de secuencia que supera el 50 %. Ejemplo de ello es su dominio N-terminal, hasta el punto de que en esta región las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β se diferencian en únicamente dos residuos [537]. Esta elevada homología ha contribuido a que la mayoría de los inhibidores de Hsp90 que se han desarrollado vayan dirigidos contra este dominio, lo que se relaciona con su actuación como pan-inhibidores, pero ha supuesto un obstáculo en el desarrollo de inhibidores que neutralicen a una isoforma en concreto [537]. De los inhibidores empleados en este trabajo, 17-AAG es un pan-inhibidor y KW-2478 inhibe específicamente a Hsp90 α [539, 540]. Por otro lado, la isoforma Hsp90 β se expresa de manera constitutiva, correlaciona notablemente con la formación y progresión de algunos tipos de cáncer y puede estar ligada al desarrollo de resistencias terapéuticas, mientras que Hsp90 α se induce en situaciones de estrés y puede ser secretada vía exosomas, aunque las células tumorales la secretan constitutivamente, favoreciendo la progresión, invasión y migración tumorales [537–539]. Esta selectividad de los compuestos y los distintos patrones de expresión de las isoformas α y β podrían explicar el potencial citotóxico tan desigual que exhiben estos compuestos, pues 17-AAG al actuar como pan-inhibidor puede alterar muchas más vías de señalización que KW-2478. No obstante, pese a que los pan-inhibidores han demostrado ser potentes y eficaces eliminando células tumorales a nivel preclínico, los ensayos clínicos reflejan limitaciones sustanciales, como malas propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, y toxicidades limitantes de la dosis como hepatotoxicidad o toxicidad ocular, posiblemente asociadas a su falta de selectividad por una isoforma, impidiendo todo ello su uso clínico [537, 539].

4.4.2. Los inhibidores de Hsp90 inducen arresto mitótico en células de cáncer de pulmón

El hecho de que la capacidad citotóxica de los compuestos sea nula a las 24 horas y que esta sea de escasa a moderada a las 48 horas y elevada a las 72 horas de tratamiento con 17-AAG, pero solo modesta con KW-2478 puede ser indicativo de que estos compuestos intervienen a otros niveles, por ejemplo, provocando la parada del ciclo celular en alguna de sus fases. Es por ello por lo que se decidió averiguar si estos inhibidores alteraban el ciclo celular de las células A549 a corto, medio y largo plazo.

Los resultados confirman el potencial citotóxico observado en el apartado anterior (Fig. 4.7C) a la vez que reflejan el comportamiento esperado en las células no tratadas y una parada del ciclo en la fase G2/M, más o menos pronunciada, con todas las dosis testadas de los inhibidores a cualquier tiempo (Figs. 4.7A y B). Las células no tratadas presentan el patrón de ciclo celular típico para las células sanas que les permite crecer de manera exponencial. La mayoría de ellas (en torno al 70 %) se localizan en la fase G0/G1, la fase de mayor duración del ciclo si se toma como referencia el ciclo celular de una célula humana típica de rápida división, donde las células son metabólicamente activas y crecen sin llegar a duplicar su material genético [541]. El resto de las células se encuentran replicando su DNA en la fase S o continúan creciendo y preparándose para la mitosis o llevándola a cabo en la fase G2/M (alrededor del 15 % en cada fase).

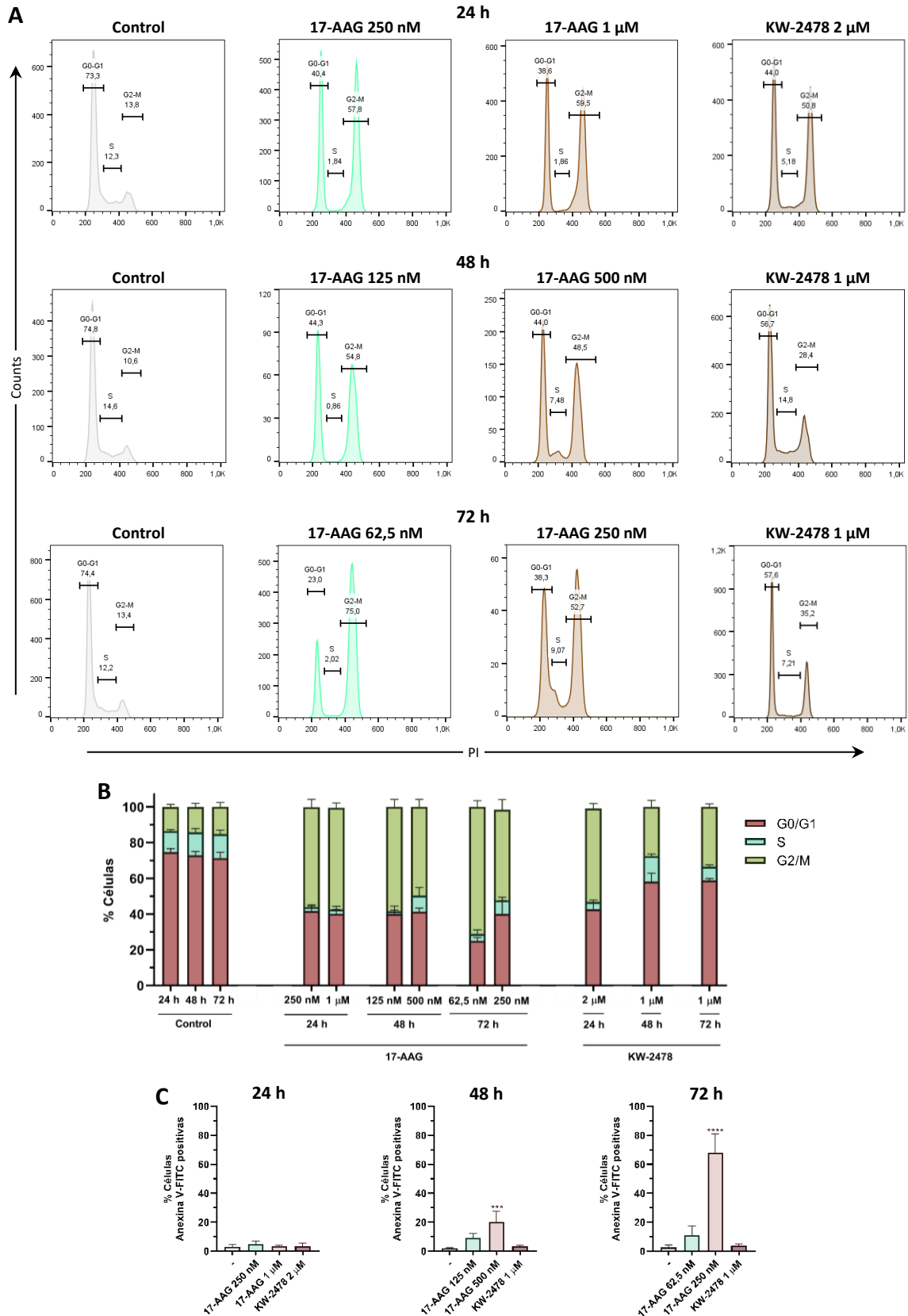


Figura 4.7 | Ciclo celular de las células A549 expuestas a los inhibidores de Hsp90 a 24, 48 y 72 horas. (A) Histogramas representativos de al menos tres ensayos independientes. **(B)** Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular a cada tiempo evaluado. **(C)** Muerte celular provocada por los compuestos a las concentraciones ensayadas y los tiempos indicados. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^5$ células en 3 ml en placas de 6 pocillos y a las

24 horas se adicionaron los inhibidores de Hsp90 a las concentraciones señaladas. Tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento, se determinó la muerte inducida por cada concentración de cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo, y las células se marcaron con yoduro de propidio según se indica en la sección 3.5 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-6$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de cada fármaco respecto al control. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Sin embargo, los tratamientos modifican esta distribución, ralentizando la progresión del ciclo celular debido a su detención en la fase G2/M desde las 24 horas que, por lo general, va en detrimento de las poblaciones localizadas en las fases G0/G1 y S. A tiempos de 24 horas, ambos compuestos no inducen muerte, pero sí hacen que casi el 60 % de las células se acumulen en la fase G2/M. Si se reduce la dosis de KW-2478 a la mitad y este se incuba durante 48 y 72 horas, el compuesto sigue siendo inocuo para las células y se observa que la parada inducida es más discreta que la observada a las 24 horas, probablemente porque la dosis empleada es menor. En el caso de 17-AAG, este es más efectivo que KW-2478 provocando la detención del ciclo a tiempos largos, pues con concentraciones en el rango nanomolar se observa un mayor porcentaje de células en dicha fase ($\approx 50-70$ % frente a $\approx 30-35$ %, aproximadamente), a pesar de que después de 72 horas de incubación a 250 nM resulta altamente tóxico para las células. De hecho, en el histograma correspondiente a este tratamiento (Fig. 4.7A) se puede distinguir un “hombro” en la población localizada en la fase S, que podría representar a una parte de la población que ha muerto mientras duplicaba su DNA, pero no llega a considerarse una población hipodiploide. Por lo tanto, es posible que en esta situación convivan los potenciales citostático y citotóxico del compuesto, mientras que a la dosis de 62,5 nM el efecto citostático sería el principal, ya que la parada del ciclo es más prominente y la viabilidad celular no se ve comprometida.

En definitiva, estos resultados reflejan que los inhibidores de Hsp90 impulsan la parada del ciclo celular en la fase G2/M, donde las células poseen una dotación cromosómica de $4n$, pero no se produce endorreduplicación, que daría lugar a células con dotaciones cromosómicas de $8n$ y superiores. No obstante, el marcaje con yoduro de propidio no permite distinguir si las células se mantienen retenidas en mitosis o si se ha producido el deslizamiento mitótico y han entrado en senescencia, puesto que en ambas situaciones la dotación cromosómica de las células es de $4n$. Para salir de dudas, habría que utilizar marcadores específicos de este estado, como la medición de la actividad SA β -gal o evaluar la expresión de proteínas que varían sus niveles a lo largo del ciclo celular. Tal es el caso de las ciclinas D1, A y B1, que alcanzan sus máximos de expresión en las fases G1, G2 y M, respectivamente [542].

Esta detención en fase G2/M no es el único efecto conocido sobre el ciclo celular como consecuencia de la inhibición de Hsp90. De hecho, su bloqueo puede perturbar el ciclo a distintos niveles, puesto que numerosas proteínas que regulan la progresión de este evento celular son

proteínas cliente de Hsp90 [543]. Así lo corroboran múltiples estudios, que reportan la interrupción del ciclo celular en cualquiera de sus fases bajo los efectos de distintos inhibidores de Hsp90. Por ejemplo, geldanamicina provocaba el arresto en G1 a través de la modulación de pRb, el factor de transcripción E2F1 y el complejo ciclina D1/Cdk4 en células de cáncer de vejiga [544]. Otros inhibidores, concretamente AUY922 y HSP990, sin embargo, llevaban a la parada en G2/M en células tumorales pancreáticas neuroendocrinas [545]. Análogamente, 17-AAG en solitario o combinada con irradiación, reducía los niveles de CDC25c y CDK1 en células de cáncer de pulmón, incluidas las A549, haciendo que el ciclo se detuviera en la fase G2/M [546], mientras que en células de mesotelioma pleural maligno suprimía la vía Akt y provocaba el arresto en G0/G1 o G2/M, tal vez en función del efecto neto de la inhibición de las proteínas implicadas [547]. KW-2478 también se ha descrito que induce la parada en G2/M debido a la caída de la expresión de ciclina B1 y la sobreexpresión de p21 y p27, ambos inhibidores de la función de los complejos ciclina B1/CDK1 [540]. Por el contrario, otro estudio reveló que este compuesto alteraba mínimamente el ciclo de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, provocando una sutil aumento de la población celular en la fase G1 en las células A549 y en la fase G2 en células H1975 [548], lo que contrasta con nuestros resultados.

Pese a que investigaciones de este tipo han desvelado ciertos aspectos del mecanismo de acción de estos inhibidores, algunas de ellas son contradictorias. Por ejemplo, los resultados del presente trabajo y los obtenidos por *Li et al.* discrepan en la fase del ciclo en la que KW-2478 induce la parada del ciclo tras 72 horas de exposición [548]. Por otro lado, *Münster et al.* sugieren que la detención en G1 se produce en células que contienen la proteína del retinoblastoma intacta, y en aquellas que no la expresan la parada se induce en la fase G2/M, mientras que *Schwock et al.* detectaron un arresto en G2/M en células normales, inmortalizadas y tumorales provenientes del cuello uterino, independientemente del estado de partida de esta proteína [549]. Por tanto, contraposiciones como estas evidencian que todavía queda mucho camino por recorrer en este sentido, al igual que es lógico asumir que todavía se desconocen todos los efectos que esta inhibición puede acarrear. No obstante, con la ayuda de próximos estudios será más factible desenmascarar su mecanismo de acción y conseguir desarrollar nuevos inhibidores que presenten una ventana terapéutica mejorada que les permita ser tenidos en cuenta en la clínica.

4.4.3. Los inhibidores de Hsp90 no inducen senescencia en células tumorales de pulmón

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado anterior, en el que ha quedado patente que las células A549 detienen el ciclo celular en la fase G2/M en presencia de los inhibidores de Hsp90 17-AAG y KW-2478, se pensó que estos compuestos podían conducir a las células a un estado senescente, al igual que sucede con barasertib [418, 426]. Para comprobarlo, este

compuesto se utilizó como control positivo y las células se trataron siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6 de Materiales y métodos, relativo a la inducción del fenotipo senescente, y se midió la actividad SA β -gal (Fig. 4.8A).

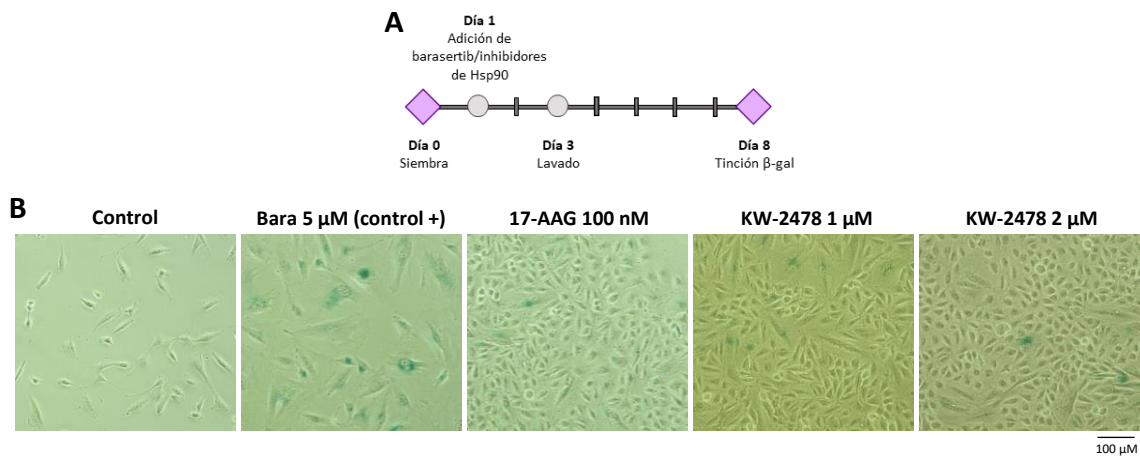


Figura 4.8 | Detección de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia en las células A549 tratadas con inhibidores de Hsp90. (A) Línea temporal que representa de forma cronológica el tratamiento al que fueron sometidas las células. Brevemente, se sembraron en 1 ml en placas de 12 pocillos 10^3 células que no se trataron y $3 \cdot 10^4$ células que fueron expuestas a los inhibidores de Hsp90 o barasertib (control positivo) a las dosis indicadas durante 48 horas. A continuación, el medio se sustituyó por 1 ml de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, se evaluó la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia **(B)** según lo descrito en el apartado 3.6 de Materiales y métodos. Finalmente, se tomaron imágenes de las células transcurridas 24 horas desde la tinción. Imágenes de microscopía invertida (x100) representativas de tres experimentos independientes.

La Figura 4.8B refuta nuestra hipótesis, pues si bien las células tratadas con barasertib se coloreaban de azul y presentaban la morfología característica de las células senescentes, la cantidad de células que presentaban estas características cuando se exponían a los inhibidores de Hsp90 era escasa, y predominaban las células sin colorear y con una morfología similar a las células no tratadas. No obstante, aquellas que se encontraban teñidas presentaban una morfología compatible con el fenotipo senescente, que podría deberse a que en los cultivos siempre existe un porcentaje mínimo de células senescentes o a que los compuestos inducen un muy bajo nivel de senescencia. En cualquier caso, estos resultados permiten afirmar que la senescencia no es un destino final común que las células A549 adopten tras la exposición a 17-AAG y KW-2478.

Teniendo en cuenta que las células se sembraron a una densidad relativamente baja dada la larga duración de los experimentos, se observa que la densidad celular tras el tratamiento con los inhibidores de Hsp90 es elevada y mayor que la de las células control. Esto se debe a que estas últimas se sembraron a una densidad un orden de magnitud menor que las tratadas para garantizar su correcto crecimiento. Dejando a un lado esta puntualización, la alta densidad celular tras los tratamientos sugiere que las células recuperan su capacidad proliferativa tras la retirada de los fármacos. Para confirmar esta teoría, se evaluó el ciclo celular de las células tras cinco días en

cultivo desde la eliminación de los fármacos y, durante este tiempo, se realizó un seguimiento de la evolución del estado de las células al microscopio invertido (Fig. 4.9A).

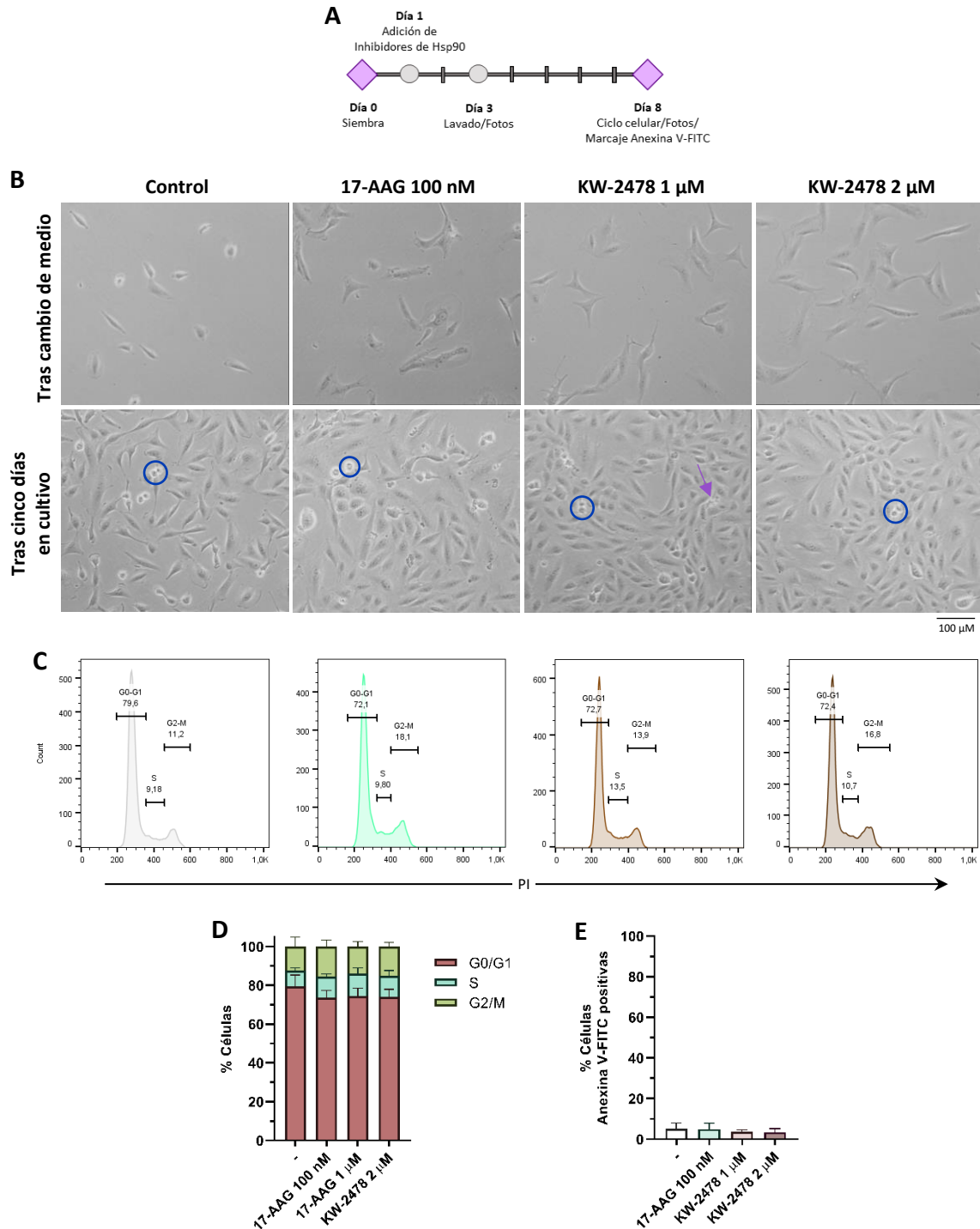


Figura 4.9 | Ciclo celular de las células A549 tras cinco días en cultivo después de la retirada de los inhibidores de Hsp90. (A) Línea temporal que representa de forma cronológica el tratamiento al que fueron sometidas las células. Brevemente, en placas de 6 pocillos y en un volumen de 5 ml se sembraron $2 \cdot 10^4$ células control y $6 \cdot 10^4$ células que fueron expuestas a los inhibidores de Hsp90 a las dosis indicadas durante 48 horas. A continuación, el medio se reemplazó por 5 ml de medio fresco, se tomaron imágenes de cada condición y las células se dejaron cinco días en cultivo. Tras este tiempo, se volvieron a tomar fotografías de las células, se determinó la muerte desencadenada por cada concentración de cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo, y las células

se marcaron con yoduro de propidio según el protocolo descrito en la sección 3.5 de Materiales y métodos. **(B)** Evolución de las células A549 mantenidas en cultivo durante cinco días tras la eliminación de los inhibidores de Hsp90 del medio de cultivo. Imágenes de microscopía invertida (x100) representativas de tres experimentos independientes. **(C)** Histogramas representativos de al menos cinco ensayos independientes. Los círculos azules muestran células en mitosis y la flecha púrpura señala una célula apoptótica. **(D)** Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular con cada tratamiento. **(E)** Muerte celular provocada por los compuestos a las concentraciones ensayadas. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=5-6$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de cada fármaco respecto al control.

El conjunto de datos expuestos en la Figura 4.9 corrobora nuestra segunda hipótesis. Por un lado, las imágenes de la Figura 4.9B atestiguan el crecimiento celular con el transcurso de los días y en ellas es posible identificar células en división en todos los escenarios evaluados, indicativo de que las células proliferaban una vez eliminados los fármacos. Además, si se comparan las imágenes tomadas al cambiar el medio y al finalizar los experimentos, se observan diferencias en el aspecto que mostraban las células que habían sido tratadas con los inhibidores, mientras que esto no sucedía en las células control. Concretamente, las células presentaban una morfología alargada, aplanada e irregular, además de un tamaño celular mayor que el de las células control, fruto de la detención del ciclo en la fase G2/M que estas células sufren al ser expuestas a estos compuestos a las dosis ensayadas o similares, tal y como se ha descrito en la sección anterior; sin embargo, después de cinco días en cultivo en ausencia de los compuestos, las células exhibían un tamaño y morfología celulares equivalentes a los de las células control. Por otra parte, las Figuras 4.9C-E demuestran que la viabilidad de las células era superior al 90 % al finalizar los experimentos (Fig. 4.9E) y que, en ese momento, las células que habían sido sometidas a 17-AAG y KW-2478 exhibían un patrón de ciclo celular muy similar al de las células control, en el que al menos el 70 % de las células se encontraban en la fase G0/G1, alrededor de un 10 % se localizaban en la fase S y el 10-15 % restante permanecía en la fase G2/M (Figs. 4.9C y D), lo que certifica que las células se encontraban en fase de crecimiento exponencial al concluir los experimentos.

Por lo general, se asume que la inhibición farmacológica de Hsp90 da lugar a una detención del ciclo celular transitoria y reversible en células normales [543, 550]. En el caso de las células tumorales, *Restall & Lorimer* encontraron que geldanamicina inducía un efecto reversible a dosis iguales o inferiores a 50 nM en células de cáncer de pulmón de células pequeñas, permitiendo a las células recuperar su capacidad proliferativa tras el tratamiento, e irreversible cuando la dosis era de 100 nM, ya que en esta ocasión las células no proliferaban incluso pasados 30 días desde la eliminación del fármaco. Esta irreversibilidad también la detectaron con otros inhibidores de la familia, concretamente 17-AAG y radicicol. Así, con estos resultados y ensayos adicionales, los autores concluyeron que los inhibidores de Hsp90 utilizados a concentraciones que inhiben Hsp90 citosólico conducían a un estado de senescencia prematura. No obstante, la respuesta a estos

fármacos es específica del tipo celular estudiado, ya que células de glioblastoma proliferaban tras el tratamiento con geldanamicina incluso a concentraciones 10 veces superiores a las testadas en las células de cáncer de pulmón. Por otro lado, en algunas ocasiones detectaron que una parte de las células comenzaban a proliferar pasados 40 días desde la retirada de geldanamicina, y propusieron que la ausencia de expresión de p21 podría estar detrás de la evasión de dicho estado senescente [550]. Kanugovi Vijayavittal & Amere Subbarao, por su parte, demostraron que 17-AAG inducía senescencia prematura en células epiteliales del cristalino y en células A549 que sobreexpresaban el oncogen RAF^{CAAX} a través de la activación de la respuesta a daño en el DNA, y que en modelos de xenoinjerto de ratones atímicos la senescencia inducida por el fármaco actúa como mecanismo oncosupresor [551]. Además, un trabajo anterior del grupo de Amere Subbarao también había demostrado que la exposición a 17-AAG previamente a doxorrubicina inducía senescencia prematura en células de neuroblastoma y esta era irreversible [552].

Retornando al presente estudio y tomando en consideración los resultados obtenidos aquí y los mostrados en el apartado anterior, se puede deducir que las células A549 tratadas durante 48 horas con los inhibidores de Hsp90 experimentan una parada del ciclo celular en la fase G2/M, pero el efecto de estos compuestos es reversible, ya que estos tratamientos no inducen la entrada en senescencia, sino que las células son capaces de recuperar su capacidad proliferativa en ausencia de los fármacos. Para determinar si este efecto se da únicamente en estas células o, por el contrario, se trata de una respuesta habitual de las células tumorales a estos fármacos, sería conveniente llevar a cabo los mismos ensayos en otros tipos de células tumorales. Asimismo, la profundización en los mecanismos moleculares subyacentes a este comportamiento permitiría una mejor comprensión del mecanismo de acción de estos compuestos; en este sentido, también resultaría interesante indagar en las rutas moleculares activadas por barasertib, inductor fehaciente de senescencia, y con toda la información obtenida se podría empezar a esclarecer por qué barasertib conduce a las células A549 a un estado senescente y los inhibidores de Hsp90, no.

4.5. Estrategias sinérgicas basadas en miméticos BH3

La desregulación en la expresión y actividad de las proteínas de la familia Bcl-2 es, con asiduidad, la principal causa de la evasión de la apoptosis en el cáncer, y a menudo se relaciona con la adquisición de resistencias a los tratamientos [97, 407]. Los miméticos BH3 han sido diseñados para modular la actividad de las proteínas anti-apoptóticas imitando la función de los miembros “solo-BH3” con la promesa de reconducir las células tumorales hacia la muerte celular [407]. Los datos clínicos, sin embargo, denotan que estos compuestos no son eficaces como monoterapia en muchos tipos de tumores, incluidos los tumores sólidos, posiblemente debido a toxicidades dependientes de la dosis y a la aparición de resistencias a estos fármacos [107, 407, 553]. A estas resistencias contribuyen factores como mutaciones en el genoma, la influencia del

microentorno y la plasticidad de las células para adaptarse a la inhibición de una proteína anti-apoptótica, compensándola a través de la regulación al alza de otra sin provocar cambios a nivel genómico [407]. No obstante, estos contratiempos no deben paralizar las investigaciones con estos compuestos, pues a pesar de no ser efectivos como agentes únicos, su combinación con los agentes adecuados podría resultar beneficiosa.

De hecho, los miméticos BH3 resultan efectivos cuando las células se encuentran “preparadas” para morir [93]. Esta predisposición puede conseguirse con la mayoría de quimioterápicos disponibles, los cuales estresan a las células y estas responden incrementando la expresión de los miembros pro-apoptóticos, que se mantienen reprimidos por la acción de las proteínas anti-apoptóticas [92]. Esto reduce el umbral apoptótico en las células y las sensibiliza a otras terapias, como los miméticos BH3, que a través de la inhibición adicional de las proteínas anti-apoptóticas consiguen dismantelar las células malignas [93, 407]. Por ello, no resulta extraño que una buena parte de los estudios, tanto a nivel preclínico como en la clínica, hayan optado por valorar la combinación de los miméticos BH3 con distintos agentes antitumorales, incluidas la quimioterapia tradicional, las terapias dirigidas y la inmunoterapia, como potencial estrategia antitumoral con un futuro prometedor en la clínica. De hecho, el presente trabajo ha querido contribuir a este fin mediante la evaluación de la combinación de miméticos BH3 ampliamente estudiados (ABT-737 y ABT-199) y de reciente desarrollo (A-1155463 y S63845) con fármacos antimitóticos e inhibidores de Hsp90 en células derivadas de tumores sólidos.

4.5.1. La combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 resulta sinérgica en líneas celulares de tumores sólidos

Los antimitóticos tradicionales han demostrado ser eficaces en tumores sólidos, pero las importantes toxicidades asociadas y las resistencias adquiridas son sus principales hándicaps para su uso clínico [554]. Por ello, los últimos esfuerzos han permitido la consecución de nuevos fármacos de este tipo, más selectivos y con un perfil de toxicidad mejorado; sin embargo, los estudios clínicos reflejan que estos nuevos compuestos no son tan efectivos como los clásicos. Si se toma como referencia el “modelo de redes competitivas” (apartado 1.4.2), que postula que el destino final de las células tras sufrir una parada mitótica depende del equilibrio entre las señales apoptóticas y los mecanismos que regulan la salida de la mitosis, el fracaso observado se debe a que las células logran escapar del arresto mitótico sin alcanzar el umbral de muerte [156]. No obstante, esta situación puede revertirse con una estrategia que potencie la velocidad y la fuerza de la señal mortal durante la parada, decantando la balanza a favor de la muerte celular [156]. En este sentido, cuando la muerte transcurre a través de la ruta intrínseca de la apoptosis la posibilidad de utilizar miméticos BH3 en combinación con estos agentes está más que justificada.

Por ello, en este trabajo se ha evaluado la combinación simultánea de ambas familias de compuestos durante 48 horas en células de carcinoma de pulmón (A549), de colon (HCT-116) y de páncreas (MIA PaCa-2). Concretamente, los fármacos antimitóticos utilizados han sido los inhibidores de Aurora A y B alisertib y barasertib y los agentes anti-microtúbulos clásicos vincristina y docetaxel, mientras que los miméticos BH3 empleados han sido ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. Para analizar el efecto de las combinaciones se calculó la muerte específica hipotética esperada (ESP) con cada combinación mediante la fórmula $[(\% \text{ muerte fármaco 1} + \% \text{ muerte fármaco 2}) - (\% \text{ muerte fármaco 1} \times \% \text{ muerte fármaco 2}) / 100]$, para la que se asume un efecto aditivo cuando se combinan dos fármacos. Así, con este dato y la muerte específica observada experimentalmente (OBS) se calculó la diferencia entre la muerte específica observada y la esperada (OBS-ESP), y el valor obtenido permitió catalogar el efecto observado como sinérgico (≥ 10), aditivo (0-10) o antagónico (< 0).

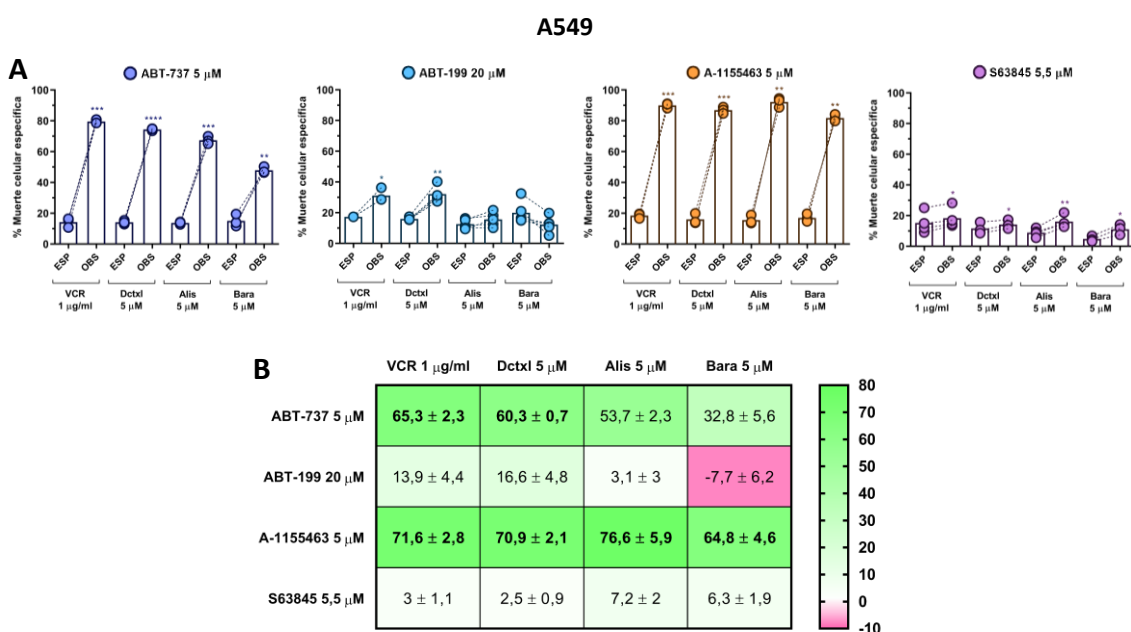


Figura 4.10 | Combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 en las células A549 durante 48 horas. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en 500 µl en placas de 24 pocillos y los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas pasadas 24 horas. Tras 48 horas de exposición, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los compuestos antimitóticos con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-5 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

En la línea celular A549 se han observado respuestas muy variadas a las combinaciones testadas (Fig. 4.10). Por un lado, la sola inhibición de Mcl-1 no es suficiente para sensibilizar las células al tratamiento con ninguno de los antimitóticos, mientras que si se bloquea únicamente Bcl-2, se produce cierta sensibilización a los agentes anti-microtúbulos pero, por el contrario, resta actividad antitumoral a barasertib, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales. Sin embargo, cuando se actúa frente a varias proteínas anti-apoptóticas simultáneamente, en este caso Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w gracias a ABT-737, se observa una potente sinergia, especialmente con vincristina, docetaxel, alisertib y, en menor medida, barasertib, que sugiere dependencia en estos casos por Bcl-X_L y Bcl-w. No obstante, este patrón se reproduce e incluso queda fortalecido cuando solamente se inhibe Bcl-X_L, quedando patente que la neutralización de esta proteína sensibiliza a estas células a la muerte celular inducida tanto por inhibidores de microtúbulos como por inhibidores de Aurora quinasas.

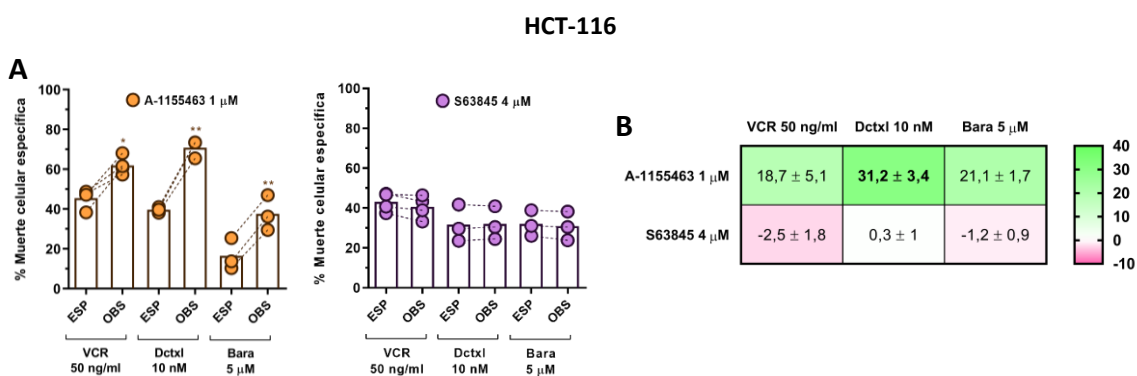


Figura 4.11 | Combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 en las células HCT-116 durante 48 horas. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos y los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas pasadas 24 horas. Tras 48 horas de tratamiento, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los compuestos antimitóticos con A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

En el caso de la línea HCT-116 (Fig. 4.11), derivada de un carcinoma de colon, S63845 no provocó ningún efecto destacado sobre las células tratadas con los agentes anti-microtúbulos y barasertib, a diferencia de A-1155463, que fue capaz de sensibilizar las células tratadas, aunque no al nivel que lo hacían ABT-737 y, sobre todo, A-1155463 en las A549. En concreto, el binomio docetaxel/A-1155463 fue el que se mostró más activo frente a estas células. Con vincristina y barasertib, aunque la potenciación del efecto fue similar, se puede considerar que el uso de vincristina supone una ventaja frente a barasertib en este tipo celular dado que la muerte inducida en presencia del primero fue mayor a la observada con el segundo.

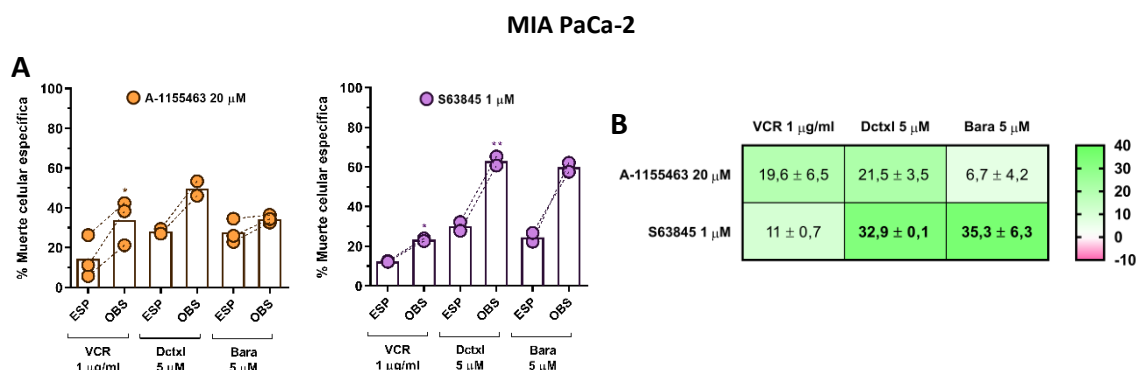


Figura 4.12 | Combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 en las células MIA PaCa-2 durante 48 horas. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos y los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas pasadas 24 horas. Tras 48 horas de exposición, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los compuestos antimitóticos con A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de al menos dos experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

Por último, la Figura 4.12 indica que las células MIA PaCa-2 (carcinoma de páncreas) también se mostraban modestamente sensibilizadas a vincristina y docetaxel en presencia de A-1155463. No obstante, el mayor efecto sinérgico en esta línea celular se produjo al combinar S63845 con docetaxel y barasertib.

Desde un punto de vista global para cada línea celular, las diferencias detectadas en el conjunto de las combinaciones radican en el mimético BH3 empleado en cada caso, ya que con todos ellos se han evaluado los mismos agentes antimitóticos. Sin embargo, las variaciones en la respuesta a la combinación de un único mimético BH3 con cada antimitótico podría deberse a mecanismos moleculares intrínsecos de los fármacos. Esto último podría explicar por qué en las células A549 las combinaciones de ABT-199 con vincristina y docetaxel se infieren más beneficiosas que cuando participa alisertib, pero su combinación con barasertib resulta contraproducente (Fig. 4.10).

Los resultados obtenidos en las células A549 verifican parcialmente los obtenidos en un trabajo anterior del laboratorio [418], pues el patrón de citotoxicidad de las combinaciones con ABT-737 en aquel estudio coincide con el observado en esta tesis; por el contrario, difieren los resultados derivados del uso de ABT-199, el cual mostró, como mucho, un efecto aditivo al combinarlo con vincristina en dicho estudio. Las variaciones observadas en el efecto derivado de la combinación con el inhibidor de Bcl-2 entre el mencionado trabajo y el actual pueden ser debidas a variables incontroladas anteriormente mencionadas, que podrían alterar de alguna

manera la dependencia de las células por las proteínas anti-apoptóticas. Por otro lado, en otro trabajo previo del grupo se detectaron niveles altos de Bcl-X_L y bajos de Mcl-1 en las células A549 tratadas con vincristina, y se observó que el silenciamiento de la primera restauraba la apoptosis durante el arresto mitótico inducido por el fármaco [435]. Por lo tanto, tras este análisis se puede extraer la conclusión de que la supervivencia de las células A549 detenidas en mitosis o que sufren deslizamiento mitótico a consecuencia de estos fármacos antimitóticos es casi exclusivamente dependiente de Bcl-X_L, mientras que Bcl-2 y Mcl-1 no serían relevantes para dicha función, un perfil de sensibilidad que se asemeja al observado cuando los miméticos BH3 actúan como agentes únicos en estas células (apartado 4.2).

En el primer trabajo mencionado del grupo [418] también se evaluaron las combinaciones a 48 horas de los agentes antimicrotúbulos y barasertib con ABT-737 y ABT-199 en las células HCT-116 y MIA PaCa-2. En aquella ocasión, se determinó que el efecto conseguido con ABT-199 era aditivo en ambas líneas celulares, al igual que la combinación de vincristina y docetaxel con ABT-737 en las HCT-116; sin embargo, la combinación de este mimético con barasertib resultó sinérgica en esta línea celular, al igual que su combinación con todos los antimitóticos en las células MIA PaCa-2. Del conjunto de los resultados se puede deducir que Bcl-X_L es importante para la supervivencia de las células HCT-116 en arresto mitótico o que han escapado del mismo, mientras que en las MIA PaCa-2 también interviene Mcl-1 en estas situaciones, pero, en cualquier caso, el papel de Bcl-X_L no sería tan decisivo para estas líneas celulares como para las células A549. No obstante, estas deducciones discrepan de las realizadas al testar los miméticos BH3 en solitario en ambas líneas celulares (apartado 4.2), ya que en aquellos ensayos se observaba una clara dependencia de las células MIA PaCa-2 por Mcl-1, mientras que en las células HCT-116 el patrón de dependencia por una u otra proteína anti-apoptótica no era tan evidente, lo que demostraría que la exposición de las células a distintos tipos de estrés, como pueden ser los fármacos antimitóticos, alteran dicho patrón.

En cualquier caso, los resultados aquí expuestos están respaldados por diversos estudios, en los que se ha reportado que la supervivencia de las células que sufren arresto mitótico o escapan de la mitosis y entran en un estado de poliploidía está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2 [555]. No obstante, es posible que las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptóticas no expliquen el distinto efecto que tienen los miméticos BH3 sobre las células A549 y MIA PaCa-2 tratadas con los fármacos antimitóticos, ya que un estudio previo reveló que la expresión de Bcl-X_L era elevada en ambas líneas celulares en respuesta a vincristina, mientras que la expresión de Mcl-1 era baja [435]. Por otro lado, *Bah et al.* destacan la importancia de Bcl-X_L para la supervivencia de células de cáncer de mama retenidas en mitosis duraderas [556]. *Suleimenov et al.* dedujeron que únicamente la inhibición de Bcl-X_L era suficiente para provocar la muerte en mitosis o tras su salida en células propensas al deslizamiento mitótico,

incluidas las A549, y propusieron que Mcl-1 solo es relevante cuando los niveles de Bcl-X_L son relativamente bajos [557]. *Shah et al.*, por su parte, observaron que navitoclax sensibilizaba a diferentes células derivadas de tumores sólidos cuando a estas se les inducía poliploidía mediante inhibidores de Aurora quinasa, y mediante silenciamientos con siRNAs concluyeron que este efecto era debido a la inhibición conjunta de Aurora B y Bcl-X_L. Además, demostraron que la combinación de barasertib y navitoclax reducía de manera sinérgica el crecimiento tumoral en modelos animales. Y tanto *in vitro* como *in vivo* detectaron que Mcl-1 quedaba neutralizada en el estado poliploide por su rápida degradación y/o la sobreexpresión de Noxa [558]. *Bennett et al.*, por su parte, se percataron de que la inhibición farmacológica de Bcl-X_L sensibilizaba a la acción de bloqueadores mitóticos, incluidos nocodazol e inhibidores de quinasas mitóticas como PLK1 o quinesinas como Eg5, pero no lo hacía cuando se combinaba con los denominados “conductores mitóticos” como inhibidores de Mps1 y de Aurora quinasa, que provocan una parada transitoria. Además, responsabilizaron a Mcl-1 de la resistencia a la apoptosis en estas circunstancias cuando vieron que la inhibición simultánea de Bcl-X_L y Mcl-1 potenciaba y aceleraba la muerte de las células en respuesta a la inhibición de Aurora B [559].

En general, nuestros resultados están en consonancia con las observaciones de todos estos trabajos a excepción del último, pues nosotros detectamos un efecto sinérgico al combinar el inhibidor de Bcl-X_L tanto con agentes anti-microtúbulos como con inhibidores de Aurora quinasa en todas las líneas celulares ensayadas, siendo especialmente llamativo el efecto en las células A549. En cuanto al papel de Mcl-1, los datos aquí obtenidos sugieren que es relevante para las MIA PaCa-2, ya que su inhibición incrementó notablemente la toxicidad de docetaxel y barasertib, a pesar de que resultados previos del grupo hayan demostrado que esta proteína se expresa en menor medida que Bcl-X_L [435]. Dado que la inhibición de Bcl-X_L y Mcl-1 por separado ha potenciado moderadamente la acción citotóxica de los antimitóticos, es posible que la inhibición simultánea de ambas despliegue un efecto sinérgico más potente. De hecho, a *Bennett et al.* les funcionó esta estrategia en respuesta a la inhibición de Aurora B porque los niveles de Mcl-1 se mantenían en presencia de los “conductores mitóticos”, a diferencia de lo que sucede en un estado de arresto mitótico prolongado, donde decaen [559].

Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas también participan en el desencadenamiento de la muerte durante la mitosis y tras la inducción de poliploidía [558, 559]. Por ejemplo, se ha descrito que algunas como tBid, PUMA, Noxa o Bax se regulan positivamente tras el tratamiento con barasertib en función de la línea celular, y que navitoclax interrumpe la interacción de Bcl-X_L con Bim, PUMA, Bad y Bik, lo que presupone su implicación en la activación de la vía apoptótica mitocondrial; no obstante, también se observó un incremento de la interacción de Bcl-X_L con Bax y tBid, pero los autores no llegaron a resolver si este aumento se producía tras la activación de la apoptosis o si cooperaba en la muerte inducida tras la inducción de poliploidía

[558]. Otro estudio sugiere que la ratio Bcl-X_L/Bak es un factor que participa en la determinación del destino final de distintos tipos celulares tumorales tras un arresto mitótico [435]. Otros autores, por su parte, han propuesto que la apoptosis durante la mitosis está mediada por el eje Noxa/Mcl-1/Bim, en el que Noxa promueve la degradación de Mcl-1 y Bim sería necesario para neutralizar a los miembros anti-apoptóticos restantes o estimular la activación directa de Bax [560]. Esta clase de hipótesis, por tanto, invitan al estudio del papel de cada proteína “solo-BH3” en la activación del programa apoptótico, algo que se puede conseguir mediante la generación de sublíneas *knockout* para una o varias proteínas de este tipo.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la transcripción y la traducción están fuertemente reprimidas durante la mitosis, de manera que las modificaciones post-traduccionales cobran relevancia en la regulación de este proceso [559]. De hecho, durante una parada mitótica prolongada CDK1 fosforila a Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 en los residuos Thr56, Ser62 y Thr92, respectivamente, y otras quinasas como p38 y PLK1 contribuyen a la hiperfosforilación de estas proteínas [555]. Estas modificaciones conducen a la ubiquitinación de Mcl-1 y su posterior degradación en el proteasoma, e inactivan la capacidad anti-apoptótica de Bcl-2 y Bcl-X_L, acercando a las células al umbral apoptótico [179, 555]. No obstante, fosfatasa como PP2A y PP1 pueden revertir las fosforilaciones de Mcl-1 y Bcl-2, respectivamente, durante el deslizamiento mitótico, restaurando posiblemente su actividad anti-apoptótica [555]. Del mismo modo, las proteínas pro-apoptóticas y otras moléculas de la maquinaria apoptótica pueden experimentar fosforilaciones, con diferentes consecuencias durante el arresto mitótico. Por ejemplo, Bim puede ser fosforilada y eliminada durante este estado, mientras que Bid se fosforila en este contexto en el residuo Ser66 y es necesaria para la inducción de apoptosis, pero si el estímulo inductor de esta parada es eliminado, las células retoman el ciclo y Bid fosforilado desaparece [560, 561]. Por el contrario, la fosforilación de la caspasa 9 en el residuo Thr125 por el complejo CDK1/ciclina B1 impide la apoptosis durante la parada mitótica provocada por inhibidores de los microtúbulos, pero su defosforilación al producirse el deslizamiento mitótico podría activar de nuevo la apoptosis en aquellas células que no han resuelto la mitosis [562].

En definitiva, nuestros resultados apuntan a que Bcl-X_L y, en algún caso Mcl-1, son las responsables de mantener viables las células tumorales expuestas a los fármacos antimitóticos. No obstante, para validar y aportar robustez a las conclusiones obtenidas, convendría realizar más estudios que aborden la modulación de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y de proteínas reguladoras del ciclo, el análisis de modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas implicadas en la apoptosis y la mitosis y ensayos de inmunoprecipitación que revelen las interacciones que establecen entre sí las proteínas de la familia Bcl-2 cuando se ataca la maquinaria mitótica.

4.5.2. La combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 resulta sinérgica en células de cáncer de pulmón

En vista de las sinergias detectadas al combinar algunos miméticos BH3 con los fármacos antimitóticos en células de tumores sólidos, especialmente en las A549, se quiso saber si los miméticos BH3 también eran capaces de sensibilizar a estas células a la acción de los inhibidores de Hsp90 cuando estos se incubaban durante 48 horas, ya que, según nuestros resultados, son capaces de detener el ciclo celular en la fase G2/M de manera reversible en dicha línea celular.

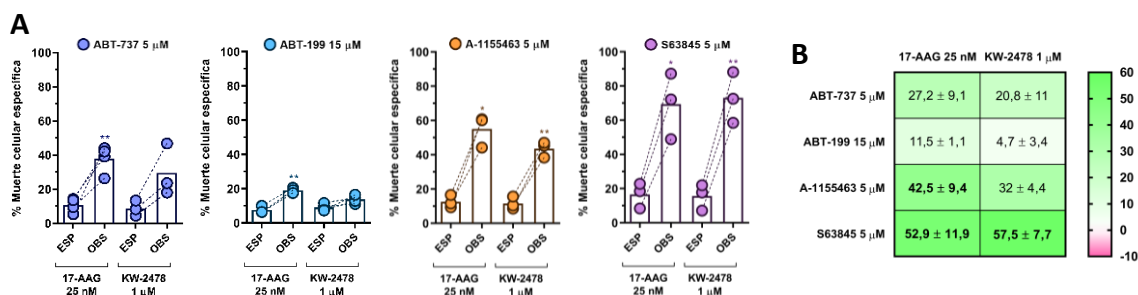


Figura 4.13 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células A549 durante 48 horas. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos y los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas pasadas 24 horas. Después de 48 horas de tratamiento, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

En este caso, según la Figura 4.13, el bloqueo de Mcl-1 consiguió aumentar notablemente la toxicidad de ambos inhibidores de Hsp90, lo que se tradujo en la inducción de un efecto sinérgico robusto. Más modesta fue la sinergia observada con A-1155463 y, especialmente, con ABT-737, aunque ambos compuestos sensibilizaban ligeramente más a la acción de 17-AAG. Finalmente, la inclusión de ABT-199 en las combinaciones fue la aproximación que peores resultados arrojó, pues su asociación con 17-AAG resultaba levemente sinérgica y solo aditiva con KW-2478.

Hasta la fecha, la combinación de inhibidores de Hsp90 con terapias convencionales y novedosas ha sido evaluada a nivel preclínico y en ensayos clínicos, con resultados generalmente satisfactorios [540, 546, 563–567]. Sin embargo, apenas se ha explorado el potencial terapéutico de la combinación de inhibidores de Hsp90 con miméticos BH3, y solamente algunos estudios han revelado que esta estrategia puede resultar beneficiosa. Tal es el caso de la combinación de ganetespib con ABT-737, que incrementó la inducción de muerte en células de mesotelioma resistentes a ganetespib, y con navitoclax, que redujo el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto murino generado con estas células [568]. También se observó sinergia en células de

glioblastoma con la combinación de miméticos BH3 de amplio espectro y selectivos de cada una de las proteínas anti-apoptóticas con gamitrinib, un inhibidor de Hsp90 de la matriz mitocondrial, y la combinación de navitoclax con este inhibidor redujo el crecimiento tumoral y promovió la regresión del tumor en modelos *in vivo*, incrementando la supervivencia de los animales [569]. Los resultados de este último estudio son muy similares a los obtenidos en este trabajo, pues nosotros también detectamos sinergia con el multi-inhibidor ABT-737 y con los inhibidores específicos A-1155463 y S63845, pero no con ABT-199 en las células A549. Las diferencias entre ambos estudios podrían radicar en las distintas líneas celulares empleadas, en factores intrínsecos a los miméticos BH3, ya que no se han utilizado los mismos en ambos estudios, y en la selectividad de los inhibidores de Hsp90 escogidos para los ensayos, pues mientras gamitrinib es selectivo de la chaperona mitocondrial, 17-AAG es un pan-inhibidor de Hsp90 y KW-2478 solamente bloquea a Hsp90 α .

Si estas combinaciones no han sido casi exploradas, menos aún lo ha sido el papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en estas situaciones, aunque los efectos de la inhibición de Hsp90 sobre estas proteínas han sido un poco más estudiados. La regulación a la baja de los miembros anti-apoptóticos por la acción de estos inhibidores ha sido reportada en melanoma, glioblastoma, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y de mama, mieloma múltiple, leucemia promielocítica aguda (APL) y leucemia mieloide crónica (CML) [540, 568–571]. Por el contrario, se ha encontrado que Noxa se sobreexpresa ante el tratamiento con gamitrinib e interviene en la muerte inducida por la combinación de este inhibidor y miméticos BH3 en células de glioblastoma, al igual que Bim, que en el tratamiento combinado se libera de Mcl-1 y promueve la apoptosis [569]. Igualmente, se ha notificado la sobreexpresión de Bad tras la exposición a KW-2478 en la CML y de Bax en células de cáncer de mama tratadas con SNX-2112 [540]. *Busacca et al.* encontraron que la actividad citotóxica de ganetespib en células de mesotelioma y adenocarcinoma de pulmón de células pequeñas sensibles al compuesto se debía a la reducción de los niveles de Mcl-1 y a la cooperación de Bid, PUMA y Bik, mientras que esta última sería prescindible en las células resistentes; y cuando se combinan ganetespib y ABT-737 en estas células, la inducción de la apoptosis dependiente de Bax/Bak se produce por la activación de Bid y PUMA como consecuencia de la inhibición de Hsp90 y por el bloqueo de Bcl-X_L y Bcl-w derivado de la acción del mimético BH3 [568]. Retornando al estudio que nos ocupa, teniendo en cuenta que nuestros resultados apuntan a que Bcl-X_L es la principal proteína promotora de la supervivencia de las células A549, cabría esperar que la mayor eficacia combinatoria se observara con A-1155463 y ABT-737; sin embargo, los mejores resultados se han conseguido al inhibir Mcl-1, lo que podría tomarse como indicios de que 17-AAG y KW-2478 modificarían la dependencia de las células por las proteínas anti-apoptóticas, otorgándole mayor relevancia a

Mcl-1 a través de mecanismos como cambios en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 o en la manera de interconectarse entre ellas.

Finalmente, la relación entre las proteínas de la familia Bcl-2 y la parada del ciclo inducida por los inhibidores de Hsp90 no ha sido evaluada hasta donde nuestro conocimiento alcanza, lo que supone una desventaja porque estudios de este tipo permitirían descubrir las bases moleculares de la eficacia de estas combinaciones y proporcionarían información valiosa para mejorarlas y superar posibles resistencias asociadas. No obstante, resultados como los aquí obtenidos abren la puerta a la realización de estudios posteriores en este sentido.

4.5.3. Efecto de los miméticos BH3 en células tumorales senescentes de pulmón y de páncreas

La senescencia, pese a ser considerada un potente mecanismo oncosupresor, puede actuar como un arma de doble filo [169]. Una vez que las células alcanzan el estado de senescencia, estas se vuelven resistentes a la apoptosis, y en esta conversión las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel determinante [572]. Por otro lado, la acumulación de células tumorales senescentes y la alteración del microentorno como consecuencia del SASP pueden impulsar la salida de las células del estado senescente y crear un ambiente idóneo para estimular la progresión tumoral, la recurrencia de la enfermedad y la quimiorresistencia [160, 169, 573]. Esto ha hecho que los investigadores se refieran a las células que consiguen salir del estado senescente y reincorporarse al ciclo celular con el término “pseudo-senescentes”, para diferenciarlas de aquellas que parecen encontrarse en un estado de senescencia permanente [574, 575]. Ante este escenario, no es de extrañar que en los últimos años se estén explorando nuevas estrategias que sean capaces de eliminar específicamente las células senescentes. Una de ellas se conoce como terapia senolítica y estudios recientes acreditan que numerosos quimioterápicos poseen esta actividad, incluidos los miméticos BH3 y los inhibidores de Hsp90 [576].

Trabajos anteriores del grupo han demostrado que barasertib conduce a una subpoblación de células A549 y HCT-116 a un estado senescente, consecuencia de un arresto mitótico transitorio que las células resuelven rápidamente evadiendo la citoquinesis a través del deslizamiento mitótico, ya que las funciones de Aurora B relacionadas con la citoquinesis están inhibidas. De hecho, las células sobrevivían largos periodos de tiempo y presentaban un aspecto morfológico y algunos marcadores compatibles con la senescencia [418, 426]. Además, uno de aquellos trabajos demostró que ABT-737 actuaba como senolítico en células A549 y HCT-116 senescentes debido al tratamiento con barasertib, y que la muerte desencadenada era dependiente de caspasas [418]. Por ello, en esta tesis se ha creído oportuno evaluar el potencial senolítico de distintos miméticos BH3 en células A549 senescentes originadas a partir del tratamiento con barasertib. Para ello,

primero se indujo el fenotipo senescente y a continuación las células se trataron con los agentes a evaluar durante 24 o 72 horas (Figs. 4.14A y C).

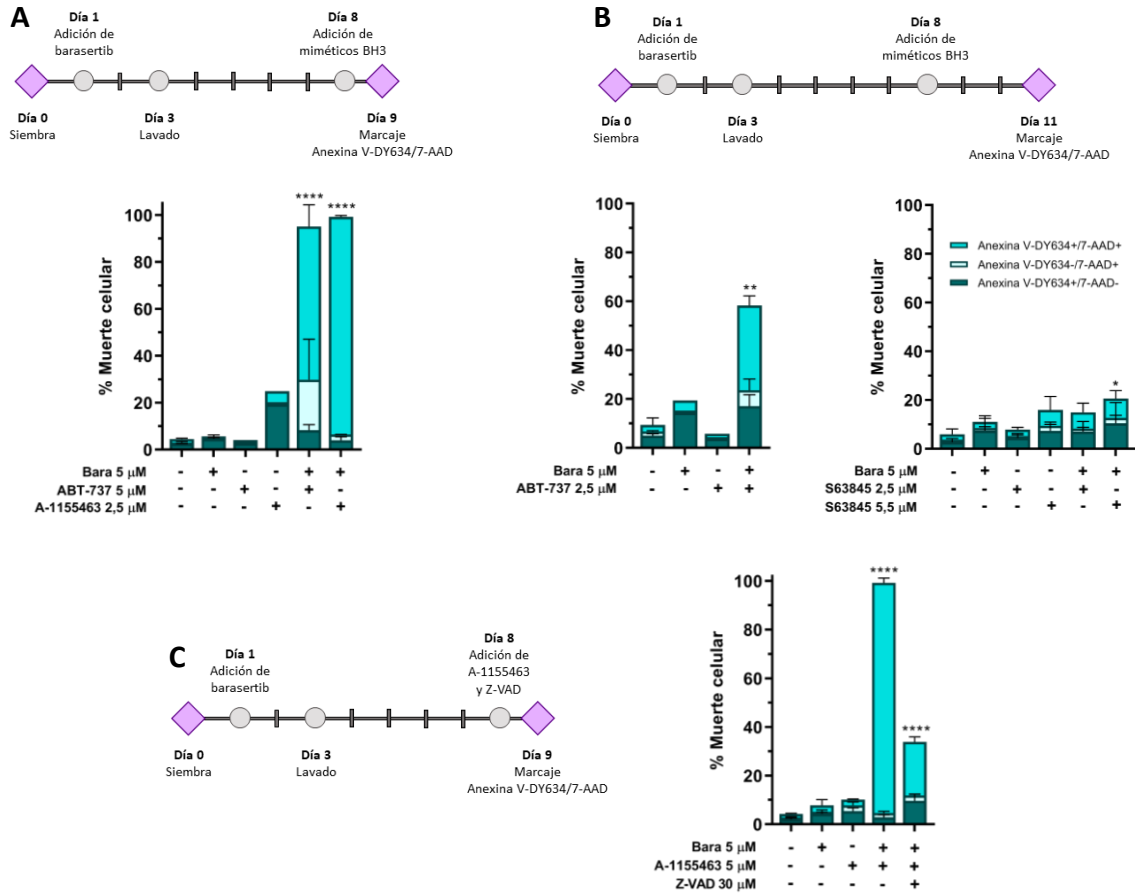


Figura 4.14 | Potencial senolítico de los miméticos BH3 en células A549 senescentes. (A-C) Líneas temporales que representan de forma cronológica el tratamiento al que fueron sometidas las células. Brevemente, se sembraron $3 \cdot 10^3$ células control y $3 \cdot 10^4$ células que fueron tratadas con barasertib a una dosis final de 5 μ M durante 48 horas en 1 ml en placas de 12 pocillos. A continuación, el medio se sustituyó por 1 ml de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, las células se pre-incubaron con Z-VAD a una concentración de 30 μ M durante al menos una hora cuando correspondiera (C) y se añadieron los miméticos BH3, que se dejaron actuar durante 24 (A y C) o 72 horas (B). Transcurridos los tiempos de incubación, se determinó la muerte celular inducida por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=1-4 experimentos independientes, y los análisis estadísticos realizados han sido el two-way ANOVA con el posterior análisis de Dunnett o Sidak (A y B) y el one-way ANOVA con el posterior análisis de Sidak (C), comparando el efecto de la combinación de barasertib con cada mimético BH3 respecto al primero (A y B), y la incorporación de Z-VAD a la combinación respecto a la combinación por sí sola (C). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Estos ensayos se llevaron a cabo con los miméticos BH3 ABT-737, A-1155463 y S63845. ABT-199 fue excluido porque en un trabajo anterior del grupo [418] la combinación simultánea de este mimético BH3 con barasertib no resultó sinérgica. Las gráficas de la Figura 4.14 evidencian que la mortalidad registrada en las células A549 senescentes es baja (5-20 %), que la toxicidad de los miméticos BH3 es pequeña cuando actúan como agentes únicos (5-25 %) y que

existe variabilidad en la respuesta de las células senescentes a los miméticos BH3. ABT-737 y el inhibidor de Bcl-X_L son extremadamente eficaces, consiguiendo eliminar la práctica totalidad de las células senescentes en solo 24 horas (Fig. 4.14A). Además, ABT-737 también es capaz de inducir muerte celular tras 72 horas de exposición a dosis menores (Fig. 4.14B). No obstante, si se comparan ambos escenarios, resulta más beneficioso utilizar concentraciones más elevadas de este mimético BH3 a tiempos cortos que reducir la dosis y prolongar el tratamiento. El inhibidor de Mcl-1, por el contrario, no es capaz de inducir la muerte de las células senescentes (Fig. 4.14B). Por otra parte, el hecho de que el inhibidor general de caspasas Z-VAD ejerza un efecto citoprotector considerable frente a A-1155463 indica que la muerte desencadenada por este mimético BH3 en las células A549 senescentes es altamente dependiente de caspasas (Fig. 4.14C).

De estudios llevados a cabo con ABT-737, navitoclax, ABT-199 e inhibidores específicos de Bcl-X_L se desprende que Bcl-X_L es la principal responsable de la supervivencia de las células A549 senescentes, pues todos ellos excepto ABT-199 son capaces de acabar con estas células, aunque los datos arrojados por los multi-inhibidores sugieren que Bcl-w también podría estar involucrada; sin embargo, la falta de inhibidores específicos de esta proteína en la actualidad impiden aclarar su posible contribución a este fin [113, 574, 577]. Los resultados obtenidos en este trabajo también apuntan a que la supervivencia de las células A549 senescentes se sustenta sobre Bcl-X_L. Todos ellos ponen de manifiesto la relevancia de las proteínas de la familia Bcl-2 en la resistencia que muestran las células senescentes a la apoptosis, pudiendo afectar las modificaciones post-traduccionales y los niveles de expresión de cada una de ellas en la actividad senolítica de un determinado mimético BH3 [578]. Esto es importante dado que las proteínas de esta familia actúan de forma coordinada estableciendo una compleja red de conexiones entre sí, y si alguna de ellas deja de ser funcional, es posible que se produzca un efecto compensatorio y otra le tome el relevo [67, 578]. Por ello, a pesar de que la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-X_L suele asociarse con un perfil senescente que podría ser combatido con miméticos BH3 dirigidos contra estas proteínas, esta estrategia en ocasiones no resulta efectiva porque Mcl-1 actúa como represor adicional de la apoptosis, bien porque se encuentra sobreexpresada, bien porque Noxa, su principal neutralizador, no se expresa [572, 578–580]. En este sentido, *Shahbandi et al.* demostraron que el bloqueo de Mcl-1 es necesario cuando existe resistencia a navitoclax y *Rysanek et al.* evidenciaron que el inhibidor de Mcl-1 S63845 potencia el efecto senolítico de ABT-199 y A-1331852 [579, 580]. Por otro lado, nuestra observación de que la muerte desencadenada por los agentes senolíticos es dependiente de caspasas está en consonancia con otras investigaciones, en las que se señala que pan-inhibidores de caspasas como Z-VAD y Q-VD-OPh son capaces de prevenir el efecto citotóxico que ejercen los miméticos BH3 sobre las células senescentes [577, 579].

En vista de estos resultados, quisimos determinar si los miméticos BH3 también actuaban como agentes senolíticos en las células MIA PaCa-2 senescentes derivadas del tratamiento con barasertib (sección 4.1), especialmente el inhibidor de Mcl-1, ya que en el apartado 4.2 se ha demostrado el importante papel de esta proteína anti-apoptótica para la supervivencia de estas células cuando no son senescentes. Para ello, una vez se indujo el fenotipo senescente, las células se expusieron a los agentes a evaluar durante 48 horas (Fig. 4.15). Al igual que se hizo con las células A549, inicialmente se intentó evaluar el potencial senolítico de los miméticos BH3 (ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845) mediante citometría de flujo, pero descubrimos que la tripsinización de las células afectaba sustancialmente a la viabilidad de las células MIA PaCa-2 senescentes, por lo que se optó por realizar ensayos de reducción del MTT. Así, aunque cada tipo de ensayo evalúa distintos parámetros y estos no son comparables entre sí, se pudo tener al menos una noción del efecto de estos compuestos en las células MIA PaCa-2 senescentes.

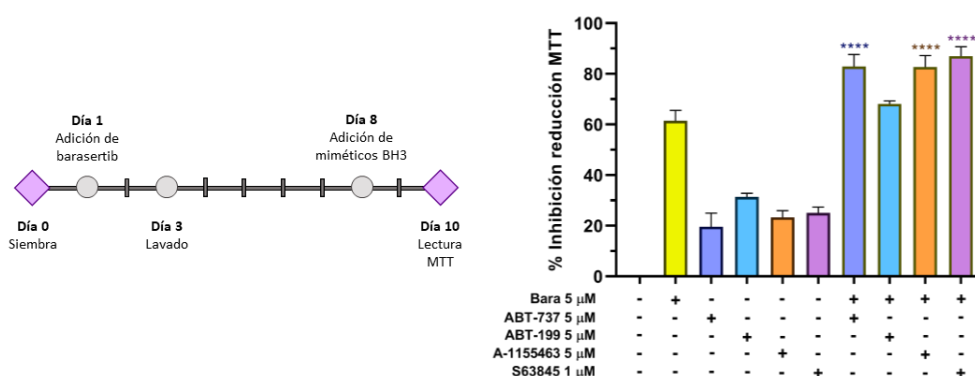


Figura 4.15 | Efecto de los miméticos BH3 en células MIA PaCa-2 senescentes. Brevemente, se sembraron al menos por cuadruplicado 10^4 células/ml (control y miméticos BH3) y 10^5 células/ml (senescencia) en 100 µl en placas de 96 pocillos de fondo plano, y estas últimas fueron tratadas con barasertib a una dosis final de 5 µM durante 48 horas. Tras este tiempo, el medio se sustituyó por 100 µl de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, se adicionaron los miméticos BH3 a las concentraciones señaladas, los cuales se dejaron actuar durante 48 horas. Concluidos los tratamientos, se evaluó la capacidad de reducción del MTT de las células según lo descrito en el apartado 3.2.1 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-4$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el two-way ANOVA con el posterior análisis de Dunnett comparando el efecto de la combinación de barasertib y cada mimético BH3 respecto al primero. **** $p < 0,0001$.

La gráfica de la Figura 4.15 muestra una disminución en la capacidad de las células MIA PaCa-2 de reducir el MTT cuando se exponen a barasertib (60 %), que posiblemente sea debida a la detención de la proliferación provocada por el inhibidor. Los miméticos BH3, por su parte, reducían la capacidad proliferativa de las células de forma más modesta (20-30 %) tras 24 horas de incubación, siendo ABT-199 el compuesto que más afectaba a dicha capacidad. Sin embargo, el antagonista de Bcl-2 no reducía el número de células senescentes viables, a diferencia de ABT-737, A-1155463 y S63845, los cuales mermaban ligeramente la viabilidad de las células MIA PaCa-2 senescentes (en torno a un 25-30 % respecto a lo observado en las células tratadas

con barasertib). Dado que las células senescentes no proliferan, el efecto en la reducción del MTT observado con los miméticos BH3 se correspondería con un efecto citotóxico de los mismos.

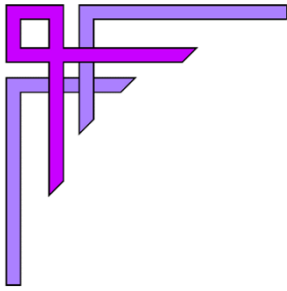
Por lo tanto, según estos resultados, Bcl-2 no sería relevante para la supervivencia de las células MIA PaCa-2 senescentes, mientras que Bcl-X_L y Mcl-1 por separado tendrían un papel algo más importante. En el caso de Bcl-w, que también queda inhibida por la acción de ABT-737, no es posible determinar su contribución a dicho fin debido a la falta de compuestos que la inhiban específicamente, pero dado que el efecto de ABT-737 y A-1155463 en las células senescentes es equiparable, es factible pensar que, de todas las proteínas que bloquea el multi-inhibidor, Bcl-X_L es la única implicada en mantener, al menos parcialmente, su viabilidad. Este perfil de sensibilidad contrasta llamativamente con el mostrado por las células no senescentes cuando se exponen a los miméticos BH3 en solitario, pues entonces su supervivencia dependía exclusivamente de Mcl-1 (apartado 4.2), lo que evidencia que la senescencia inducida por barasertib provoca cambios en las proteínas de la familia Bcl-2, ya sea en sus niveles de expresión o en las conexiones que establecen entre sí.

No obstante, como se ha comentado unas líneas más arriba, el ensayo de reducción del MTT evalúa parámetros distintos a los ensayos de muerte celular mediante citometría de flujo, de manera que los resultados obtenidos en las células MIA PaCa-2 y A549 no son comparables entre sí. Por ello, sería conveniente evaluar el potencial senolítico de los miméticos BH3 en las células MIA PaCa-2 senescentes utilizando herramientas que permitan determinar la muerte inducida sin necesidad de tripsinizar las células, como pueden ser kits comerciales aptos para microscopía de fluorescencia o enzimoimmunoanálisis fotométricos (ensayos ELISA).

Hasta donde sabemos, no existen estudios previos que hayan abordado el estudio del potencial senolítico de los miméticos BH3 en células tumorales pancreáticas senescentes debido a la acción de barasertib u otros inhibidores de la familia Aurora. Sin embargo, sí se tiene constancia del estudio de dicho potencial en otras situaciones. Por ejemplo, se ha visto que navitoclax elimina, con eficacia variable, las células tumorales pancreáticas que han entrado en senescencia a consecuencia del tratamiento con el antimetabolito gemcitabina *in vitro* [581]. Además, un estudio que utilizaba un modelo *in vivo* reveló que ABT-737 eliminaba, aproximadamente, el 50 % de las células precursoras de adenocarcinoma ductal pancreático senescentes que expresaban COX2, y vieron que administrando el mimético BH3 de forma intermitente durante cuatro meses se conseguía disminuir la formación de lesiones premalignas pancreáticas y la progresión a carcinoma [582]. No obstante, otro trabajo evidenció la escasa actividad senolítica de navitoclax en células pancreáticas tumorales, donde la radioterapia, combinada o no con olaparib (inhibidor de PARP), exhibía un reducido poder inductor de senescencia, y los autores concluyeron que la potencia de este mimético BH3 como agente

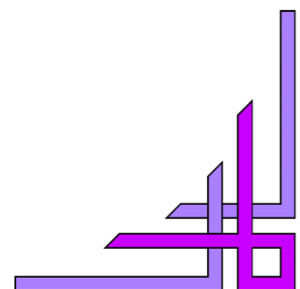
senolítico dependía de la capacidad de la radioterapia y de olaparib de inducir senescencia, ya que en otros tipos celulares navitoclax fue más eficaz actuando frente a las células senescentes [583].

En resumen, en esta sección se ha demostrado que solo los miméticos BH3 dirigidos contra Bcl-X_L son capaces de eliminar selectivamente las células A549 senescentes y que las caspasas median en la muerte inducida por A-1155463, mientras que el multi-inhibidor ABT-737 y los antagonistas selectivos de Bcl-X_L y Mcl-1 solamente comprometen la supervivencia de las células MIA PaCa-2 senescentes de manera parcial. Por lo tanto, para que su aplicación en la clínica pueda ser una opción en el futuro, se necesitan más estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que continúen evaluando nuevos agentes senolíticos y mejoren los ya conocidos e incluyan la realización de estos ensayos en otros tipos celulares y la dilucidación de las causas moleculares que determinan la eficacia de los miméticos BH3 como agentes senolíticos en función del modelo celular.



PARTE II

Estudio del mecanismo de acción de
diferentes agentes quimioterápicos y
evaluación de nuevas combinaciones
en líneas celulares de mieloma
múltiple



5. Resultados y discusión – Parte II: Estudio del mecanismo de acción de diferentes agentes quimioterápicos y evaluación de nuevas combinaciones en líneas celulares de mieloma múltiple

A pesar de los inestimables avances alcanzados en el ámbito terapéutico, hoy en día, el mieloma múltiple continúa siendo una enfermedad incurable para muchos pacientes [406], de ahí el incesante afán de los investigadores por explorar nuevas aproximaciones que ayuden en la difícil tarea de su erradicación. Si se tienen en cuenta determinados aspectos como la heterogeneidad de esta enfermedad respecto a su dependencia por las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [406], la elevada producción y secreción de la inmunoglobulina monoclonal [208, 584] y la frecuente sobreexpresión de Aurora A [361], los miméticos BH3, los inhibidores de chaperonas como Hsp90 y los inhibidores de proteínas de la familia Aurora se postulan como excelentes candidatos en la terapia anti-mieloma. Por ello, en la segunda parte de esta tesis se ha profundizado en el mecanismo de acción de estas familias de compuestos y se han explorado nuevas estrategias combinatorias que puedan resultar beneficiosas.

5.1. Mecanismo de acción de los miméticos BH3 en el mieloma múltiple

En el caso del mieloma múltiple, la sobreexpresión de Mcl-1 se asocia con la supervivencia de las células y la resistencia a los tratamientos, aunque Bcl-2 también se ha encontrado sobreexpresada en un subgrupo de líneas celulares y pacientes de mieloma, mientras que la supervivencia de otro subconjunto de líneas celulares depende de Bcl-X_L [406]. No obstante, estudios de *BH3-profiling* llevados a cabo sobre líneas celulares y muestras de pacientes sugieren que la supervivencia del mieloma podría sustentarse sobre una o varias proteínas anti-apoptóticas [406]. Tomando todo esto como referencia y teniendo en cuenta que trabajos previos del grupo han detectado actividad anti-mieloma por parte de distintos miméticos BH3 dirigidos contra una o varias proteínas anti-apoptóticas [428, 585, 586], se ha querido contribuir a comprender mejor la manera en la que actúan este tipo de compuestos en células de mieloma múltiple, concretamente ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845.

5.1.1. Efecto de los miméticos BH3 sobre la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma

Como reveló un trabajo anterior del grupo, las líneas celulares de mieloma múltiple de las que disponemos en el laboratorio presentan diferentes perfiles de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 a nivel basal, independientemente de la translocación genética asociada [421]. En particular, Mcl-1 es la principal proteína anti-apoptótica en las células NCI-H929 [t(4;14)], seguida de Bcl-2; Bcl-X_L es la que mayores niveles presenta en las células MM.1S [t(14;16)] y

U266 [t(11;14)], seguida de Bcl-2; y en el caso de las células RPMI 8226 [t(14;16)] y OPM-2 [t(4;14)], Bcl-X_L y Mcl-1 son las que más se expresan [421].

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de los miméticos BH3 se basa en la neutralización de los miembros anti-apoptóticos para favorecer la apoptosis, se quiso averiguar si dosis subtóxicas de estos compuestos eran capaces de alterar el proteoma de esta familia de proteínas a corto plazo, y si existía correlación entre la sensibilidad a los tratamientos y la expresión de estas proteínas en el panel de cinco líneas celulares de mieloma mencionado en el párrafo anterior. En base a ensayos dosis-respuesta de 24 horas de duración llevados a cabo en estas células, se seleccionaron concentraciones de cada compuesto que indujeran un 20-40 % de muerte en cada línea celular (datos no mostrados) para tratar las células durante 6, 16 y 24 horas.

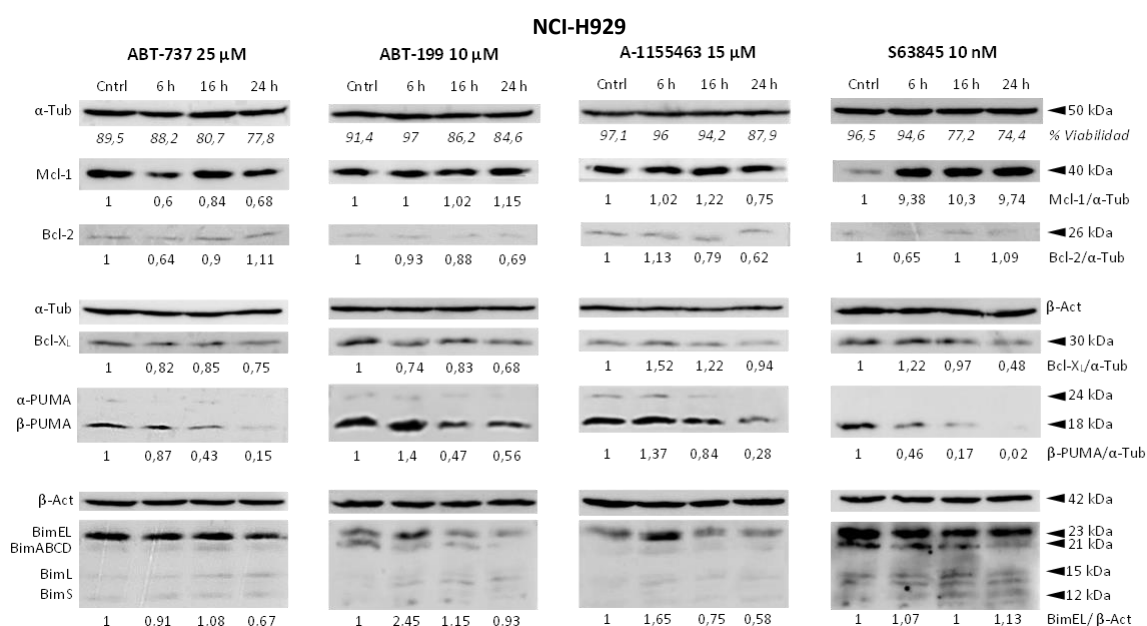


Figura 5.1 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células NCI-H929 tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos y estas fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos indicados. Finalizados los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar la viabilidad celular o el marcaje con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular inducida, y se prepararon extractos celulares de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imagen procedente de un único experimento. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

En general, las proteínas de la familia Bcl-2 experimentaron pequeñas variaciones en su expresión cuando las células NCI-H929 se expusieron a los miméticos BH3 (Fig. 5.1). No obstante, merece la pena resaltar la caída paulatina de PUMA con todos los fármacos, especialmente con ABT-737 y S63845, el incremento de la expresión de Mcl-1 (≈ 10 veces) con

el inhibidor específico de esta proteína incluso a muy corto plazo y el máximo de expresión de Bim después de 6 horas de exposición a ABT-199 y A-1155463.

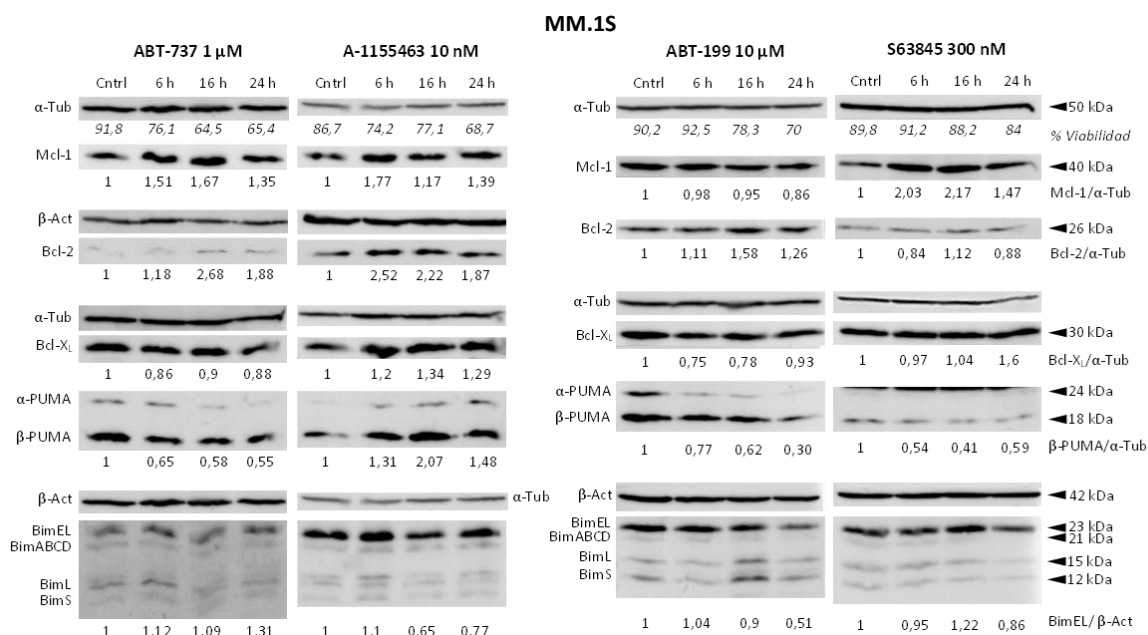


Figura 5.2 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células MM.1S tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos, las cuales fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos señalados. Tras los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar la viabilidad celular o se marcaron con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular desencadenada, y se prepararon extractos celulares de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imagen procedente de un único experimento. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

En las células MM.1S los tratamientos también inducen, por lo general, pequeños cambios en los niveles de expresión de las proteínas evaluadas, aunque existen algunas excepciones (Fig. 5.2). Tal es el caso de PUMA, la cual disminuye su expresión con todos los miméticos BH3 excepto con A-1155463, con el que aumentan sus niveles. Bcl-2, en cambio, incrementa su expresión con ABT-737 y desde muy temprano con A-1155463. Por otro lado, ABT-737 y, particularmente S63845, favorecen la expresión de Mcl-1 desde las 6 horas de tratamiento; sin embargo, cuando las células se exponen a A-1155463, esta proteína alcanza su máximo de expresión a las 6 horas de tratamiento.

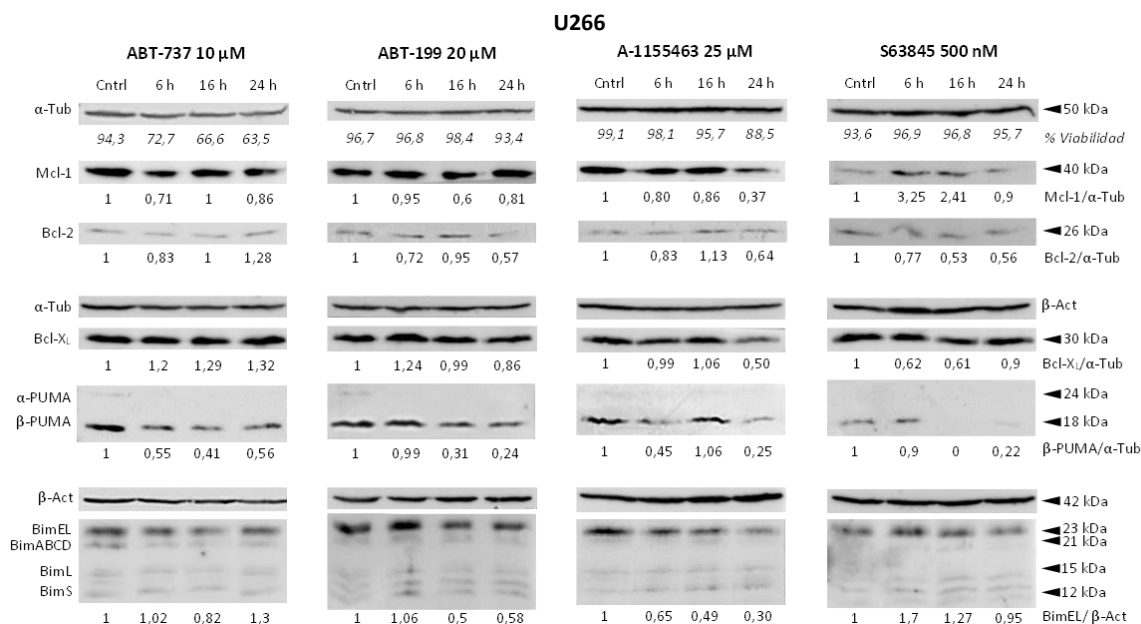


Figura 5.3 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células U266 tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos y estas fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos indicados. Concluidos los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar la viabilidad celular o el marcaje con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular inducida, y se prepararon extractos celulares según se indica en la sección 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imagen proveniente de un único experimento. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

Al igual que en las líneas celulares anteriores, en las células U266 (Fig. 5.3) la mayoría de las variaciones en la expresión de las proteínas evaluadas no son significativas, aunque cabe destacar la reducción de la expresión de PUMA con los cuatro compuestos, en particular con S63845, así como la de Bim con A-1155463 y, en menor medida, con ABT-199; sin embargo, esta última experimenta un pico de expresión a las 6 horas de tratamiento con S63845. Por su parte, Mcl-1 disminuye su expresión tras 24 horas de actuación de A-1155463 y la incrementa con exposiciones muy breves a S63845.

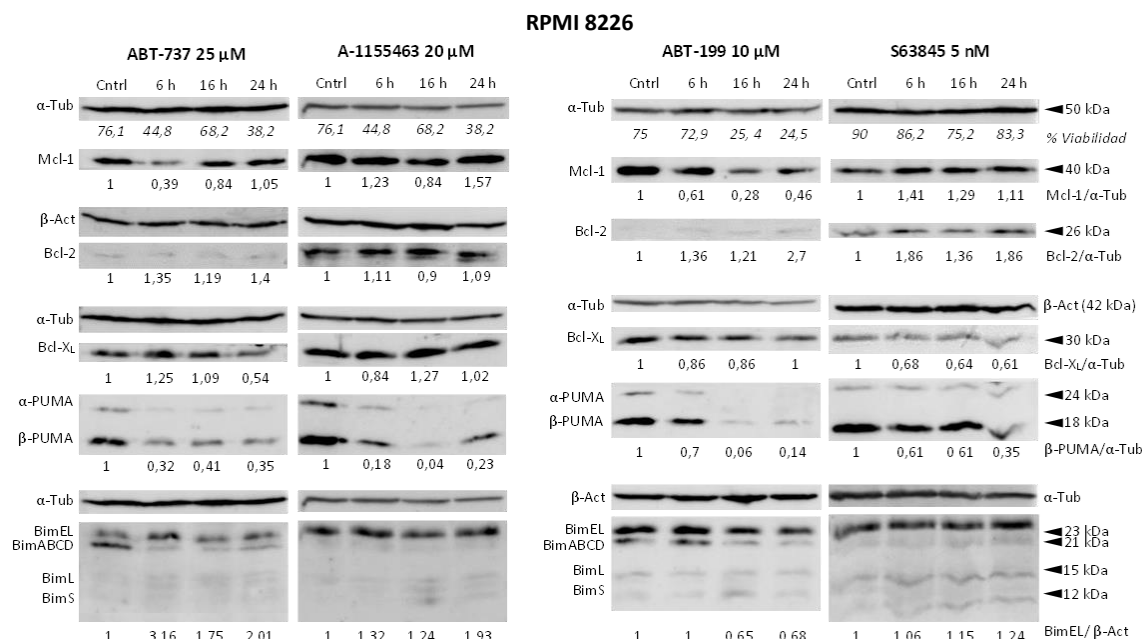


Figura 5.4 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células RPMI 8226 tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos y estas fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos señalados. Tras los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar la viabilidad celular o se marcaron con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular inducida, y se prepararon extractos celulares según lo descrito en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imagen procedente de un único experimento. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

En las células RPMI 8226 (Fig. 5.4) resaltan la disminución de los niveles de PUMA con todos los miméticos BH3, especialmente con ABT-199 y A-1155463, y la de Mcl-1 tras la exposición de ABT-199, así como el mínimo de expresión de esta proteína 6 horas después de la adición de ABT-737. Por otro lado, Bcl-2 incrementa su expresión por la acción de ABT-199 durante 24 horas y de S63845 a las 6 y 24 horas, mientras que los niveles de Bim se acentúan como consecuencia del tratamiento con ABT-737 y A-1155463, en este último caso tras 24 horas. Además, S63845 incrementó los niveles de Mcl-1, aunque lo hizo en menor medida que en las líneas celulares anteriores. En el resto de situaciones, las alteraciones inducidas por los compuestos en la expresión de estas proteínas han sido más leves.

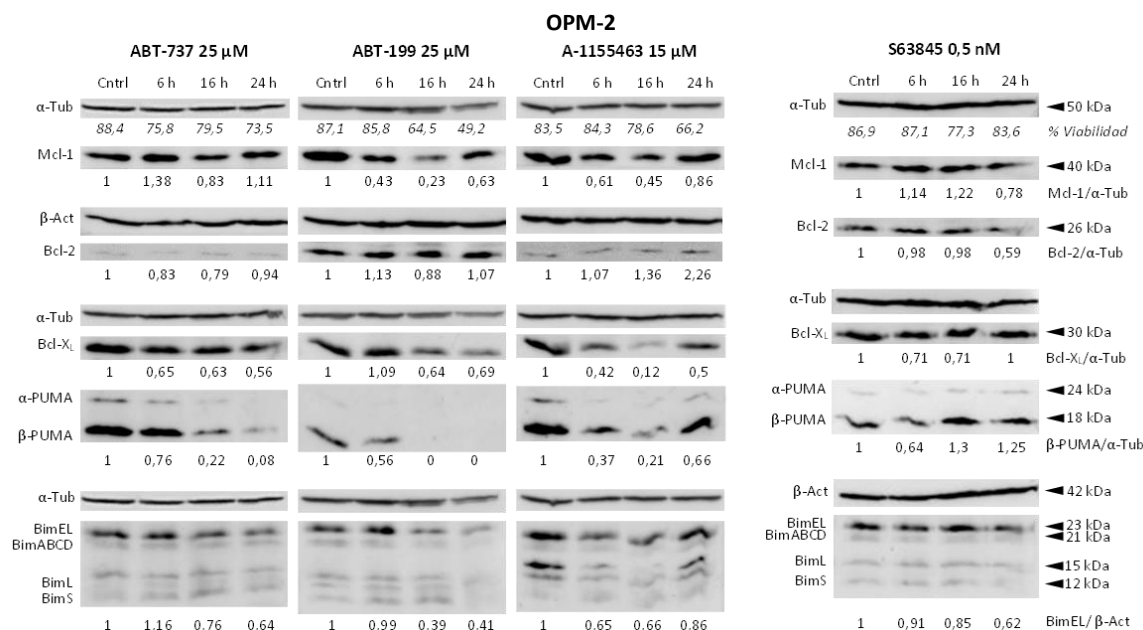


Figura 5.5 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en las células OPM-2 tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos, las cuales fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos indicados. Finalizados los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar la viabilidad celular o el marcaje con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular desencadenada, y se prepararon extractos celulares según se describe en la sección 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imagen proveniente de un único experimento. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

Al igual que en el resto de líneas celulares, la mayoría de los cambios inducidos por los tratamientos en la expresión de estas proteínas en las células OPM-2 han sido sutiles, exceptuando algunas situaciones (Fig. 5.5). Por un lado, la reducción de los niveles de Bim con ABT-199 y de PUMA con los ABTs y con A-1155463, en este último caso a tiempos cortos. Mcl-1 también ve mermada su expresión después de 6 y 16 horas de tratamiento con ABT-199 y A-1155463, al igual que Bcl-X_L con este último compuesto. Sin embargo, Bcl-2 aumenta su expresión tras 24 horas de exposición a A-1155463. Finalmente, a diferencia de lo que sucedía en otras líneas celulares, los niveles de Mcl-1 en las células OPM-2 se mantienen o aumentan ligeramente tras la acción de S63845.

En líneas generales, los miméticos BH3 mantienen la expresión de sus proteínas diana en todas las líneas celulares, un hecho que podría deberse a que los complejos formados por los compuestos y sus proteínas diana ralentizarían y/o impedirían la degradación de estas últimas. Esta teoría estaría respaldada por la suposición de que la interacción de los miméticos BH3 con Bcl-2 y Bcl-X_L no afectaría a su estabilidad [587]. Un ejemplo de ello podría ser la sobreexpresión de Bcl-2 en las células MM.1S tratadas con ABT-737 a partir de 16 horas (Fig. 5.2) y en las RPMI

8226 tras 24 horas de tratamiento con ABT-199 (Fig. 5.4). En estos casos, es posible que los complejos formados por los miméticos BH3 y Bcl-2 se acumulen en las células, siendo más rápida la acumulación en las MM.1S que en las RPMI 8226. No obstante, existen algunas excepciones resaltables. Por ejemplo, Bcl-X_L disminuye sus niveles en las U266 y RPMI 8226 tras 24 horas de actuación de A-1155463 y ABT-737, respectivamente (Figs. 5.3 y 5.4), y en las OPM-2 desde las 6 horas de incubación con ABT-737 y A-1155463 (Fig. 5.5). Quizá en estas células y en las condiciones señaladas, estos miméticos BH3 regulan a la baja los niveles de mRNA de *BCL-X_L* o los complejos Bcl-X_L:mimético BH3 favorecen de alguna manera la degradación de esta proteína. Sea como fuere, todas estas hipótesis deberían ser confirmadas. Pero, sin duda, el cambio más llamativo es el incremento de la expresión de Mcl-1 en presencia de su inhibidor específico, especialmente en las células NCI-H929 (Fig. 5.1), las más dependientes de esta proteína según nuestros resultados (datos no mostrados) y los de *Gong et al.* [588], seguidas de las MM.1S (Fig. 5.2) y U266 (Fig. 5.3), mientras que en las RPMI 8226 (Fig. 5.4) y OPM-2 (Fig. 5.5) este aumento no es tan evidente. El aumento de la expresión de Mcl-1 a consecuencia de la acción de S63845 ha sido observado anteriormente [115, 589], y en uno de los estudios determinaron que la acción de este compuesto estabilizaba la proteína incrementando su vida media [115]. Esto es debido a que la unión de S63845 a Mcl-1 impide la asociación de esta proteína con Noxa, su contraparte “solo-BH3”, que estimula su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma [587]; sin embargo, otros inhibidores de Mcl-1 como maritoclax reducen su expresión fomentando su degradación en el proteasoma [590].

En cuanto al efecto de los compuestos sobre la expresión de las proteínas anti-apoptóticas que no son sus dianas, tampoco se aprecian alteraciones relevantes por lo general en ninguna línea celular. No obstante, sí se observó algún caso en el que los aumentos de estas proteínas podrían corresponder a un mecanismo de compensación (por ejemplo, en las células MM.1S tratadas con A-1155463), lo que lleva a suponer que dicha sobreexpresión es un factor de resistencia al tratamiento aplicado. De hecho, existen evidencias de que las resistencias a los miméticos BH3 están asociadas a la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas que no son sus dianas. Mcl-1 suele ser la principal causante de las resistencias a ABT-737, navitoclax, venetoclax e inhibidores de Bcl-X_L [591–595], aunque en otras ocasiones, la resistencia a venetoclax está mediada por Bcl-X_L [596] o incluso por ambas proteínas [597]. Análogamente, se ha descrito que la resistencia adquirida a ABT-737 en células de linfoma se debe a la sobreexpresión de Bfl-1 y/o Mcl-1 [598].

Por último, en cuanto a las proteínas pro-apoptóticas evaluadas, PUMA es la que más se ve alterada como consecuencia de los tratamientos. Así lo atestiguan la pérdida de su expresión más o menos temprana en todas las líneas celulares debido a la acción de la mayoría de los miméticos BH3, mientras que la exposición de las MM.1S a A-1155463 aumenta la expresión de esta proteína desde muy temprano (Fig. 5.2). Bim, en cambio, mantiene relativamente sus niveles con

los tratamientos en todas las líneas, aunque su expresión disminuye en las U266 y OPM-2 por la acción de A-1155463 y ABT-199, respectivamente (Figs. 5.3 y 5.5), e incrementa sobre todo en las RPMI 8226 expuestas a ABT-737 y A-1155463 (Fig. 5.4). Esto parece indicar que PUMA no media en la respuesta pro-apoptótica a estos fármacos, excepto en las MM.1S tratadas con A-1155463, mientras que Bim sí que podría ser más relevante. No obstante, la menor expresión de PUMA y Bim en ocasiones, podría estar asociada con la aparición de resistencias a los tratamientos, algo que ya ha sido descrito [599], aunque también es posible que la pérdida de expresión de estas dos proteínas se compense con la sobreexpresión de otras pro-apoptóticas no evaluadas, como Bad o tBid, entre otras. Por ello, sería interesante generar líneas celulares *knockout* para uno o varios de los miembros pro-apoptóticos con el fin de conocer la implicación de todos ellos en el mecanismo de acción de estos compuestos.

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados, cabe destacar tres escenarios en los que la respuesta de las células es diferente a la mayormente observada. Uno de ellos es el tratamiento de las células MM.1S con A-1155463. En este caso, el efecto del fármaco sobre la viabilidad celular está dentro del rango esperado, y la expresión de Bcl-X_L no varía demasiado, pero sí se produce un incremento de la expresión del resto de miembros anti-apoptóticos, y en el caso de las pro-apoptóticas, la expresión de Bim cae modestamente, pero incrementa la de PUMA. Todo esto apunta a que el inhibidor de Bcl-X_L compensa la inhibición de esta proteína con la sobreexpresión de otras proteínas anti-apoptóticas, que podrían formar complejos con PUMA y Bim y continuar reprimiendo así la vía apoptótica. Los otros dos casos llamativos se producen en las RPMI 8226 tratadas con ABT-737 y A-1155463. En estas ocasiones, la viabilidad de las células se resintió especialmente al final del tratamiento, aunque la expresión de las proteínas anti-apoptóticas mantuvo por lo general niveles estables; sin embargo, la de PUMA se redujo notablemente y la de Bim incrementó. Estos resultados insinúan que PUMA es prescindible en la respuesta a los fármacos y que estos regulan al alza, al menos, la expresión de Bim sin alterar la de las proteínas anti-apoptóticas. Dado que la viabilidad de las células con ambos compuestos disminuye considerablemente, es posible que ABT-737 y A-1155463 estén liberando a proteínas pro-apoptóticas como Bim del secuestro por parte de sus dianas, de manera que estas quedarían libres para interactuar con las proteínas efectoras y desencadenar la apoptosis. En este sentido, se ha encontrado que ABT-737 es más eficiente interrumpiendo los complejos de Bad con Bcl-X_L y los de Bim con Bcl-2 que los de Bim con Bcl-X_L y Bcl-w [600]. Sin embargo, cuando Bim se libera de Bcl-2, esta es de nuevo secuestrada por Mcl-1, aunque no se puede descartar que una parte de Bim libre active directamente a Bax y Bak [600]. También se ha descrito que su análogo oral, navitoclax, rompe de manera más eficiente los complejos que Bcl-2 y Bcl-X_L forman con Bad y tBid que los complejos (Bcl-2/Bcl-X_L):Bim, y es precisamente la robusta asociación de Bcl-X_L con Bim la que otorga resistencia a este compuesto y a inhibidores específicos de Bcl-X_L [601].

Igualmente, los inhibidores específicos de Bcl-X_L también interrumpen más fácilmente los complejos que Bcl-X_L forma con Bad que con Bim [601]. Por su parte, *Li et al.* observaron que navitoclax era capaz de disociar el complejo Bcl-X_L:Bim en células de cáncer hepatocelular y de próstata, pero esta proteína pro-apoptótica era entonces capturada por Mcl-1 [602]. Asimismo, se ha visto que A-1155463 puede disociar los complejos Bcl-X_L:(Bad/Bax) pero por sí solo no destruye células tumorales humanas ni células normales de otras especies, mientras que su combinación con un agente que induce daño en el DNA es mucho más efectiva [603]. *Alford et al.* también se percataron de que navitoclax liberaba a Bim de su interacción con Bcl-2 pero terminaba siendo neutralizada por Mcl-1 en células de ALL, lo que aportaba cierta ventaja a las células frente a la acción de navitoclax y venetoclax [604]. Por lo tanto, todo esto pone de manifiesto que la respuesta a cada mimético BH3 depende del modelo de estudio utilizado.

En cualquier caso, para dar por buenos los resultados obtenidos en este apartado y confirmar los cambios observados, habría que realizar varias réplicas de estos experimentos. Además, para aportar veracidad a nuestras hipótesis, se necesitan estudios en los que se evalúe la expresión del resto de proteínas pro-apoptóticas, la implicación de cada proteína de la familia Bcl-2, por ejemplo, mediante silenciamiento génico de una o varias de ellas, y las interacciones que se establecen entre esta familia de proteínas en presencia de los compuestos en las células testadas.

5.1.2. Efecto de los miméticos BH3 en líneas celulares de mieloma deficientes en proteínas pro-apoptóticas o que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas

Como se ha comentado anteriormente, la supervivencia del mieloma múltiple depende principalmente de Mcl-1, aunque en ocasiones son Bcl-2 o Bcl-X_L las que juegan un papel decisivo [406, 588, 605, 606]. Por otro lado, Bim está considerada la principal proteína activadora de Bax y Bak en el mieloma, pero se encuentra reprimida por su interacción con las proteínas anti-apoptóticas, especialmente Mcl-1, hasta que un estímulo apoptótico perturba estas asociaciones [607–609]. Así lo atestiguan diversos estudios del grupo de Amiot, que señalan que Bim y Noxa se regulan al alza en respuesta a estímulos apoptóticos de diferente índole en el mieloma y, por lo general, en estas situaciones los complejos Bcl-2:Bim son bastante estables, las asociaciones de Mcl-1 con Bim y Bak y la de Bcl-X_L con Bim se rompen, y Mcl-1 puede interaccionar con Noxa al liberarse de Bim; sin embargo, no detectaron complejos Bim:Bax, lo que relacionaron con una interacción transitoria de estas proteínas [610–612].

En base a estos antecedentes y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, es posible que otros factores distintos a los niveles de expresión de esta familia de proteínas sean los que determinen si las células sobreviven o mueren tras la exposición a los miméticos BH3. Por ello, se creyó oportuno estudiar la respuesta a los inhibidores específicos de

cada una de las proteínas anti-apoptóticas en un amplio panel de células de mieloma con la expresión alterada de una o varias proteínas de esta familia, con el objetivo de intentar esclarecer su implicación en la muerte desencadenada por estos compuestos. En concreto, se utilizaron células RPMI 8226 que sobreexpresaban Bcl-X_L y Mcl-1, células NCI-H929, MM.1S, U266 y RPMI 8226 que carecían de Bim (BimKO), células OPM-2 que lo tenían silenciado (shBim), y células MM.1S deficientes en Bax (BakKO), Bak (BakKO) o ambas (DKO).

Antes de comenzar con el análisis de los resultados es necesario aclarar que en este apartado se decidió trabajar con los datos de las muertes específicas, puesto que los niveles basales de muerte en algunas sublíneas eran superiores al 20 % y este factor podía distorsionar la interpretación de los resultados. Así pues, este estudio se inició abordando el papel de Bim en la muerte inducida por los miméticos BH3 selectivos tras 24 horas de actuación.

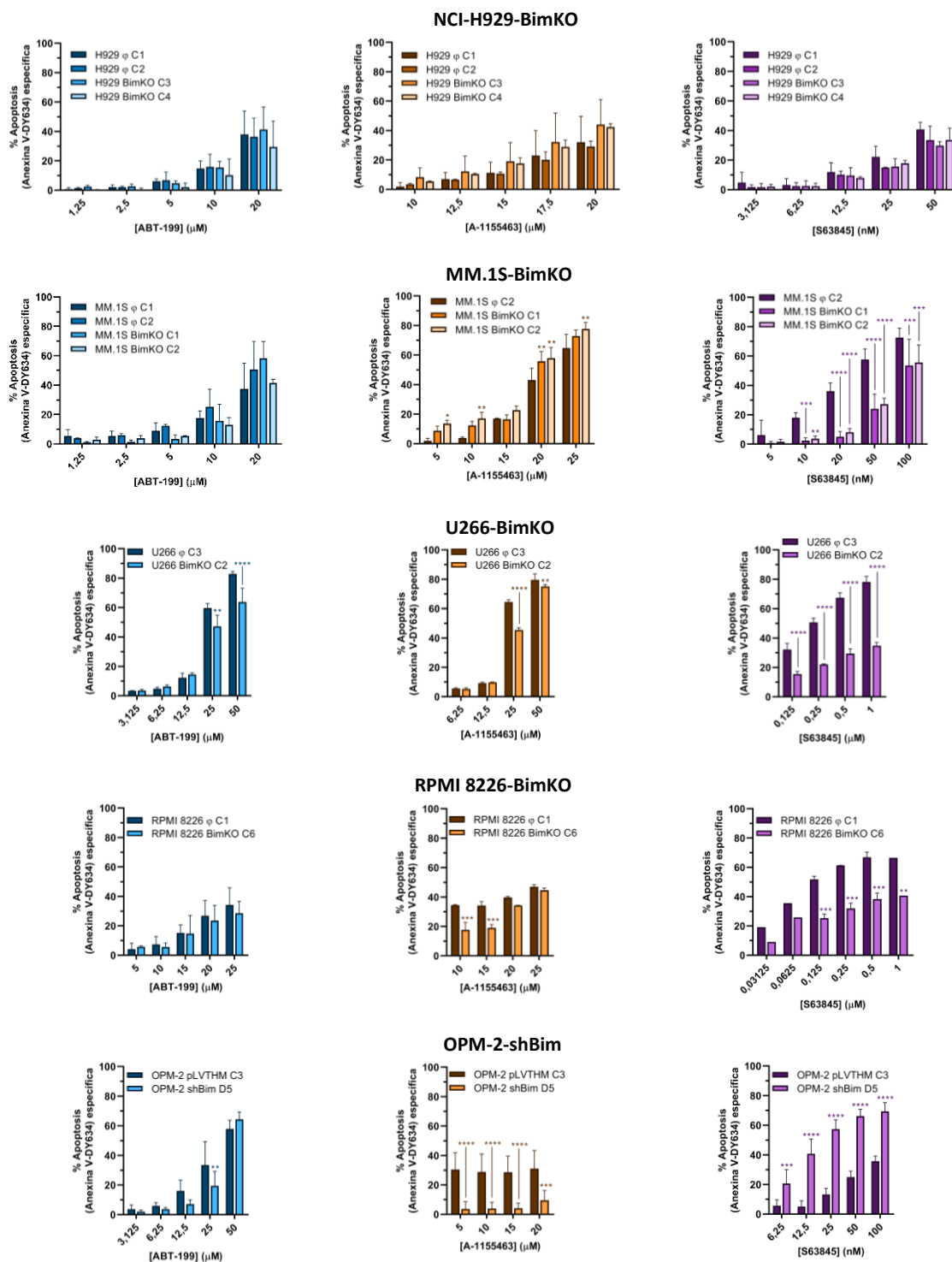


Figura 5.6 | Sensibilidad de células de mieloma múltiple deficientes en Bim a los miméticos BH3. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y estas fueron expuestas a concentraciones crecientes de los miméticos BH3 indicados durante 24 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados muestran la apoptosis específica y son la media $\pm$ SD de $n=1-11$ experimentos independientes, algunos de ellos con duplicados, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey, Dunnett o Sidak, según conviniera, comparando cada concentración de cada mimético BH3 en las líneas silenciadas en Bim respecto a la(s) línea(s) control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Un primer vistazo a la Figura 5.6 revela que el efecto del silenciamiento de Bim es distinto según el mimético BH3 y las sublíneas evaluados. Por un lado, la ausencia de esta proteína ejerce un efecto altamente protector frente a A-1155463 en las células OPM-2 y frente a dosis bajas-intermedias de S63845 en las células MM.1S, pero este se debilita al aumentar la concentración del compuesto. Asimismo, la reducción en la muerte inducida por el inhibidor de Mcl-1 cuando Bim no está presente también es parcial en las células RPMI 8226 y U266, y en el caso de A-1155463, su efecto citotóxico disminuye ligeramente en las células RPMI 8226 a dosis iguales o inferiores a 15 μ M y en las células U266 a la concentración de 25 μ M (15-20 %). Sin embargo, resulta llamativo que las células OPM-2 que carecen de Bim se muestren altamente sensibilizadas a la acción de S63845. Por último, la ausencia de Bim provoca pequeñas diferencias en la sensibilidad a ABT-199, observándose una protección modesta, aunque estadísticamente significativa, solamente en las células U266 a dosis altas y en las células OPM-2 a la dosis de 25 μ M.

El papel de las proteínas “solo-BH3” en respuesta a los miméticos BH3 ha sido ampliamente estudiado, con resultados variables en función del compuesto y tipo de cáncer evaluados. Mientras que numerosos estudios indican que Bim es responsable en mayor o menor medida de la actividad antitumoral de ABT-737, (-)BI97D6, S63845 y la combinación de este último con venetoclax [607, 613–615], otro apunta a que Bim no interviene en la apoptosis inducida por S1, un inhibidor de Bcl-2 y Mcl-1, en células de cáncer de hígado a pesar de que este compuesto disocia los complejos Bcl-2:Bim [616]. Además de Bim, se ha visto que Noxa también puede intervenir en algunas ocasiones. Por ejemplo, *Klanova et al.* observaron que las células de DLBCL (linfoma difuso de células B grandes) sensibles a S63845 formaban complejos de Mcl-1 con Bim, Bak y Noxa, mientras que las resistentes solo tenían complejos Mcl-1:Noxa. Además, se percataron de que el silenciamiento de Bim o de Bim y Bak impedía la muerte de las células sensibles al inhibidor de Mcl-1, pero si se silenciaba Noxa en las células resistentes, estas quedaban sensibilizadas a S63845. Por lo tanto, los autores propusieron que la interacción de Mcl-1 con proteínas activadoras o efectoras predisponían a la muerte celular, pero que su unión a proteínas sensibilizadoras como Noxa no tiene este efecto porque al separarse de Mcl-1 tras la exposición a S63845, esta no puede activar directamente a Bax/Bak e inducir apoptosis [617]. *Morales et al.*, por su parte, propusieron que Noxa y Bim especialmente contribuyen a la acción citotóxica de ABT-737 en células de mieloma, posiblemente debido a la liberación de Bim de Bcl-X_L, mientras que PUMA no participaría [608]. En cambio, en el estudio de *Seiller et al.* se concluyó que Noxa no interviene en la acción citotóxica de S63845 ni en la de su combinación con venetoclax [613]. Finalmente, otro estudio sugirió una función redundante de las proteínas “solo-BH3” que interaccionan con Mcl-1 en el cáncer de mama, puesto que la ausencia de cada una por separado no sensibilizaba a la acción de S63845, pero la eliminación simultánea de Bim, Bid y PUMA

indicaba que estas son necesarias para la activación de Bax y Bak en respuesta a este mimético BH3 [479].

Los resultados aquí obtenidos apuntan a que la implicación de Bim en la muerte inducida por los miméticos BH3 depende de la línea celular, siendo especialmente relevante su papel en la respuesta de algunas líneas celulares a S63845 y A-1155463, como se ha expuesto unas líneas más arriba. No obstante, en ningún momento la depleción de Bim consiguió proteger por completo a las células, por lo que se asume que otras proteínas equivalentes a Bim en su función pro-apoptótica consiguen suplirla en su ausencia, como podrían ser PUMA o tBid, que acabarían activando la vía apoptótica mitocondrial. Curiosamente, nuestros resultados podrían indicar que Bim protegería en cierta medida frente a la acción de S63845 en las OPM-2, ya que cuando esta se silencia, las células son más sensibles al inhibidor de Mcl-1. No obstante, esta conclusión podría ser errónea porque la respuesta de las células control podría variar si se consiguiera reducir la muerte basal y, en consecuencia, la interpretación de los resultados podría ser diferente. Asimismo, tampoco se puede descartar que el efecto sensibilizador observado sea un efecto *off-target* del silenciamiento, ya que el nivel de expresión de las proteínas anti-apoptóticas es mayor en las células control que en las células *wild-type* y shBim, mientras que Bak se expresa a un mayor nivel en las células que no poseen Bim que en las control y en las parentales [421]. Variaciones en la expresión basal de las proteínas de la familia Bcl-2 a causa de los procesos de infección y/o selección de los clones también se produjeron en otras líneas celulares como, por ejemplo, las MM.1S [421]. Además, como consecuencia de estos procesos, las células modificadas incrementaban su tamaño respecto a las células parentales y, en el caso de las MM.1S ϕ C2, estas perdían su capacidad de semi-adherencia, mientras que los clones BimKO la conservaban. [421].

En vista de todo esto, realizar este tipo de ensayos en células silenciadas en una o varias proteínas “solo-BH3” también permitiría conocer su papel en la muerte inducida por los miméticos BH3. Igualmente, sería interesante realizar estudios adicionales evaluando la expresión de las proteínas de esta familia y las interacciones que establecen entre ellas cuando cada una de las sublíneas se expone a los miméticos BH3, ya que es posible que los tratamientos modifiquen los patrones de expresión e interacción de estas proteínas, con el fin de comprobar la veracidad de las hipótesis planteadas y de intentar esclarecer el mecanismo de acción de los compuestos cuando Bim está ausente.

Si el rol desempeñado por las proteínas “solo-BH3” es clave en la inducción de apoptosis, Bax y Bak son trascendentales para su consecución, pues son las encargadas de permeabilizar la membrana mitocondrial externa para que la ruta apoptótica mitocondrial culmine [67]. Es por esto por lo que se ha querido determinar la implicación de ambas proteínas en la muerte inducida

por los miméticos BH3 y si esta vía apoptótica es la única que se activa en respuesta a estos compuestos, gracias a células MM.1S deficientes en Bax y/o Bak generadas previamente en nuestro grupo [424]. A continuación, solo se muestra la sensibilidad de estas células a ABT-199 y S63845, ya que los resultados obtenidos con A-1155463 no fueron concluyentes.

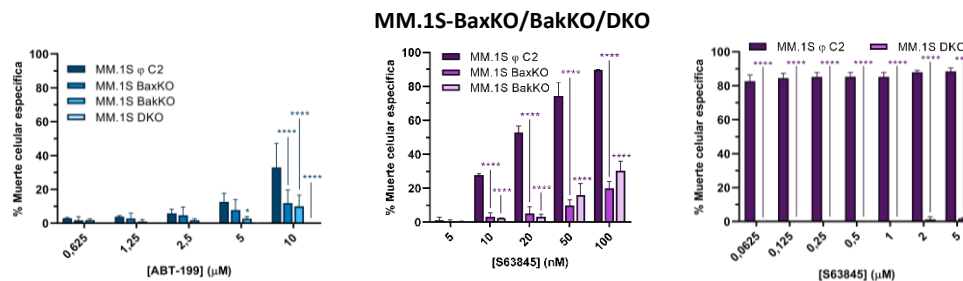


Figura 5.7 | Sensibilidad de células MM.1S deficientes en Bax, Bak o ambas a los miméticos BH3 ABT-199 y S63845. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos, y estas fueron tratadas con concentraciones crecientes de los miméticos BH3 señalados durante 24 horas. A continuación, se determinó la muerte celular desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados muestran la muerte celular específica y son la media $\pm$ SD de $n=2-5$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett o Sidak, según conviniera, comparando cada concentración de cada mimético BH3 en las líneas KO y DKO respecto a la línea vector vacío. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Los datos recogidos en la Figura 5.7 reflejan que las células que no expresan ni Bax ni Bak están totalmente protegidas frente a ABT-199 y S63845 incluso a las dosis más altas testadas, lo que confirma que estos compuestos activan únicamente la vía apoptótica mitocondrial. Sin embargo, la ausencia de Bax y Bak por separado proporciona una protección similar a dosis elevadas de ABT-199 y a cualquier dosis de S63845, lo que apunta a un papel redundante de Bax y Bak en la acción citotóxica de estos compuestos. Además, el efecto protector frente a este último compuesto es bastante elevado incluso a las dosis más altas.

La resistencia de células deficientes en Bax y Bak a miméticos BH3 (Fig. 5.7) ya había sido descrita por otros autores en diversos modelos celulares [115, 588, 618, 619]. Asimismo, otros miméticos BH3 como ABT-737, S1, A-1331852 y AMG-176 también han demostrado que su actividad antitumoral depende exclusivamente de la vía apoptótica mitocondrial [616, 619–622]. En este sentido, *Villalobos-Ortiz et al.* establecieron una serie de criterios que los compuestos debían cumplir para ser catalogados como “auténticos miméticos BH3”, y sus resultados les permitieron sentenciar que ABT-199, A-1155463, S63845 y ocho compuestos más, incluido ABT-737, cumplen los requisitos para ser considerados como tal [623]. Sin embargo, cuando solamente está ausente una de las proteínas efectoras, nuestros resultados indican que los miméticos BH3 todavía inducen cierta toxicidad a dosis elevadas. Por lo general, estos resultados reafirman los obtenidos por otros autores con otros compuestos y en otros tipos de células tumorales, apuntando hacia una función pro-apoptótica redundante de Bax y Bak [613, 615, 616].

Por el contrario, un estudio reveló que la eliminación de Bak sensibilizaba parcialmente a la acción de ABT-199 en células de AML resistentes a este mimético BH3 [624], mientras que otro determinó que la ausencia de Bax favorece la resistencia a miméticos BH3 en un modelo murino de AML [625].

Del mismo modo que la ausencia de proteínas pro-apoptóticas condiciona el destino final de las células y el camino que estas siguen hasta llegar a él, niveles elevados de las proteínas anti-apoptóticas también resultan decisivos en dicho desenlace. Gracias a que el grupo disponía de células RPMI 8226 que sobreexpresaban alguno de los miembros anti-apoptóticos, concretamente, Bcl-X_L o Mcl-1, se pudo estudiar el efecto de los miméticos BH3 cuando las proteínas anti-apoptóticas se encuentran reguladas positivamente.

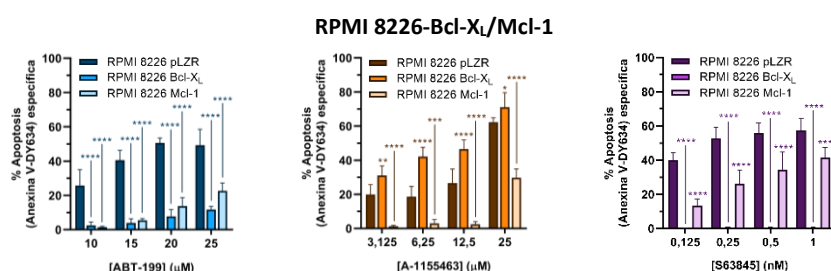


Figura 5.8 | Sensibilidad de células RPMI 8226 que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas a los miméticos BH3. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 pocillos, que fueron expuestas a concentraciones crecientes de los miméticos BH3 señalados durante 24 horas. Tras este tiempo, se determinó la muerte celular provocada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634 y citometría de flujo. Los resultados muestran la muerte celular específica y son la media $\pm$ SD de n=2-3 experimentos independientes con duplicados, y el análisis estadístico realizado ha sido el two-way ANOVA con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de cada mimético BH3 en las líneas con mayor expresión de Bcl-X_L y Mcl-1 respecto a la línea vector vacío. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Tal y como muestra la Figura 5.8, la sobreexpresión de una u otra proteína anti-apoptótica condicionaba la respuesta de las células. ABT-199 afecta a la viabilidad de las células control, pero no resulta tóxico en células con un mayor nivel de expresión de Bcl-X_L y Mcl-1, salvo a dosis altas, con las que el porcentaje de células apoptóticas comienza a aumentar, y lo hace en mayor medida en las células que sobreexpresan Mcl-1. Esto parece apuntar a que la sobreexpresión de una u otra proteína anti-apoptótica, en especial Bcl-X_L, protege en gran medida de la acción de este mimético BH3. La respuesta es completamente opuesta cuando las células se exponen a A-1155463, pues en este caso la sensibilidad de las células que sobreexpresan Bcl-X_L es igual o incluso superior a la que muestran las células RPMI 8226 pLZR, mientras que la línea que sobreexpresa Mcl-1 es excepcionalmente resistente a este compuesto, excepto a la dosis más elevada. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el inhibidor de Bcl-X_L contrarresta eficazmente la sobreexpresión de esta proteína, e incluso sensibiliza ligeramente a estas células, mientras que una mayor expresión de Mcl-1 es capaz de proteger frente a la acción de este

compuesto, aunque de forma menos efectiva a la dosis más alta. Finalmente, S63845 es moderadamente tóxico para la línea control desde la dosis más pequeña, inocuo a cualquier concentración para las células que sobreexpresan Bcl-X_L y despliega una toxicidad intermedia en aquellas células que poseen mayores niveles de Mcl-1. De aquí se infiere que la inhibición farmacológica de Mcl-1 no es capaz de neutralizar por completo la sobreexpresión de Mcl-1, pero la sobreexpresión de Bcl-X_L es sumamente protectora frente a S63845, lo que otorga una clara ventaja para la supervivencia de estas células.

En general, los efectos aquí observados se corresponden con las resistencias descritas asociadas a los miméticos BH3. De hecho, se sabe que la co-expresión de Bcl-X_L o Mcl-1 con Bcl-2 y una mayor expresión de las primeras interfieren en la sensibilidad a venetoclax, no solamente en el mieloma múltiple, sino en un amplio abanico de tumores hematológicos [606, 613, 624, 626–628]. Por otro lado, el inhibidor de Bcl-X_L WEHI-539 no es tan efectivo en células de cáncer de mama que sobreexpresan Bcl-2 como en las que sobreexpresan Bcl-X_L [629]. Asimismo, la dependencia por Bcl-2 en células de SCLC (cáncer de pulmón de células pequeñas) y de AML confiere resistencia a la inhibición de Bcl-X_L con A-1155463, y la sobreexpresión de Mcl-1 es la culpable de la escasa actividad antitumoral de ABT-737 en la AML [615, 619]. Finalmente, la resistencia a la inhibición farmacológica de Mcl-1 generalmente correlaciona con una regulación positiva de Bcl-X_L [115, 622]. No obstante, modelos de xenoinjerto de DLBCL y linfoma de Burkitt revelan que la sobreexpresión tanto de Bcl-X_L como de Mcl-1 se asocian con la resistencia adquirida a S63845 [617]. También la regulación negativa de proteínas pro-apoptóticas o la regulación al alza de los miembros anti-apoptóticos, incluida Mcl-1, se asocia con la resistencia a la inhibición de Mcl-1 en el mieloma [630].

Para completar este estudio, faltaría comprobar si la sobreexpresión de Bcl-2 protege o no frente a ABT-199 y si esta supone un factor de resistencia a la inhibición de Bcl-X_L y/o Mcl-1. Igualmente, estudios de expresión e inmunoprecipitación aportarían información adicional desvelando posibles variaciones en el perfil de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y las interacciones que estas proteínas establecen en respuesta a cada tratamiento, con el fin de obtener una visión global de lo que puede estar pasando a nivel molecular cuando algunas proteínas pro-apoptóticas no están presentes y las anti-apoptóticas se sobreexpresan.

5.1.3. Efecto de la inhibición de Bcl-X_L sobre el ciclo celular de células U266

Ensayos anteriores de dosis-respuesta realizados a 48 horas con los miméticos BH3 en células de mieloma revelaron que, en algunos casos, el perfil de toxicidad observado era compatible con la parada del ciclo. Esto se observó en un trabajo previo del grupo cuando, por ejemplo, las células U266 se trataban con A-1155463 durante 48 horas, pues entonces la muerte inducida por el compuesto se estancaba y no superaba el 20 % incluso a la concentración más alta

testada (2,5 μ M) [428]. Por ello, se decidió evaluar la progresión del ciclo celular en estas células cuando se exponían durante breves periodos de tiempo a concentraciones más altas de este mimético BH3, ya que la acción de estos compuestos es bastante rápida. Puesto que la toxicidad observada a 48 horas fue discreta a la dosis indicada, se realizó una prueba de ensayo dosis-respuesta a 24 horas (datos no mostrados) para determinar la sensibilidad de las células U266 al inhibidor de Bcl-X_L a este tiempo, gracias a la cual se acabó escogiendo la dosis de 25 μ M para llevar a cabo estos ensayos.

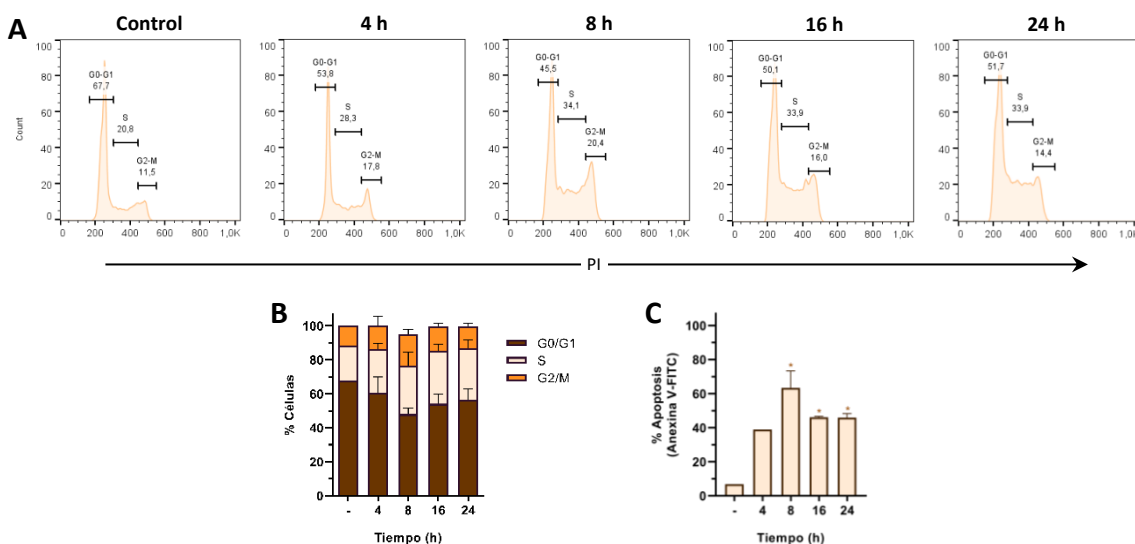


Figura 5.9 | Ciclo celular de las células U266 tratadas con A-1155463 durante 4, 8, 16 y 24 horas. (A) Experimento representativo de la menos un experimento independiente. (B) Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular a cada tiempo evaluado. (C) Muerte celular inducida por A-1155463 a la concentración y los tiempos indicados. 10⁶ células totales se dispusieron en 1 ml en placas de 12 pocillos y se incubaron con el mimético BH3 A-1155463 a una concentración final de 25 μ M durante 4, 8, 16 y 24 horas. Finalizados los tratamientos, se determinó la muerte desencadenada mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo, y las células se marcaron con yoduro de propidio según se describe en la sección 3.5 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=1-2 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada tiempo respecto al control. *p < 0,05.

Las gráficas de la Figura 5.9 confirman el comportamiento esperado en las células control y que la presencia del inhibidor de Bcl-X_L altera ligeramente la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular desde las primeras horas de tratamiento. Las células no tratadas exhiben el perfil típico asociado con el crecimiento exponencial: alrededor del 70 % de ellas se encuentran en la fase G0/G1, un 20 % lo hace en la fase S y el 10 % restante permanece en la fase G2/M. Sin embargo, esta distribución se ve alterada por la acción de A-1155463, el cual provoca un ligero aumento del porcentaje de células en las fases S y G2/M en función del tiempo de exposición. Tratamientos de 4, 16 y 24 horas de duración se traducen en una toxicidad moderada (de entre el 40 y 50 %) y en un enriquecimiento de la población en la fase S de, aproximadamente, el 10 % en detrimento de las células localizadas en la fase G0/G1. No obstante, cuando el

compuesto actúa durante 8 horas, el efecto citotóxico ronda el 60 %, y la fase G0/G1 pierde alrededor del 20 % de su población, que se reparte por igual entre las fases S y G2/M.

Estos resultados están en la línea de los pocos estudios que también adjudican a los miméticos BH3 la capacidad de alterar el perfil habitual del ciclo celular. Se ha descrito que venetoclax incrementa la población de células de cáncer de mama en la fase G0/G1 y reduce la localizada en fase S, posiblemente debido a la regulación negativa de ciclina D1 y E2F1, que están implicados en la transición G1/S [631]. Este compuesto inducía el mismo perfil en células de neuroblastoma, mientras que en células de glioblastoma provocaba un discreto bloqueo en G0/G1 y una leve disminución de las poblaciones S y G2/M [632]. ABT-737 también se ha asociado con la parada en G1/S mediada por p53 y p21 en el cáncer renal [633]; sin embargo, en el cáncer colorrectal y en la AML, este mimético no altera el ciclo celular [634, 635]. Otro estudio observó que los inhibidores de Mcl-1 S63845 y AMG176 inducían un leve arresto mitótico en células no tumorales de ratón (MEFs) y en células de cáncer colorrectal, mientras que ABT-199 no tenía este efecto en estas últimas células [636]. Por otra parte, el efecto de obatoclax sobre el ciclo celular varía en función del tipo celular estudiado, ya que propicia el arresto en la fase S en células de AML y de cáncer de mama y de vejiga, mientras que en células de cáncer de esófago la detención tiene lugar en la fase G0/G1 a través de la vía p38/p21^{waf1/Cip1}, y en el cáncer colorrectal el arresto en G1 va acompañado de la pérdida de expresión de ciclina D1 y la regulación positiva de p27 y p21 [634, 637–640]. A diferencia de lo descrito en este trabajo, *Li et al.* confirmaron que tanto A-1155463 como A-1331852 no detenían el ciclo celular ni inducían niveles destacables de muerte en las células A549 a las concentraciones testadas [641].

En vista de nuestros resultados, es posible concluir que el impacto de A-1155463 sobre el ciclo celular de las U266 es más bien pequeño desde muy temprano, pues las poblaciones ancladas en las fases S y/o G2/M en presencia del mimético BH3 son ligeramente superiores a las existentes en las células sin tratar, y que el potencial antitumoral de este inhibidor se debe principalmente a su temprana actividad citotóxica. No obstante, pese al limitado efecto sobre el ciclo celular, sería interesante conocer el nivel de expresión de proteínas reguladoras de este proceso cuando actúa A-1155463. Igualmente, vendría bien realizar ensayos de reducción de MTT o similares para determinar si este compuesto también posee actividad citostática que pudiera quedar sin cubrir por su potencial citotóxico.

5.1.4. Los miméticos BH3 no inducen autofagia en células de mieloma múltiple

En el apartado 4.3 se ha propuesto que algunos miméticos BH3 activan la ruta autofágica en células de tumores sólidos, aunque en algunos casos esta no llegaría a culminarse. Tomando como referencia estos resultados y las numerosas alusiones en la literatura a la capacidad de estos compuestos de inducir autofagia en diferentes tipos de células cancerosas procedentes de tumores

sólidos [496, 514, 642, 643], se decidió evaluar si estos compuestos también activan esta vía en líneas celulares de mieloma múltiple tras breves periodos de incubación (6-24 horas).

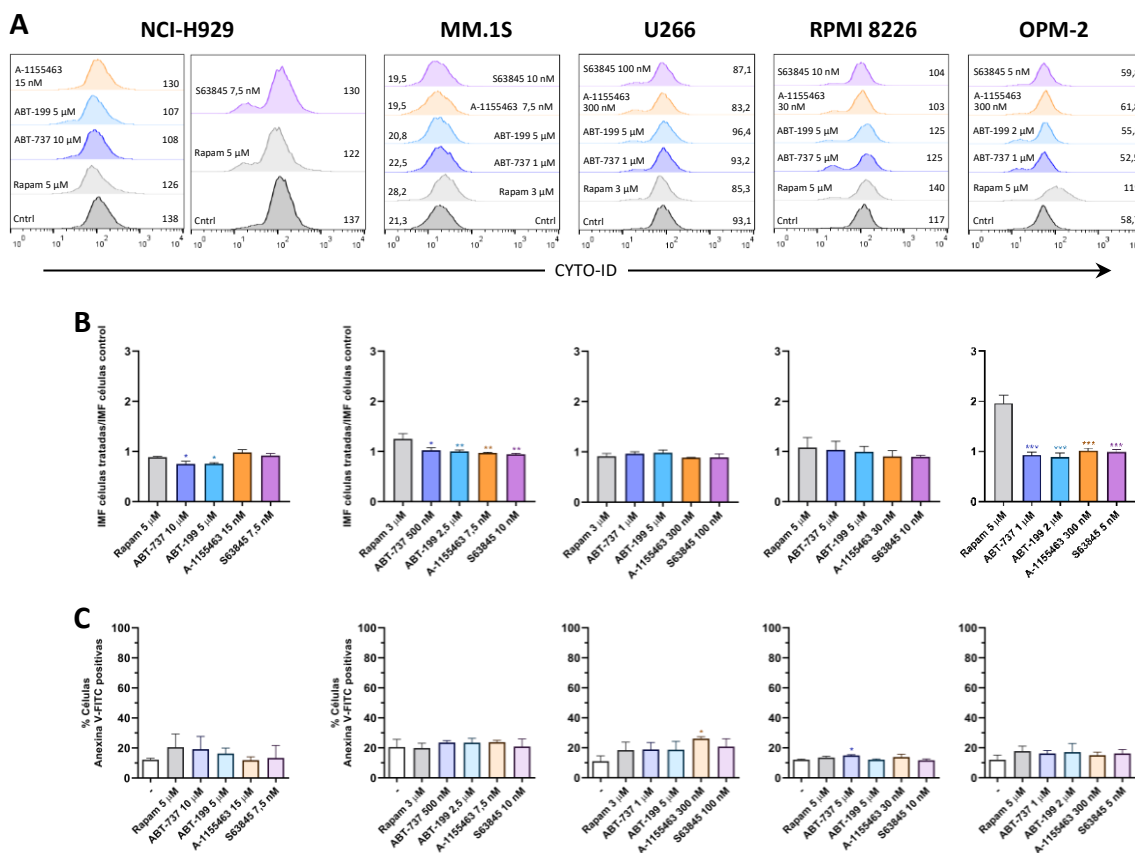


Figura 5.10 | Efecto de los miméticos BH3 sobre la vía autofágica en líneas celulares de mieloma múltiple. Se sembraron entre 10^5 y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 µl en placas de 24 o 48 pocillos y se trataron con rapamicina (control positivo) y los miméticos BH3 a las dosis señaladas durante 24 horas. Tras las incubaciones, se determinaron el flujo autofágico (**A** y **B**) y la muerte inducida por cada compuesto (**C**) por citometría de flujo mediante el kit comercial CYTO-ID® y marcaje con Anexina V-FITC, respectivamente. Los histogramas son representativos de al menos dos experimentos independientes, y en ellos se indica la intensidad media de fluorescencia para cada tratamiento. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-7$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada compuesto en cada línea con respecto a rapamicina o a las células sin tratar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A nivel general, tanto los histogramas (Fig. 5.10A) como las gráficas de la intensidad media de fluorescencia relativa (Fig. 5.10B) revelan variaciones mínimas en la señal fluorescente derivada del marcaje con CYTO-ID entre las células de mieloma no tratadas y las expuestas a dosis subletales de rapamicina y los miméticos BH3 durante 24 horas (Fig. 5.10C). Solamente la señal de rapamicina en las células OPM-2 es mayor que la basal y la emitida tras la acción de los miméticos BH3. Por lo tanto, todo esto indica que la autofagia no se activa en las células de mieloma en respuesta a ningún mimético BH3 ni a rapamicina, salvo en el caso de las células OPM-2 expuestas a este último compuesto.

Puesto que la apoptosis inducida por rapamicina en todos los casos ronda el 20 %, se podría incrementar la dosis a utilizar sin que llegue a ser excesivamente tóxica en aquellas células en las que la señal detectada ha sido baja para confirmar que este fármaco induce autofagia en ellas, aunque otra opción sería cambiar de inductor de autofagia por otro más potente para asegurar el control positivo. Por otro lado, en algunos casos, como por ejemplo con rapamicina y S63845 en las NCI-H929 y ABT-737 en las RPMI 8226 se observa un doble pico, en el que el pico más pequeño se asocia con una subpoblación celular que presenta menor marcaje de la sonda y que, posiblemente, no es viable.

Además de estos ensayos, también se evaluó la variación de la expresión de proteínas relevantes en la vía autofágica como son p62 y LC3B-I/II cuando las células se trataban durante cortos periodos de tiempo con los miméticos BH3 y, además, en algunos casos se incluyó cloroquina como control positivo de la expresión de la forma lipídica de LC3B. Dado que estos experimentos no se realizaron simultáneamente a los anteriores, fue necesario reajustar las concentraciones de cada mimético BH3 para cada línea celular.

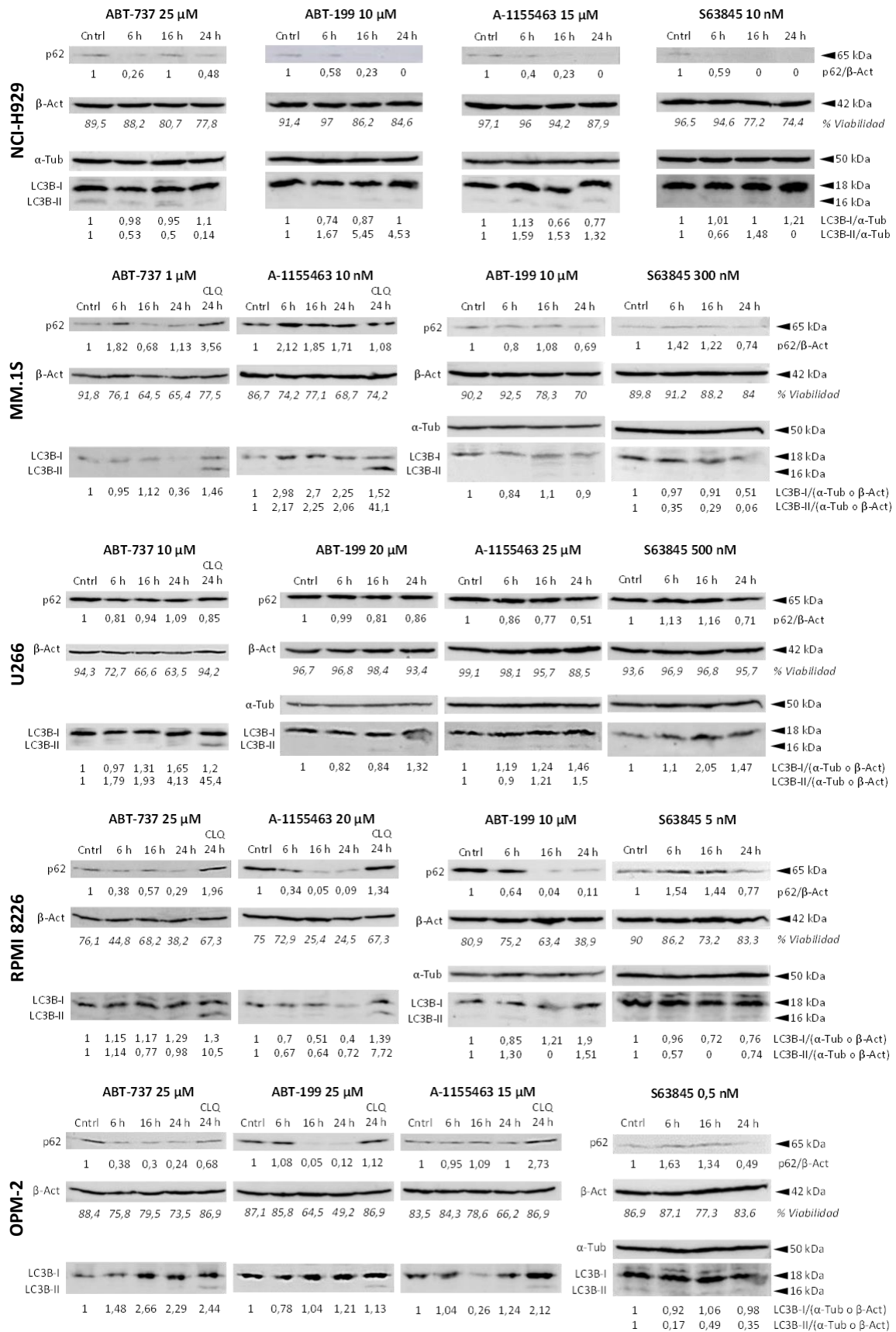


Figura 5.11 | Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en células de mieloma múltiple tratadas con los miméticos BH3. Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos y estas fueron expuestas a cada mimético BH3 a las concentraciones y tiempos señalados. Concluidos los tratamientos, se realizó el recuento con azul Trypan para estimar

la viabilidad celular o se marcaron con Anexina-V FITC para determinar la muerte celular inducida, y se prepararon extractos celulares según se indica en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas de interés utilizando α -tubulina o β -actina como control de carga, y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga. Imágenes procedentes de un único experimento para cada línea celular. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones.

La Figura 5.11 revela que la cloroquina mantiene o aumenta los niveles de p62 a la vez que promueve la expresión de LC3B-II en todas las líneas celulares en las que se evaluó su efecto. Sin embargo, el aumento de la expresión de LC3B-II es mucho más sutil tras la acción de algunos miméticos BH3, como puede ser el caso de las células NCI-H929 tratadas con ABT-199 o las MM.1S expuestas a A-1155463. En cambio, sus niveles decaen en otras ocasiones, como, por ejemplo, cuando las células MM.1S y OPM-2 se tratan con S63845. Por otro lado, la expresión de p62 se mantiene o se reduce con la mayoría de los tratamientos, y solo en algunos casos, como en las células MM.1S expuestas a A-1155463, se produce un incremento de su expresión.

Durante el transcurso normal del proceso autofágico, p62 se localiza en los autofagosomas y en las etapas finales es degradado por los lisosomas, mientras que LC3B-II suele actuar como un indicador del flujo autofágico [644]. Esto se traduce en una caída de los niveles de p62 y en el incremento de la expresión de LC3B-II, con o sin pérdida de expresión de LC3B-I. Sin embargo, si ambos marcadores aumentan es sinónimo de que los autofagosomas se forman, pero su contenido no se degrada y estos no son eliminados en la etapa final de la autofagia [644]. Por lo tanto, en esta situación la autofagia se activaría, pero no llegaría a completarse. Si se aplican estos criterios a los resultados arrojados por los ensayos de *Western Blot*, la autofagia se habría activado y parece completarse en las células NCI-H929 tratadas con ABT-199 y A-1155463. Esta situación también podría darse en las células U266, RPMI 8226 y OPM-2 expuestas durante 24 horas con A-1155463, ABT-199 y ABT-737, respectivamente, pues según los datos de las cuantificaciones, los niveles de p62 disminuyen y los de LC3B-II aumentan sutilmente en estos casos. En otras ocasiones, la autofagia se activaría, pero no llegaría a culminar, tal y como reflejan los niveles de p62, similares o aumentados con respecto al control, y los de LC3B-II. Esta activación sería muy modesta en las MM.1S tratadas con A-1155463, en las U266 expuestas a ABT-737 y a partir de las 16 horas de incubación con ABT-199 en las MM.1S y U266, dado que el aumento de la expresión de LC3B-II es muy pequeño. En cambio, cloroquina incrementa de forma notoria los niveles de la forma lipídica de LC3B en todas las líneas celulares en las que se ha testado, por lo que induciría una activación más potente de la autofagia. No obstante, este compuesto, empleado en la clínica como anti-malárico, actúa como inhibidor de la autofagia, ya que ralentiza la acidificación lisosomal y, en consecuencia, la fusión de los autofagosomas con los lisosomas se inhibe, bloqueándose la degradación de los autofagosomas en las etapas finales del proceso, lo

que hace que se acumulen proteínas degradadas en el citoplasma y se produzca estrés en el retículo endoplásmico [644–646]. Por otro lado, en el resto de situaciones no se activaría la autofagia, y en aquellos casos en los que LC3B-II se expresa a nivel basal existiría un mínimo nivel de autofagia basal.

Un resultado interesante ha sido el obtenido con los ABTs y A-1155463 en las células RPMI 8226 y con ABT-199 en las células OPM-2. En todos estos casos, la expresión de p62 disminuye de manera significativa, pero la isoforma LC3B-II no se detecta o experimenta pequeñas oscilaciones en sus niveles a simple vista. Además, el transcurso de los tratamientos compromete la viabilidad de las células. Todo ello viene a decir que la autofagia no se estaría activando, y dado que los tratamientos aplicados resultan tóxicos para las células, la apoptosis prevalecería. Recientemente se ha descrito que el dominio UBA de p62 puede interaccionar con la caspasa-8 poliubiquitinada, lo que favorece su agregación y completa activación [647, 648]. Entonces, ambas proteínas se reclutan en los agrosomas citosólicos, donde p62 se agrega para dirigirse a la vía autofágica en condiciones normales, de manera que ambas podrían interactuar. Según la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>, código de acceso: Q13501 [SQSTM_HUMAN]), p62 posee la secuencia IEVD, que sería compatible con la secuencia consenso de corte para la caspasa 8, XEXD, siendo X cualquier residuo [649]. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que, ante situaciones en las que la muerte celular es elevada, p62 sea proteolizada por la caspasa 8. Aunque en este trabajo no se observa dicho procesamiento, esta hipótesis podría explicar los resultados de un estudio anterior del grupo, en el que se detectó mediante ensayos de *Western Blot* que p62 se procesaba en células de mieloma múltiple cuando la muerte inducida por carfilzomib comenzaba a ser relevante [650].

Si se coteja el conjunto de resultados obtenidos en relación con la capacidad de inducción de autofagia de los miméticos BH3 en los distintos tipos de cánceres estudiados, queda patente que estos compuestos son más eficaces activando este proceso en los tumores sólidos que en el mieloma múltiple, ya que en este último caso la autofagia que parece inducirse en algunas situaciones es muy discreta. Por ello, es posible que las distintas respuestas observadas en este aspecto se deban a factores intrínsecos de los tipos celulares utilizados. No obstante, pese a que este enfoque ha sido menos explorado en tumores de origen hematológico, la literatura recoge diversos ejemplos en los que los miméticos BH3 inducen autofagia en ellos. De hecho, se ha descrito que ABT-737 activa simultáneamente la apoptosis y la autofagia en células de mieloma al liberar Bim y Beclina 1 de su secuestro por parte de Bcl-2, y esta autofagia tendría una función citoprotectora [614]. Análogamente, este mimético BH3 también indujo autofagia al romper la asociación Bcl-2:Beclina 1 en células de linfoma, con un efecto citoprotector asociado [651]. Navitoclax también se ha descrito que estimula la autofagia en células de leucemia y, de nuevo,

ejercería un papel citoprotector [652]. Incluso se ha publicado que la combinación de ABT-199 y WEHI-539 activa la autofagia mediada por el eje NOX4/ROS/p38 MAPK [653].

En resumen, los ensayos de citometría realizados revelan la incapacidad de los miméticos de inducir autofagia en células de mieloma a las dosis utilizadas; por el contrario, algunos ensayos de *Western Blot* apuntan a la activación de esta vía a muy bajos niveles en algunos casos, la cual podría llegar a completarse (NCI-H929 tratadas con ABT-199 y A-1155463) o ser defectuosa (por ejemplo, en las MM.1S y U266 tratadas con A-1155463 y ABT-737, respectivamente). Esta discrepancia en los resultados puede ser debida al uso de distintas dosis en ambos tipos de experimentos, siendo mayores las utilizadas en los ensayos de *Western Blot*. En cualquier caso, los resultados derivados de estos últimos ensayos sugieren que la apoptosis y la autofagia son eventos excluyentes, como ya se ha descrito [125], pues cuando los compuestos son tóxicos la autofagia no se activaría, y cuando la toxicidad inducida es baja, la autofagia parece activarse de forma discreta. No obstante, las conclusiones extraídas a lo largo de este apartado acerca de la activación o no de la autofagia como consecuencia de la acción de los miméticos BH3 pueden no ser definitivas y deberían ser confirmadas con repeticiones futuras de estos experimentos, ya que los ensayos de *Western Blot* solamente se han realizado una vez en este trabajo. Además, sería interesante llevar a cabo estudios de inmunoprecipitación con proteínas autofágicas y las de la familia Bcl-2 para intentar esclarecer las interacciones que se establecen entre todas ellas y dar veracidad a las conclusiones alcanzadas en este estudio.

5.2. Caracterización del mecanismo de acción de fármacos antimitóticos en el mieloma múltiple

Numerosas moléculas reguladoras del ciclo celular también se erigen como una atractiva diana en el mieloma múltiple. Anomalías genéticas como mutaciones, deleciones, ganancias y translocaciones se asocian con la desregulación de ciclinas tipo D, la proteína Rb y los inhibidores de CDKs de las familias INK4 y Cip/Kip [361]. Además, la inestabilidad cromosómica y la aneuploidía que caracterizan al mieloma están vinculadas a la desregulación de puntos de control del ciclo celular como el SAC, y la alteración de varias familias de quinasas mitóticas, incluidas las familias Aurora y PLK1, también contribuye a las aberraciones cromosómicas [361]. La quimioterapia actual frente al mieloma solamente contempla un fármaco antimitótico, vincristina [361]. Sin embargo, este agente anti-microtúbulos ofrece una actividad anti-mieloma limitada, presenta toxicidades importantes, incluidas la neutropenia y la neuropatía periférica, y se asocia con el desarrollo de multi-resistencias [361]. Todo esto clama un enfoque terapéutico diferente que la inhibición de quinasas mitóticas podría satisfacer. La sobreexpresión de Aurora A es frecuente en el mieloma y se ha relacionado con la amplificación del centrosoma y un valor pronóstico contradictorio, contribuyendo posiblemente a la inestabilidad cromosómica [361].

Esto ha hecho que la mayoría de las investigaciones se hayan centrado en la evaluación de inhibidores específicos de Aurora A y de pan-inhibidores de la familia, que en ensayos preclínicos han mostrado ser eficaces frente al mieloma; sin embargo, los primeros datos clínicos son, por lo general, desesperanzadores [361, 654, 655]. No obstante, alisertib, un inhibidor específico de Aurora A, es el único de su clase que ha mostrado actividad anti-mieloma *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos tempranos en solitario y combinado con bortezomib, aunque la eficacia clínica demostrada es más bien modesta (tasa de respuesta del 26,9 % en la combinación), pero suficiente como para continuar las investigaciones [364, 365, 655]. Por otro lado, la sola inhibición de Aurora B también podría resultar interesante en el tratamiento del mieloma múltiple, pues el fenotipo inducido por los pan-inhibidores se ajusta más a la inhibición de Aurora B que a la de Aurora A [361, 395, 654]. Si bien se sabe que estos compuestos provocan alteraciones en el ciclo celular, autofagia, senescencia y la muerte de las células [395, 396, 502, 503, 654, 656], los mecanismos moleculares subyacentes a su actividad continúan siendo un misterio.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido intentar descifrar el mecanismo de acción de alisertib y barasertib (un inhibidor selectivo de Aurora B) y evaluar la eficacia de su combinación con miméticos BH3 y otros agentes anti-neoplásicos.

5.2.1. Estudio de la sensibilidad de células de mieloma múltiple a inhibidores de Aurora quinasa

En primer lugar, se determinó el potencial antitumoral de alisertib y barasertib en el panel de cinco líneas celulares de mieloma *wild-type* que se ha usado hasta el momento. Previamente, el grupo había detectado un exiguo poder citotóxico de ambos compuestos en células NCI-H929, MM.1S y U266 tras 24 horas de actuación [418]. Dado que estos compuestos actúan a nivel de la mitosis, en este trabajo los tiempos de estudio fueron de 24, 48 y 72 horas, con el fin de evaluar su actividad antitumoral a corto, medio y largo plazo.

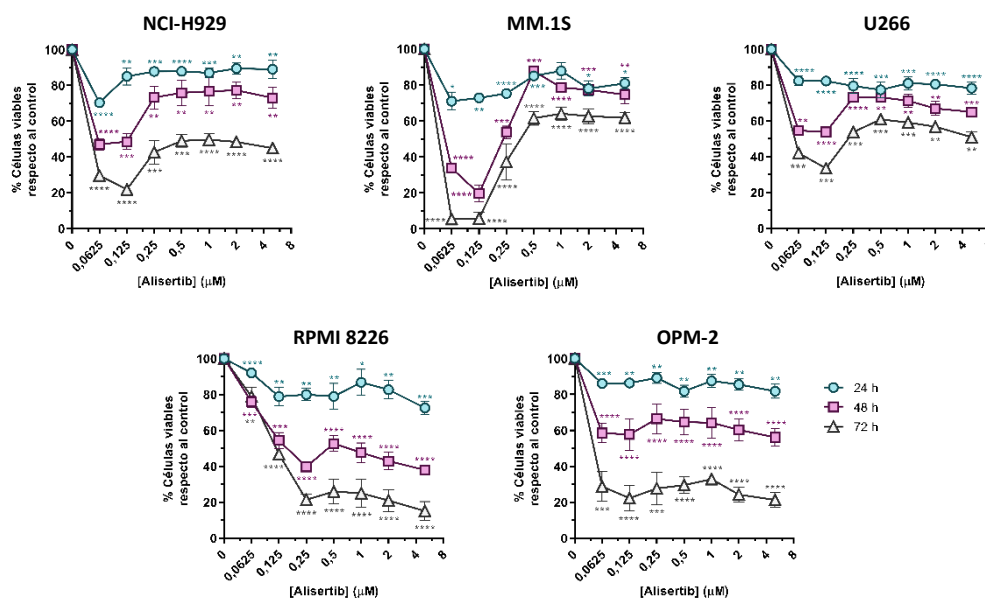


Figura 5.12 | Inhibición del crecimiento de líneas celulares de mieloma múltiple tras su exposición a alisertib. Se sembraron, al menos por cuadruplicado, entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml en 100 μ l en placas de 96 pocillos de fondo plano y estas se expusieron a concentraciones crecientes de alisertib (0-5 μ M). Tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de reducción del MTT según se indica en la sección 3.2.1 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-5 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t*-test despareado de dos colas, comparando cada concentración respecto al control para cada tiempo. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

La Figura 5.12 expone que el efecto antitumoral de alisertib se incrementa con el paso del tiempo en todas las células estudiadas. *Grosso modo*, pueden advertirse dos patrones de respuesta diferentes en función de la línea celular. Por un lado, las células U266, NCI-H929 y, en particular, MM.1S sufren una reducción del crecimiento a dosis bajas de alisertib, especialmente tras 48 y 72 horas de exposición al fármaco, produciéndose un efecto inhibitorio máximo en todas ellas en el rango 62,5-125 nM. No obstante, a concentraciones elevadas el efecto del compuesto es menor. Por otra parte, las células RPMI 8226 y OPM-2 se muestran afectadas de forma similar a exposiciones con alisertib de 24 horas de duración. Sin embargo, el tratamiento a 48 horas desvela que las células RPMI 8226 reducen en mayor medida su capacidad proliferativa que las OPM-2 y que la inhibición máxima del crecimiento en las primeras se produce a dosis mayores que en las segundas (250 nM vs 62,5-125 nM). No obstante, el porcentaje de células viables respecto al control aumenta para las células RPMI 8226 en el rango de concentraciones 250-500 nM, y vuelve a decaer paulatinamente a partir de 500 nM. Finalmente, tras 72 horas de actuación del compuesto se observa una reducción del crecimiento equiparable en ambas líneas y superior al detectado a las 48 horas, repitiéndose las concentraciones a las que se ve el primer efecto máximo de la inhibición del crecimiento para cada línea celular.

Dado que la capacidad proliferativa de las células se vio modestamente limitada después de 24 horas de tratamiento con alisertib, a este tiempo no se alcanzaron valores de IC₅₀ para ninguna línea celular. En cambio, el hecho de que varias líneas experimenten un pico de inhibición del crecimiento más o menos pronunciado a partir de las 48 horas hace que, en ocasiones, exista más de un valor de IC₅₀, los cuales se recogen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 | Valores de IC₅₀ de alisertib (μM) para cada tiempo en cada línea celular.

	H929		MM.1S		U266		RPMI 8226			OPM-2
48 h	0,06	0,13	0,05	0,24	—		0,16	0,46	0,77	—
72 h	0,04		0,03	0,38	0,05	0,23	0,12			0,04

Con la intención de descubrir si la inhibición del crecimiento percibida se debía a un efecto citostático o citotóxico de alisertib, se evaluó la muerte inducida en las mismas condiciones que los ensayos de reducción del MTT.

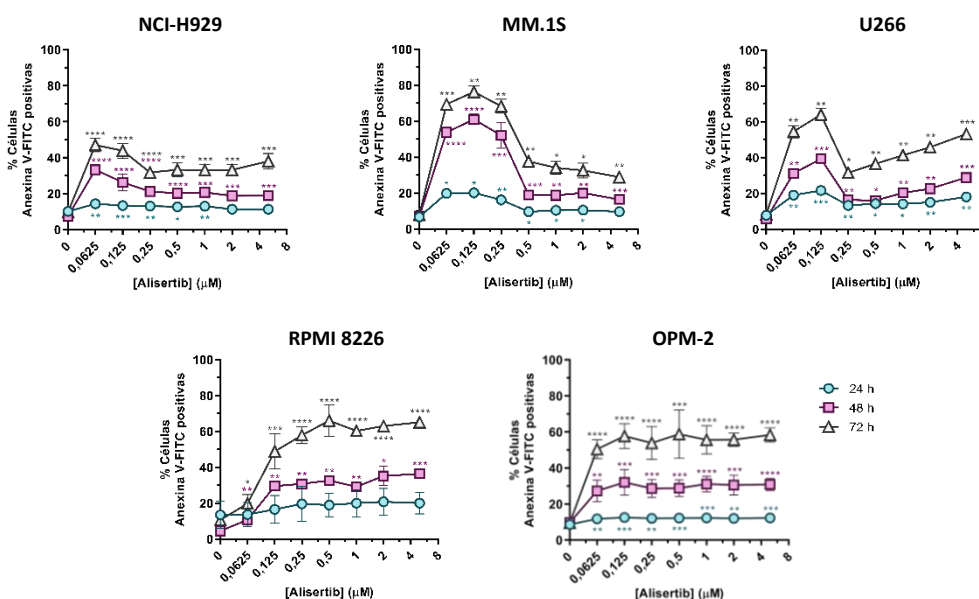


Figura 5.13 | Sensibilidad de diferentes líneas celulares de mieloma múltiple a alisertib. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μl en placas de 24 o 48 pocillos y estas se trataron con dosis crecientes de alisertib (0-5 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte inducida en cada línea celular mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo. Los resultados son la media ± SD de n=2-5 experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test despareado de dos colas, comparando cada concentración respecto al control para cada tiempo. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

Los resultados de citometría revelaron que alisertib indujo apoptosis en todas las líneas en mayor o menor medida en función de la dosis, del tiempo de exposición y de la línea celular. La Figura 5.13 muestra que, tras 24 horas de incubación, la toxicidad de alisertib apenas alcanza el 20 % en las cinco líneas celulares; sin embargo, a tiempos mayores se distinguen varios patrones

de respuesta en función de la línea celular. Las células NCI-H929 experimentan un máximo de citotoxicidad a 62,5 nM tras 48 horas (30-40 %) y a dosis iguales o superiores a 250 nM la muerte inducida es del 20 %, aproximadamente, mientras que a las 72 horas el pico de toxicidad alcanza el 50 % y a concentraciones más elevadas la mortalidad disminuye hasta el 30-40 %. En el caso de las MM.1S, 125 nM es la dosis más perjudicial tanto a las 48 (60 % de muerte) como a las 72 horas (toxicidad cercana al 80 %), y a partir de 500 nM, el efecto citotóxico de alisertib se reduce hasta el 20 % y el 30-40 % a las 48 y 72 horas, respectivamente. La mayor mortalidad en las U266 se detecta con la dosis de 125 nM a ambos tiempos (del 40 % a las 48 horas y del 60-70 % a las 72 horas) y, aunque con 250 nM se registra un mínimo de toxicidad, a partir de esta dosis la letalidad incrementa progresiva y lentamente a ambos tiempos, sin alcanzar las cotas anteriores (en torno al 30 % tras 48 horas y al 50 % tras 72 horas con las dosis más altas). Finalmente, en las RPMI 8226 y OPM-2 se produce un “efecto *plateau*” a ambos tiempos. En el caso de las OPM-2, la muerte inducida se mantiene alrededor del 30 % y del 50 % con concentraciones superiores a 62,5 nM después de 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente, y en las RPMI 8226 estos niveles de muerte se alcanzan a partir de las dosis de 125 nM tras 48 horas y de 250 nM tras 72 horas de actuación de alisertib.

Viendo el conjunto de los resultados, se puede decir que existe cierta correlación entre ambos ensayos según la línea celular. Por un lado, la reducción del crecimiento, sobre todo tras 48 y 72 horas de tratamiento, es superior a la apoptosis registrada en las células MM.1S, RPMI 8226, OPM-2 y, especialmente, NCI-H929. Sin embargo, en las células U266 las gráficas de los ensayos de reducción de MTT y de citometría correlacionan muy bien. Esto implica que la inhibición del crecimiento en esta línea celular se debe a la acción citotóxica de alisertib, mientras que en el resto de líneas el compuesto ejerce un efecto citotóxico y citostático.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por *Görgün et al.* [395], pues ellos también otorgan a alisertib potencial citostático y citotóxico en el mieloma múltiple tanto *in vitro* como *in vivo*. Observaron que el compuesto inhibía la capacidad proliferativa de líneas celulares y células tumorales primarias de mieloma y que la apoptosis desencadenada en ambas se incrementaba al prolongar el tratamiento. Además, dosis bajas de este compuesto inhibían el crecimiento y la proliferación de las células de mieloma más eficazmente en presencia de células del estroma de la médula ósea que en su ausencia, mientras que concentraciones elevadas también afectaban a las células mononucleares periféricas de donantes sanos. Asimismo, un modelo murino de xenoinjerto informó de un incremento de la supervivencia, una reducción de la carga tumoral y la inducción de apoptosis en los animales tratados con alisertib respecto al grupo control [395]. Al igual que este estudio, otros han hallado actividad anti-proliferativa y citotóxica de alisertib en otros tipos de tumores [500–503, 525, 527].

Paralelamente al estudio del potencial antitumoral de alisertib, se determinó el de barasertib llevando a cabo los mismos experimentos.

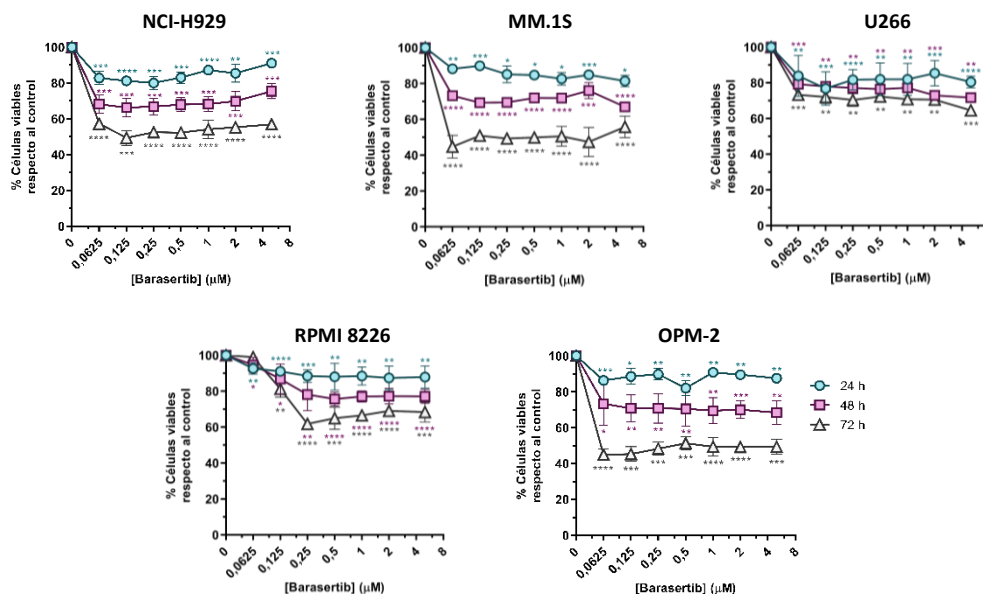


Figura 5.14 | Inhibición del crecimiento de líneas celulares de mieloma múltiple tras su exposición a barasertib. Se sembraron, al menos por cuadruplicado, entre $1,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/ml en 100 μ l en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron con concentraciones crecientes de barasertib (0-5 μ M) durante 24, 48 y 72 horas. Finalizados los tratamientos, se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de reducción del MTT según lo descrito en la sección 3.2.1 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-6$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* desapareado de dos colas, comparando cada concentración respecto al control para cada tiempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

En este caso, la actividad antitumoral de barasertib también aumenta con el transcurso del tiempo en todas las líneas estudiadas, pero la respuesta de las células es más homogénea comparada con la observada para alisertib. Según la Figura 5.14, todas las células sufren una reducción de la proliferación más o menos pronunciada con la primera dosis a todos los tiempos testados y, por lo general, esta disminución se ralentiza o se produce un estancamiento del crecimiento al aumentar la dosis. Las células RPMI 8226 son las únicas que muestran una inhibición progresiva del crecimiento hasta que se alcanza la inhibición máxima a las dosis de 500 nM y 250 nM tras 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente; a partir de estas concentraciones, su nivel de crecimiento se mantiene. Por otro lado, las células NCI-H929 parecen recobrar cierta capacidad proliferativa con la máxima concentración de barasertib a las 24 y 48 horas.

Exposiciones de 24 y 48 horas a barasertib reducen la capacidad proliferativa de todas las células, como máximo, hasta el 80 % y 60-70 % respecto a las no tratadas, respectivamente, pero si los tratamientos se alargan hasta las 72 horas, se observa mayor variabilidad entre las líneas. Las células NCI-H929, MM.1S y OPM-2 reducen su crecimiento a la mitad, aproximadamente,

mientras que las células RPMI 8226 y U266 mantienen alrededor del 60-70 % de su capacidad proliferativa inicial. Esto hace que exista más de un valor de IC₅₀ para el primer conjunto de células a 72 horas, que se muestran en la Tabla 5.2, mientras que tras 24 y 48 horas de tratamiento no se alcanzaron valores de IC₅₀ en ninguna línea celular.

Tabla 5.2 | Valores de IC₅₀ de barasertib (μM) para cada tiempo en cada línea celular.

	H929		MM.1S						U266	RPMI 8226	OPM-2		
72 h	0,12	0,15	0,06	0,12	0,19	0,59	1,17	3,24	—	—	0,06	0,39	0,84

Al igual que se hizo con alisertib, se determinó la muerte provocada por barasertib en las mismas condiciones que se llevaron a cabo los ensayos de reducción del MTT para aclarar si la inhibición de la capacidad proliferativa era consecuencia de un efecto citostático o citotóxico del compuesto.

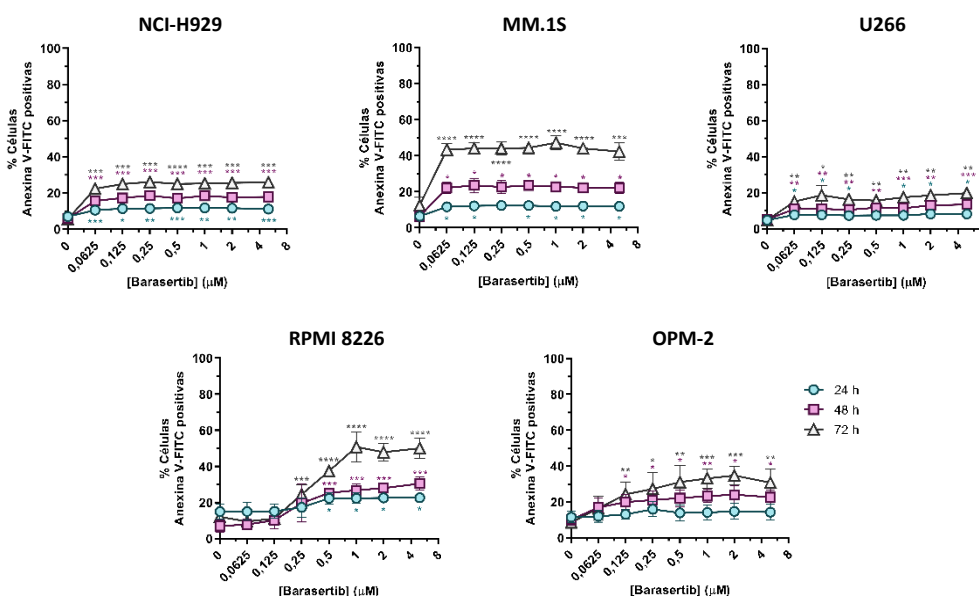


Figura 5.15 | Sensibilidad de diferentes líneas celulares de mieloma múltiple a barasertib. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μl en placas de 24 o 48 pocillos y estas se expusieron a dosis crecientes de barasertib (0-5 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Tras los tratamientos, se determinó la muerte desencadenada en cada línea celular mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-8 experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* desapareado de dos colas, comparando cada concentración respecto al control para cada tiempo. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

La Figura 5.15 revela que la sensibilidad de las células a barasertib aumenta con el paso del tiempo. En concreto, el inhibidor resultaba poco tóxico para todas las líneas celulares tras 24 y 48 horas de exposición, mostrándose ligeramente más citotóxico a las 48 horas. Sin embargo, la respuesta observada a las 72 horas varía en función de la línea celular. Si bien la muerte inducida

por barasertib en las células NCI-H929 y U266 fue similar a la detectada a tiempos más cortos, la toxicidad del compuesto a dosis altas en las células OPM-2 fue ligeramente superior que la registrada a 24 y 48 horas. No obstante, las células más sensibles a exposiciones prolongadas fueron las RPMI 8226 y MM.1S, especialmente estas últimas, ya que desde la primera dosis testada (62,5 nM) se alcanza el máximo de muerte (40-50 %), mientras que en las RPMI 8226 el mayor nivel de toxicidad se consigue a dosis en el rango micromolar (40-50 % a partir de 1 μ M).

Al igual que sucedía con alisertib, la correlación entre ambos ensayos depende de la línea celular analizada. En este caso son las células MM.1S, U266, OPM-2 y, particularmente, NCI-H929 las que registran un nivel de apoptosis inferior a la inhibición de la capacidad proliferativa, sobre todo tras tratamientos prolongados, mientras que en las RPMI 8226 esto sucede solo a dosis menores de 500 nM a las 72 horas. Por lo tanto, en todas estas situaciones, predomina el efecto citostático de barasertib, mientras que la proliferación en las RPMI 8226 tras 24 y 48 horas de actuación y a concentraciones iguales o superiores a 500 nM después de 72 horas se inhibe debido a la actividad citotóxica del compuesto.

Estos resultados avalan la única referencia que existe hasta la fecha acerca del efecto antitumoral de barasertib en el mieloma múltiple. En dicho estudio encontraron que tras 24 horas de tratamiento con barasertib, este resultaba tóxico para tres líneas celulares de mieloma, incluidas las células U266, y reducía la viabilidad de un panel de cinco líneas, entre las que se encontraban las células RPMI 8226 y U266, cuando actuaba durante 72 horas en solitario. Además, exposiciones a barasertib sostenidas en el tiempo afectaron a la viabilidad tanto de células CD138⁺ como CD138⁻ provenientes de dos pacientes distintos. Sin embargo, toda esta actividad antitumoral resultó ser bastante limitada. Finalmente, también demostraron que era bien tolerado en un modelo de xenoinjerto de ratón, en el que el crecimiento tumoral se atenuaba notablemente [654]. En el caso de las leucemias y los tumores sólidos, donde los estudios con barasertib son más abundantes, su actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* es más potente, y su combinación con otros quimioterápicos provoca sinergia o un efecto aditivo [205, 206, 396, 656], pero los ensayos clínicos apuntan a una eficacia más bien modesta [398–400]. No obstante, se ha visto que su formulación nanoparticulada mejora su distribución a la localización tumoral y permite una liberación sostenida del fármaco en el tiempo en modelos preclínicos de tumores sólidos y hematológicos, lo que se traduce en menores toxicidades y una mayor eficacia utilizando la mitad de dosis en comparación con barasertib no encapsulado [657]. Estos buenos resultados han permitido que esta formulación también sea evaluada en ensayos clínicos [658, 659].

Globalmente, los resultados obtenidos reflejan que tanto alisertib como barasertib despliegan una actividad anti-mieloma escasa a tiempos cortos, pero esta se intensifica con el paso del tiempo. Además, ambos compuestos poseen potencial citotóxico variable frente al mieloma múltiple, aunque también tienen un efecto citostático asociado que podría deberse a la parada del

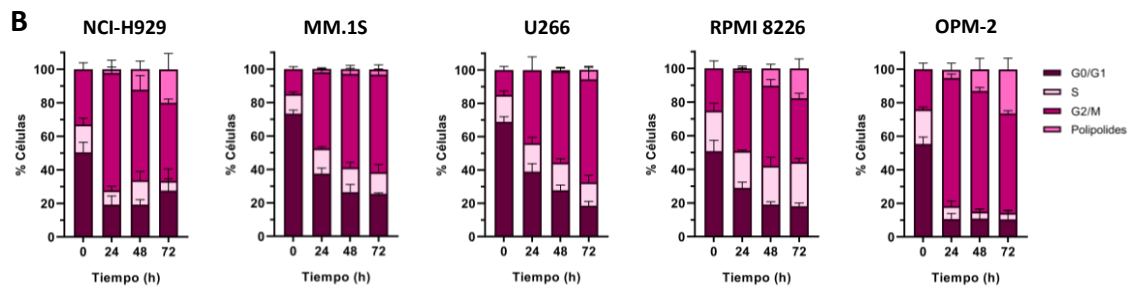
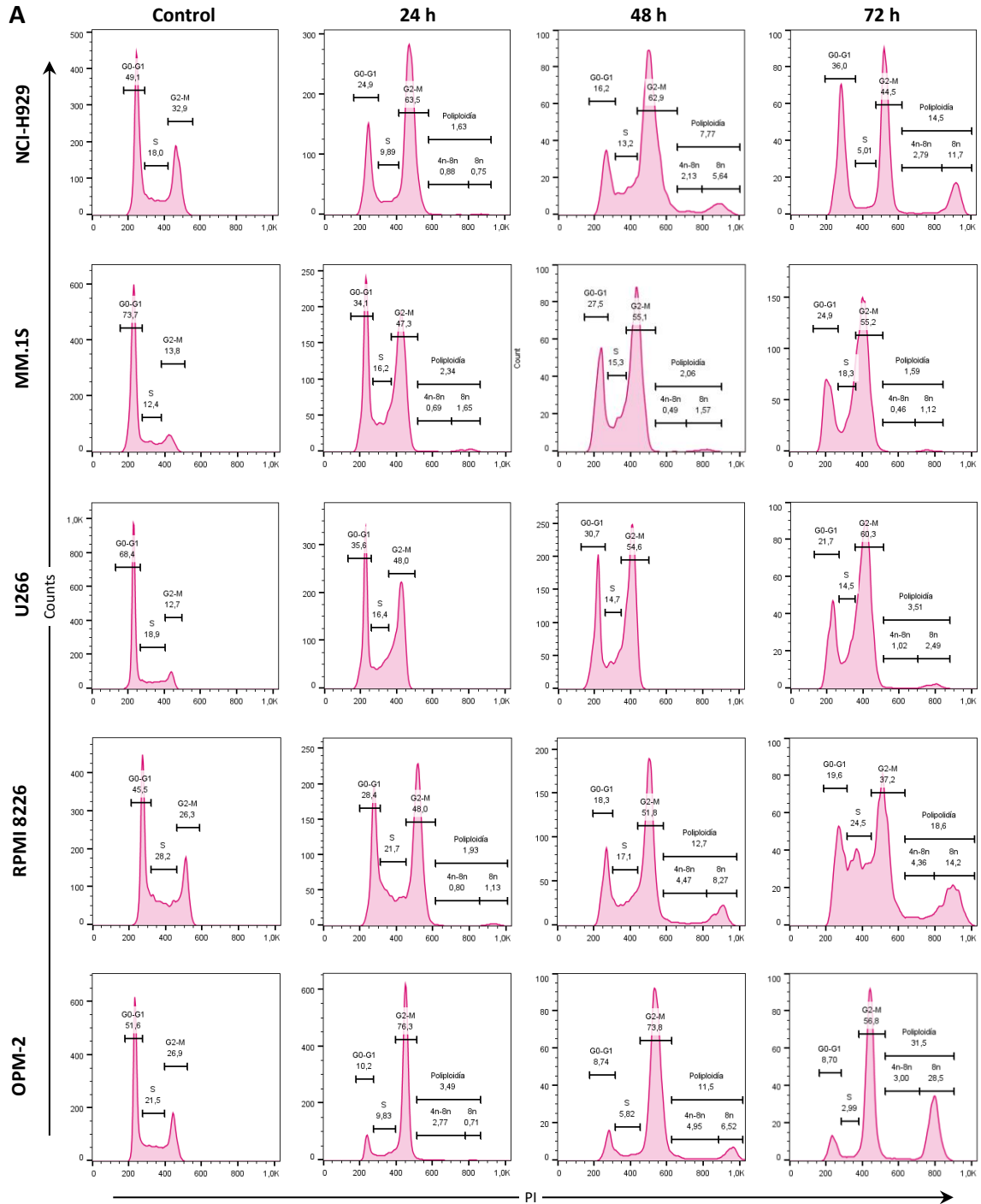
ciclo celular y/o la entrada en un estado de senescencia, como ya se ha descrito en anteriores ocasiones [395, 654]. No obstante, alisertib ejerce un efecto antitumoral más potente a dosis bajas en las NCI-H929, MM.1S y U266 y a cualquier dosis en las RPMI 8226 y OPM-2 en comparación con cualquier dosis de barasertib. Por otro lado, es importante resaltar que algunas líneas celulares, especialmente las células NCI-H929 y MM.1S, y en menor medida las U266, responden de forma distinta a dosis de alisertib en el rango nano- y micromolar. Esto parece ser indicativo de que este compuesto desplegaría varios mecanismos de acción en estas células. En este sentido, aunque se ha descrito que alisertib es un inhibidor con una alta especificidad por Aurora A [192], existen varios estudios *in vitro* que han propuesto que este compuesto es capaz de inhibir a Aurora A y B de forma diferencial en función de la dosis. Concretamente, *Qi et al.* observaron que Aurora A quedaba totalmente inhibida con dosis de 100 nM de alisertib, mientras que Aurora B era neutralizada por completo con dosis cinco veces más altas del compuesto en células de PTCL [660]; por su parte, *Asteriti et al.* detectaron inhibición específica de Aurora A en un rango de 20-50 nM, pero a concentraciones superiores a 50 nM la actividad de Aurora B quedaría comprometida en células de osteosarcoma [661]; sin embargo, para *Du et al.* el rango de inhibición selectiva de Aurora A en células HeLa era de 80-250 nM, mientras que a concentraciones superiores predominaban los efectos derivados del bloqueo de Aurora B [662]; análogamente, *Marxer et al.*, determinaron que alisertib a partir de 250 nM podría inhibir también a Aurora B en dicha línea celular [663]. Probablemente, las diferencias en los rangos de inhibición de la actividad de una u otra proteína en estos estudios radiquen en el tipo celular utilizado como modelo de estudio.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es muy probable que, en nuestro caso, alisertib inhiba específicamente a Aurora A a dosis inferiores a 250 nM en las células NCI-H929 y U266 y a dosis inferiores a 500 nM en las MM.1S, y a Aurora A y B a concentraciones superiores a las mencionadas para cada línea celular, de manera que la disminución de la toxicidad de alisertib a dosis altas podría deberse al efecto predominante de la inhibición de Aurora B sobre Aurora A.

5.2.2. Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre el ciclo celular y la morfología nuclear en células de mieloma múltiple

La importancia de Aurora A y B en la regulación del ciclo celular es, de sobra, conocida. Mientras Aurora A interviene desde el final de la fase G2 hasta la prometafase controlando eventos tempranos como la entrada en mitosis, la maduración y separación de los centrosomas y la formación del huso mitótico, Aurora B actúa desde la metafase hasta la finalización de la mitosis y, como componente del complejo CPC, se encarga de supervisar eventos como la unión de los cromosomas a los microtúbulos, la señalización de SAC y la citoquinesis [664]. Es bien sabido que la inhibición de Aurora A y B conlleva graves defectos en la mitosis que favorecen la

detención del ciclo celular en la fase G2/M, desde la formación de un huso mitótico aberrante hasta el alineamiento cromosómico defectuoso, e incluso el bloqueo de la citoquinesis, lo que implica una segregación cromosómica inadecuada o inexistente que puede desembocar en aneuploidía, poliploidía, la entrada en senescencia o la muerte celular [197, 520, 665, 666]. Teniendo esto en cuenta se quiso determinar si exposiciones cortas, medias y prolongadas a dosis bajas de alisertib y elevadas de barasertib alteraban el ciclo celular del panel de líneas celulares de mieloma, ya que de la sección anterior se desprende que no todo el potencial anti-proliferativo de estos inhibidores se debe exclusivamente a su acción citotóxica.



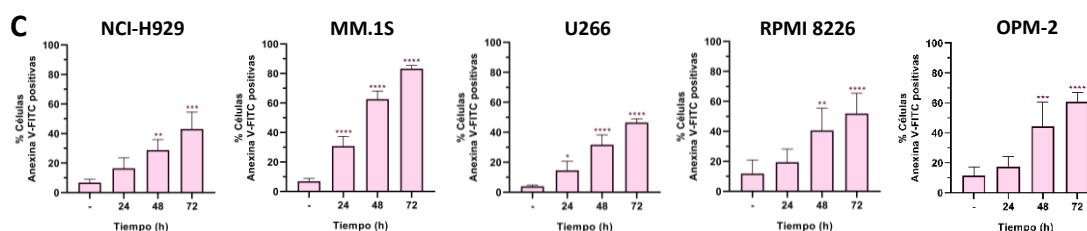


Figura 5.16 | Ciclo celular de las líneas celulares de mieloma múltiple tratadas con alisertib durante 24, 48 y 72 horas. (A) Histogramas representativos de al menos tres experimentos independientes. (B) Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular a cada tiempo evaluado. (C) Muerte celular desencadenada por alisertib a los tiempos indicados. Se sembraron entre $5 \cdot 10^5$ y 10^6 células de cada línea celular en 1 ml en placas de 12 pocillos y estas se incubaron con alisertib a una concentración final de 100 nM durante 24, 48 y 72 horas. Transcurridos estos tiempos, se determinó la muerte inducida mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo, y las células se marcaron con yoduro de propidio siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.5 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-5$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada tiempo respecto al control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

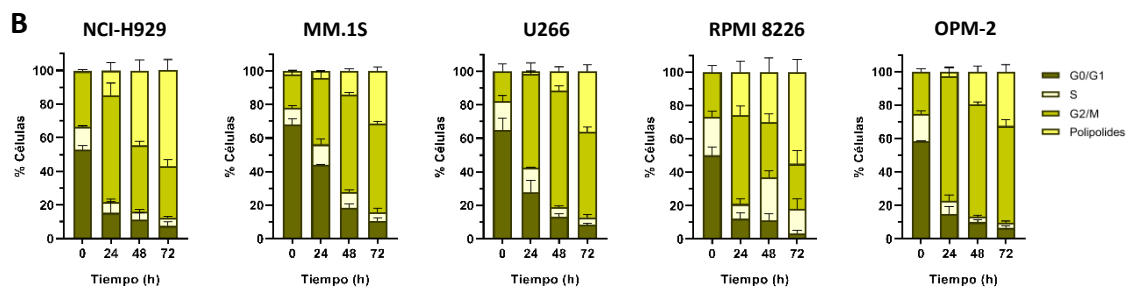
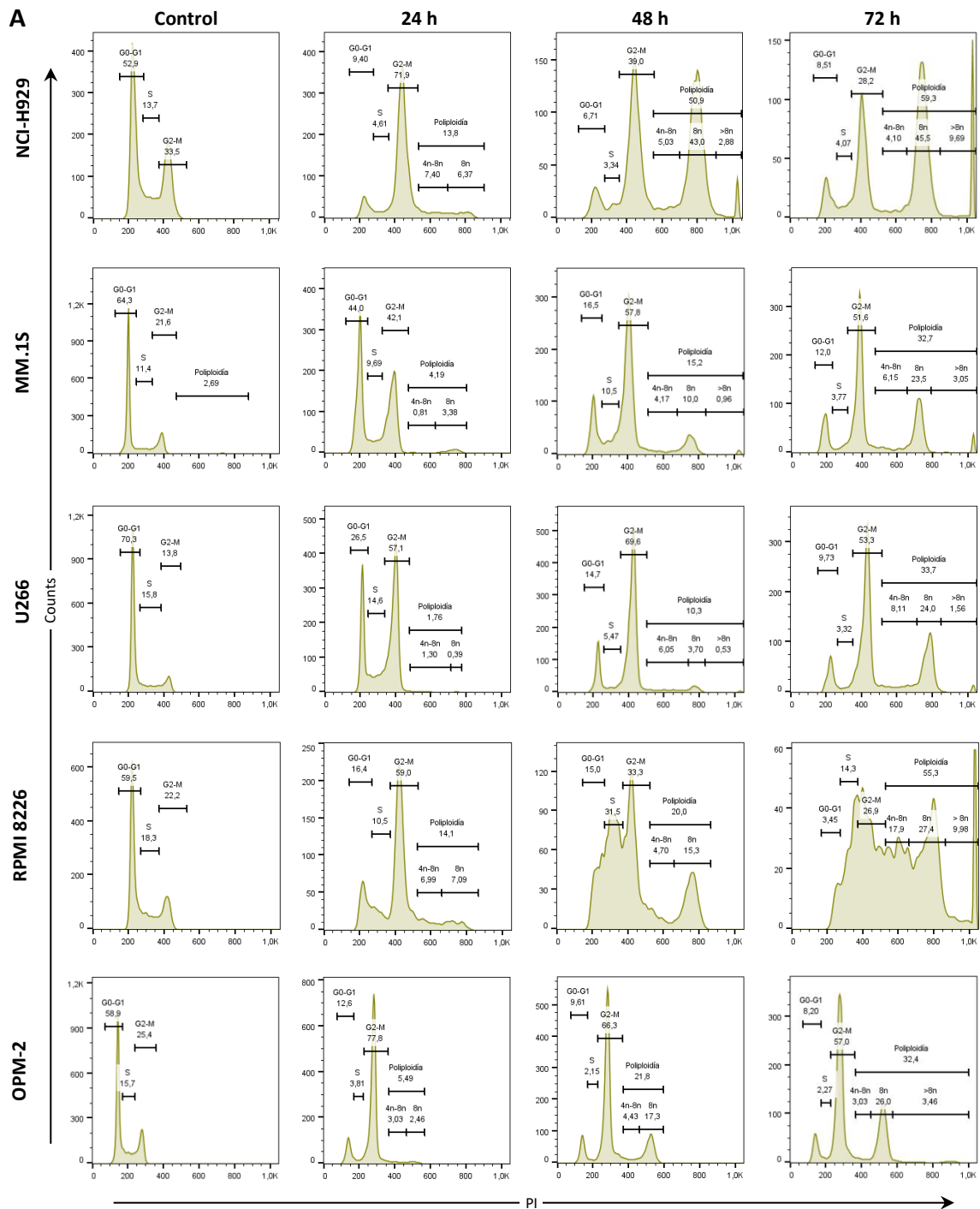
Si bien las gráficas de la Figura 5.16C son consistentes con el potencial citotóxico asignado a alisertib en los ensayos de dosis-respuesta del apartado anterior (Fig. 5.13), las Figuras 5.16A y B descubren que este antimitótico también altera notablemente el ciclo celular. Inicialmente, todas las células presentan el perfil habitual de crecimiento exponencial, donde la mayoría de las células se localizan en la fase G0/G1 (45-75 %) y el resto se distribuyen entre las fases S (10-30 %) y G2/M (10-35 %). Sin embargo, alisertib distorsiona este perfil provocando una eminente parada del ciclo celular en la fase G2/M en todas las líneas celulares, la cual es detectable incluso a las 24 horas de inicio de los tratamientos, cuando la muerte celular todavía es reducida, y se mantiene hasta las 72 horas. Además, también fomenta la aparición de células poliploides que, por lo general, incrementan su presencia con el paso del tiempo.

Atendiendo a la evolución de esta detención en cada línea, se pueden diferenciar varios patrones. Por un lado, las células NCI-H929, OPM-2 y RPMI 8226 alcanzan el máximo de población en G2/M tan solo 24 horas después de la adición de alisertib. En las dos primeras el porcentaje de células en esta fase alcanza el 70-80 % de la población celular, mientras que en las células RPMI 8226 es del 50 %. Esta ganancia va en detrimento, principalmente, de la población localizada en G0/G1, que se queda en torno a un 10-20 % en las células NCI-H929 y OPM-2, y a un 20-30 % en las RPMI 8226. Sin embargo, en las células MM.1S y U266 la fase G2/M se incrementa progresivamente a costa de la fase G0/G1, hasta alcanzar el máximo y el mínimo de población en cada fase a las 72 horas ($\approx 60-70$ % en fase G2/M y 20-25 % en fase G0/G1).

Además de la parada mitótica, alisertib también fomenta la aparición de células poliploides con una dotación cromosómica superior a $4n$, la cual se enriquece con el paso del tiempo. A tiempos prolongados, la poliploidía es muy significativa en las células OPM-2, NCI-H929 y

RPMI 8226, y poco relevante en las MM.1S y U266. En general, a medida que esta población incrementa, el porcentaje de células ancladas en G2/M disminuye, salvo en el caso de las células U266, donde tras 72 horas de tratamiento comienzan a generarse células poliploides, pero a la vez, una parte de la población continúa acumulándose en la fase G2/M y desapareciendo de G0/G1. Por tanto, la reducción de la población en fase G2/M invita a pensar que una parte de las células consiguen salir del bloqueo mitótico y posiblemente sufren endoreduplicación. Por otro lado, las diferencias observadas entre las líneas en los perfiles del ciclo probablemente se deban al tiempo de duplicación de cada una, siendo las células NCI-H929, OPM-2 y RPMI 8226 las que más rápido se duplican, seguidas de las MM.1S y U266. De hecho, la menor velocidad de las células MM.1S y U266 a la hora de duplicarse se refleja en los perfiles del ciclo de las células control, donde se aprecia que ambas tienen el menor porcentaje de células en G2/M, lo que explicaría que la mayor parada en G2/M la registren a las 72 horas y que el nivel de poliploidía alcanzado sea menor que en las demás líneas.

Por último, cabe destacar un par de particularidades observadas en algunos histogramas. La primera en las MM1.S 48 h, donde se aprecia un “hombro” en la fase S, que podría representar células hipotetraploides, es decir, células que han muerto en la fase G2/M y han perdido contenido de DNA sin llegar a considerarse (hipo)diploides. Asimismo, esta subpoblación podría estar englobada en el pico en fase S que se observa en las células RPMI 8226 72 h.



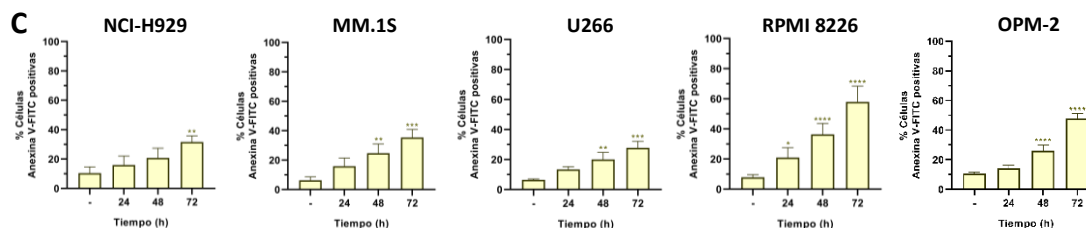


Figura 5.17 | Ciclo celular de las líneas celulares de mieloma múltiple expuestas a barasertib durante 24, 48 y 72 horas. (A) Histogramas representativos de al menos tres experimentos independientes. (B) Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular a cada tiempo evaluado. (C) Muerte celular inducida por barasertib a los tiempos indicados. Se sembraron entre $5 \cdot 10^5$ y 10^6 células de cada línea celular en 1 ml en placas de 12 pocillos y estas se incubaron con barasertib a una concentración final de 5 μ M durante 24, 48 y 72 horas. Finalizados los tratamientos, se determinó la muerte desencadenada mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo, y las células se marcaron con yoduro de propidio según se indica en el apartado 3.5 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-6$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada tiempo respecto al control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

En el caso de barasertib, los datos de muerte obtenidos para las líneas NCI-H929, MM.1S y U266 (Fig. 5.17C) son coherentes con el potencial citotóxico del compuesto recogido en los ensayos de dosis-respuesta de la sección anterior a la dosis testada (Fig. 5.15). Sin embargo, en esta ocasión, las células RPMI 8226 y OPM-2 (Fig. 5.17C) se muestran ligeramente más sensibles que en dichos ensayos tras 72 horas de tratamiento (Fig. 5.15), un efecto que puede ser debido a que ambos ensayos se llevaron a cabo en momentos distintos y con lotes de células diferentes, por lo que estos factores, así como el mantenimiento rutinario de los cultivos, podrían haber alterado la sensibilidad de estas células a barasertib. Por otro lado, análogamente a lo observado con alisertib, las Figuras 5.17A y B demuestran que barasertib perturba el ciclo celular de todas las líneas celulares evaluadas. Como era de esperar, la mayoría de las células no tratadas se encontraban en la fase G0/G1 ($\approx 50-70$ %), mientras que las células localizadas en las fases S y G2/M fueron menos abundantes (10-20 % en fase S y 10-35 % en fase G2/M). Además, en el caso de las células MM.1S, un pequeño porcentaje de ellas eran células poliploides. Sin embargo, este perfil cambia radicalmente al entrar en escena barasertib, pues al igual que alisertib, este compuesto conduce a una prominente parada del ciclo celular en la fase G2/M en todas las líneas celulares desde las primeras 24 horas de actuación, a la vez que fomenta la generación de células poliploides, cuya abundancia aumenta al extender los tratamientos.

Analizando más en profundidad la evolución de las distintas poblaciones celulares en presencia de barasertib, a nivel general se advierte que la acumulación de células en la fase G2/M y el surgimiento de células poliploides va en detrimento de las poblaciones celulares localizadas en las fases S y, mayoritariamente, G0/G1. No obstante, el patrón de respuesta varía en función de la línea celular. Por ejemplo, las células NCI-H929 y OPM-2 responden de forma equivalente,

pues a las 24 horas de exposición al fármaco ambas alcanzan el máximo de población en G2/M (aproximadamente el 65 % en las NCI-H929 y el 75 % en las OPM-2). No obstante, a partir de entonces, el porcentaje de células en esta fase del ciclo va decayendo (más rápidamente en las células NCI-H929) y, en su lugar aumenta progresivamente la población de células poliploides, hasta representar más de la mitad de la población celular a las 72 horas en las células NCI-H929 y en torno al 30 % en las OPM-2. Las células MM.1S y U266 experimentaron el mismo efecto en la progresión del ciclo celular, pero a un ritmo más lento, pues el porcentaje máximo de células en G2/M lo alcanzaron a las 48 horas de la adición de barasertib, y la población de células poliploides representaba en ambos casos alrededor del 30 % a las 72 horas. Por último, la respuesta más llamativa se observó en las células RPMI 8226, pues a las 24 horas alrededor de la mitad de las células se encontraban en fase G2/M, pero, aparentemente, parte de esta población retornaba a la fase S tras 48 horas de tratamiento. Este supuesto aumento de células en fase S también se observa en los histogramas (Fig. 5.17A RPMI 8226 48 h) y podría deberse a que un determinado porcentaje de células habrían muerto cuando se encontraban detenidas en G2/M, de manera que presentan un contenido de DNA intermedio entre $2n$ y $4n$ sin encontrarse en fase S activa. Sin embargo, después de 72 horas de tratamiento, la población en fase S disminuía, la de G2/M se mantenía y las células poliploides incrementaban su presencia hasta suponer casi el 60 % de la población celular. De hecho, estas células ya se observaban a las 24 horas, pero entonces solo representaban cerca del 20 % de la población total.

Dentro de la población celular poliploide, cabe destacar que su dotación cromosómica varía en función de la línea celular y la duración del tratamiento. Así lo corroboran los histogramas de la Figura 5.17A, en los que se observa variabilidad en el contenido de DNA de dicha población en las cinco líneas celulares desde las 24 horas de tratamiento. La actuación de barasertib durante 48 horas hace que genere un pequeño porcentaje de células NCI-H929, MM.1S y U266 con una dotación cromosómica superior a $8n$, mientras que a las 72 horas de tratamiento este tipo de células se detectan en todas las líneas celulares, aunque siempre en pequeñas proporciones.

Si se compara el efecto de alisertib y barasertib a las dosis testadas sobre la progresión del ciclo celular en células de mieloma múltiple, es evidente que ambos compuestos detienen el ciclo en la fase G2/M, aunque el destino de las células tras dicha parada no es el mismo. Esto queda reflejado en el hecho de que el inhibidor de Aurora A provocaría principalmente un arresto mitótico prolongado que retrasaría la salida de la mitosis, y solo algunas células lograrían alcanzar el estado poliploide ($>4n$) con el paso del tiempo, mientras que buena parte de las células morirían a tiempos largos. Sin embargo, el inhibidor de Aurora B conduciría a las células a una parada transitoria en dicha fase que podrían sortear mediante el deslizamiento mitótico, lo que les permitiría llevar a cabo uno o varios ciclos de endoreduplicación y enriquecer la población de células poliploides si se alarga el tratamiento. Por lo tanto, estos resultados apuntan a un papel

determinante del deslizamiento mitótico en el mecanismo de acción de barasertib y solo secundario en el caso de alisertib.

La detención del ciclo en la fase G2/M es un denominador común asociado al bloqueo de la familia Aurora, pues este efecto se ha visto, además de con alisertib, con otros inhibidores de Aurora A (AK-01), inhibidores de Aurora B (barasertib) y pan-inhibidores (danusertib y VX-680), así como al silenciar los genes de Aurora A y B en distintos tipos de tumores [395, 522, 667–673]. Asimismo, la inhibición y/o el silenciamiento de otras moléculas clave en la regulación de la mitosis también dirigen a diferentes células tumorales al arresto mitótico, y entre ellas se encuentran quinasas mitóticas como PLK1, CDK1 y Mps1, quinasas que participan en la respuesta a daño en el DNA como Wee1, proteínas motoras como CENP-E y el complejo APC/C [674–680].

Por otro lado, la inhibición de Aurora A se asocia generalmente con aneuploidía debido a los fallos mitóticos que provoca, incluidos defectos en la maduración y separación de los centrosomas, la formación del huso mitótico y la alineación de los cromosomas, mientras que la poliploidía es un evento que se relaciona comúnmente con el bloqueo de Aurora B, que también afecta a la alineación cromosómica, abroga el SAC y la citoquinesis y provoca endorreduplicación [197, 681]. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo apoyan lo descrito para la inhibición de Aurora B, nuestros resultados y los de otros autores indican que la inhibición y el silenciamiento de Aurora A también pueden conducir, en mayor o menor grado, a un estado de poliploidía [667, 681, 682]. *Nair et al.* propusieron que p53 desempeñaba un papel relevante en el destino final de diferentes líneas tumorales tras la inhibición de Aurora A con el compuesto MK8745, pues observaron que solamente las células que carecían de p53 o lo tenían mutado alcanzaban el estado poliploide, mientras que las que poseían la forma salvaje terminaban sufriendo apoptosis [683]. Sin embargo, en otros estudios la inducción de poliploidía o apoptosis como consecuencia de la inhibición de Aurora A es independiente del estado de p53 [667, 684]. En nuestro caso, las células NCI-H929 y MM.1S expresan la forma salvaje de p53, mientras que las tres líneas restantes contienen una forma mutada de p53 [685]. Teniendo en cuenta que hemos demostrado que alisertib induce apoptosis y poliploidía en todas las líneas celulares de mieloma testadas, nuestros resultados sugieren que la elección del destino celular tras el tratamiento con alisertib no depende de p53.

Con el fin de prevenir la inestabilidad genómica derivada de la parada del ciclo celular en la fase G2/M y los defectos mitóticos asociados a la inhibición de Aurora A y B, las células pueden activar un mecanismo oncosupresor conocido como catástrofe mitótica, que morfológicamente está definida por alteraciones nucleares únicas que incluyen la macro-, micro- y multinucleación [8]. Para poder determinar si este mecanismo se activa en las células de mieloma expuestas a

alisertib durante breves y largos periodos de tiempo, los núcleos se marcaron con la sonda nuclear Hoechst 33342 y las preparaciones se visualizaron en un microscopio directo de fluorescencia.

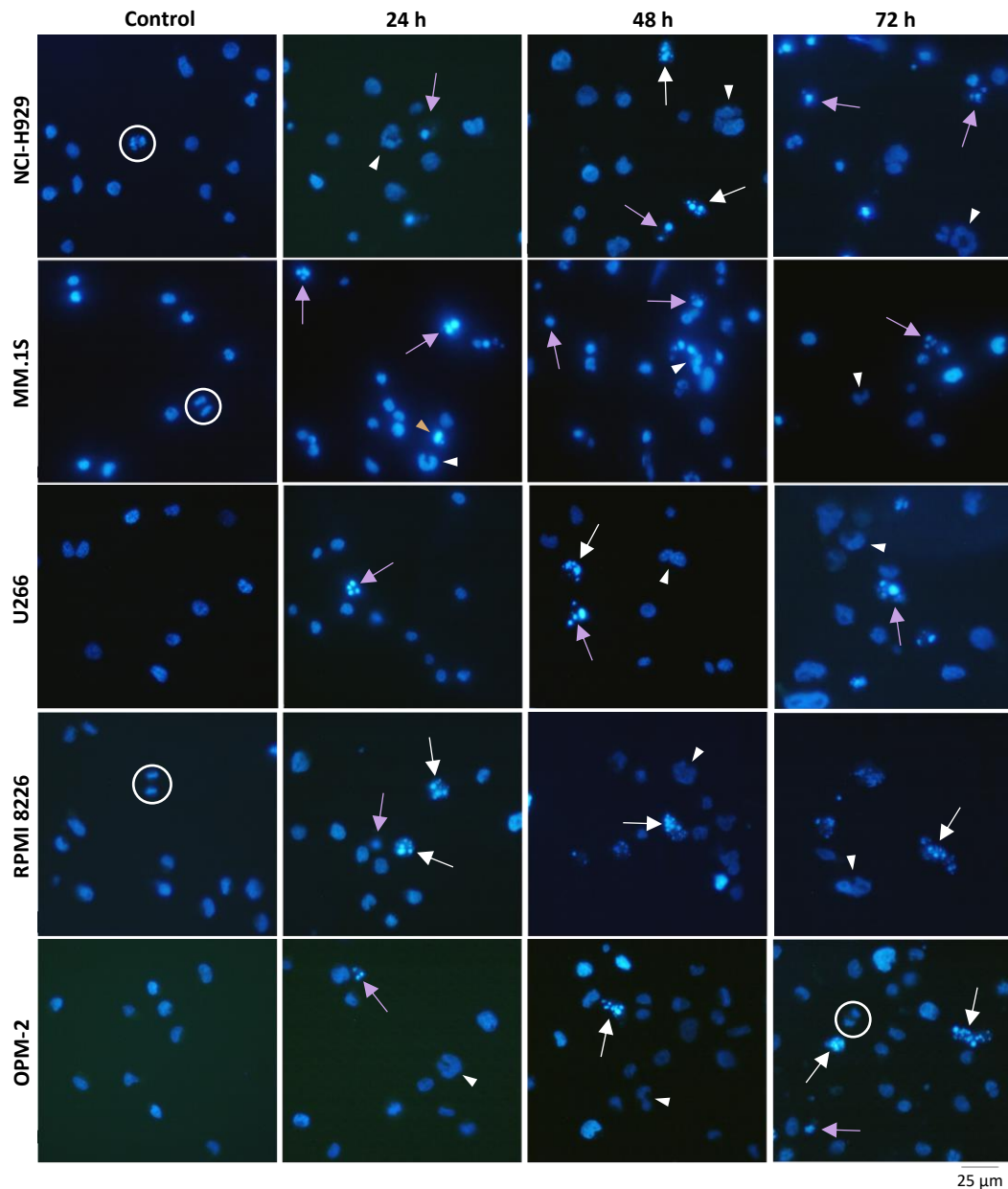


Figura 5.18 | Efecto de alisertib sobre la morfología nuclear de células de mieloma múltiple *wild-type*. Se sembraron entre 10^5 y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y estas fueron tratadas con alisertib a una dosis final de 100 nM durante 24, 48 y 72 horas. Concluidos los tratamientos, los núcleos se marcaron con la sonda nuclear Hoechst 33342 según se indica en la sección 3.7.1 de Materiales y métodos. Imágenes de microscopía directa de fluorescencia (x400) representativas de al menos dos experimentos independientes. Los círculos blancos muestran células en mitosis normales, las flechas blancas señalan células sufriendo mitosis aberrantes, los triángulos blancos indican células macro- y multinucleadas, las flechas violeta apuntan a células apoptóticas y el triángulo marrón señala una célula micronucleada.

Cuando las células no se tratan, estas exhiben la morfología nuclear habitual e incluso se han conseguido captar células en distintas etapas de la división celular, como la prometáfase, la

anafase y la telofase (Fig. 5.18 Control), señal inequívoca de que las células están proliferando; sin embargo, la adición de alisertib modifica llamativamente la morfología de los núcleos desde las 24 horas en todas las líneas celulares sin observarse diferencias significativas entre ellas (Fig. 5.18 24-72 h). Por un lado, es posible identificar células que están sufriendo mitosis aberrantes con fragmentación cromosómica debido a la inhibición de Aurora A (flechas blancas), aunque también se han podido fotografiar células que experimentan una división normal en presencia de alisertib (Fig. 5.18 OPM-2 72 h). Esto puede ser debido a que un porcentaje muy pequeño de células podría ser resistente a la acción de este fármaco y, en consecuencia, su ciclo celular no se vería alterado. También se observan células gigantes macro- y multinucleadas (triángulos blancos) y alguna célula con micronúcleos (triángulo marrón). Asimismo, las células apoptóticas también se detectan (flechas violeta) desde el inicio. Si bien todas estas particularidades morfológicas pueden detectarse desde las primeras 24 horas de tratamiento, la presencia de núcleos aberrantes y células apoptóticas va en aumento con el paso del tiempo.

Para completar este estudio se quiso saber qué cambios experimentaban las células MM.1S deficientes en Bax y Bak (DKO) a nivel nuclear al tratarlas con dosis bajas de alisertib, ya que, a pesar de no tener activa la ruta apoptótica mitocondrial, alisertib despliega un potencial citotóxico moderado en ellas (ver apartado 5.2.5).

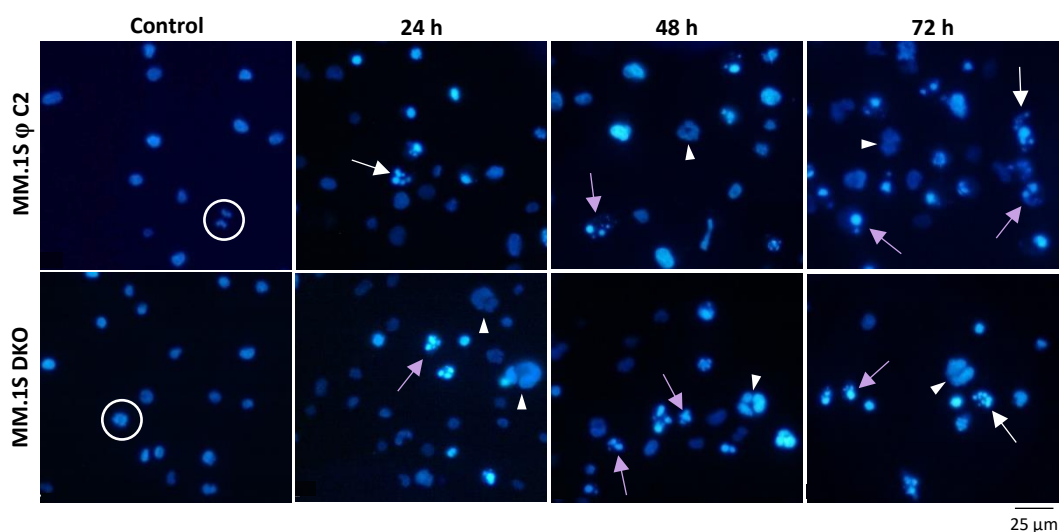


Figura 5.19 | Efecto de alisertib sobre la morfología nuclear de células MM.1S deficientes en Bax y Bak. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas 48 pocillos y estas se expusieron a alisertib a una dosis final de 100 nM durante 24, 48 y 72 horas. Tras los tratamientos, los núcleos se marcaron con la sonda nuclear Hoechst 33342 según lo descrito en el apartado 3.7.1 de Materiales y métodos. Imágenes de microscopía directa de fluorescencia (x400) representativas de dos experimentos independientes. Los círculos blancos muestran células en mitosis normales, las flechas blancas señalan células sufriendo mitosis aberrantes, los triángulos blancos indican células macro- y multinucleadas y las flechas violeta apuntan a células apoptóticas.

Al igual que sucedía en las células *wild-type*, la morfología nuclear de las células MM.1S modificadas sin tratar y la detección de células en prometafase y anafase o que acaban de concluir

la división celular indican que estas se encuentran en buen estado (Fig. 5.19 Control), mientras que la exposición a alisertib favorece las mitosis aberrantes (flechas blancas), la generación de células de gran tamaño macro- y multinucleadas (triángulos blancos) y la muerte celular (flechas violeta) en ambas líneas celulares tanto a tiempos cortos como prolongados a pesar de que las células MM.1S DKO no pueden ejecutar la vía apoptótica mitocondrial (Fig. 5.19 24-72 h). Además, las células con núcleos aberrantes y las células apoptóticas se hacen más abundantes con el paso del tiempo (Fig. 5.19 24-72 h).

La catástrofe mitótica está estrechamente relacionada con los puntos de control de G2/M y del SAC, de manera que, si células con daños en el DNA o defectos en las estructuras mitóticas los pasan por alto y consiguen entrar en mitosis o llevarla a cabo de forma aberrante, este mecanismo se activa para acabar con la inestabilidad genómica generada [142, 145]. Unas líneas más arriba se ha descrito que la inhibición de Aurora A con el antimitótico alisertib en células de mieloma múltiple promueve la catástrofe mitótica; no obstante, dada la gran cantidad de proteínas que controlan la entrada y la progresión mitótica y el daño generado en el DNA, que a menudo se encuentran desreguladas en el cáncer, las potenciales dianas para activar este mecanismo oncosupresor se multiplican. De hecho, se ha observado que la inhibición farmacológica o supresión génica de quinasas mitóticas (PLK1, Aurora A, Aurora B, Wee1 y Mps1), proteínas motoras (Eg5 y CENP-E) y quinasas de respuesta a daño en el DNA (ATR, CHK1 y Wee1) dan lugar a fenotipos compatibles con la activación de la catástrofe mitótica, incluyendo la micro- y multinucleación [542, 686–695].

Por lo tanto, en conjunto, los resultados sugieren que el tratamiento con dosis bajas de alisertib desemboca en la detención prolongada del ciclo celular en la fase G2/M permitiendo la entrada en mitosis, pero esta se lleva a cabo de forma aberrante, lo que hace que se active la catástrofe mitótica. Este mecanismo puede conducir a las células a la muerte en mitosis o generar células macro-, multi- y micronucleadas que escapan del arresto mitótico y que pueden sucumbir una vez hayan alcanzado la fase G1 de la siguiente interfase o alcanzar un estado de poliploidía o de senescencia. La catástrofe mitótica se activa tanto en células *wild-type* como en células que carecen de Bax y Bak, y estas últimas siguen siendo sensibles a la acción citotóxica de alisertib. Por ello, más adelante se analizará más en detalle el efecto de alisertib en estas células. Por otro lado, en el caso de barasertib, dosis altas del compuesto favorecerían el deslizamiento mitótico al producirse una parada transitoria en G2/M y aumentar la población de células poliploides con el paso del tiempo, aunque un porcentaje variable de células muere en función de la duración del tratamiento, ya sea durante la mitosis o al salir de ella. Para completar los resultados obtenidos con barasertib, sería conveniente evaluar también las alteraciones que se producen a nivel nuclear en presencia de este inhibidor, al igual que se ha realizado con alisertib. Asimismo, una buena

forma de conocer la dinámica celular y el momento en el que las células sucumben pasa por realizar ensayos de microscopía *time-lapse*.

Además, nuestros resultados ponen de manifiesto la heterogeneidad que existe dentro de una misma línea celular de mieloma en respuesta a la actuación prolongada de los fármacos antimitóticos, una observación que ha sido realizada previamente en células de cáncer colorrectal, de pulmón y de cuello uterino [157]. Para explicar este hecho, los autores de dicho estudio se valieron del “modelo de redes competitivas”, proponiendo que existen rangos amplios de degradación de ciclina B1 y de activación de las señales de muerte dentro de un mismo cultivo [157].

5.2.3. Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en células de mieloma múltiple

Alisertib y barasertib se han descrito como dos inhibidores de la familia Aurora quinasa que muestran una alta especificidad por Aurora A y B, respectivamente [192, 196], aunque, como se ha comentado en la sección 5.2.1., nuestros resultados sugieren que alisertib podría inhibir a ambas proteínas de forma diferencial en función de la dosis en algunas líneas celulares. Además, ambos compuestos inducen arresto mitótico, aunque cada uno modifica el perfil del ciclo celular de forma característica (apartado 5.2.2). Por lo tanto, considerando los distintos roles de Aurora A y B durante la mitosis, el posible doble mecanismo de acción de alisertib y los perfiles del ciclo celular asociados a cada inhibidor, se quiso estudiar el efecto de ambos inhibidores sobre otras moléculas cruciales del aparato mitótico, particularmente ciclina B1 y los componentes del SAC BUBR1 y MAD2.

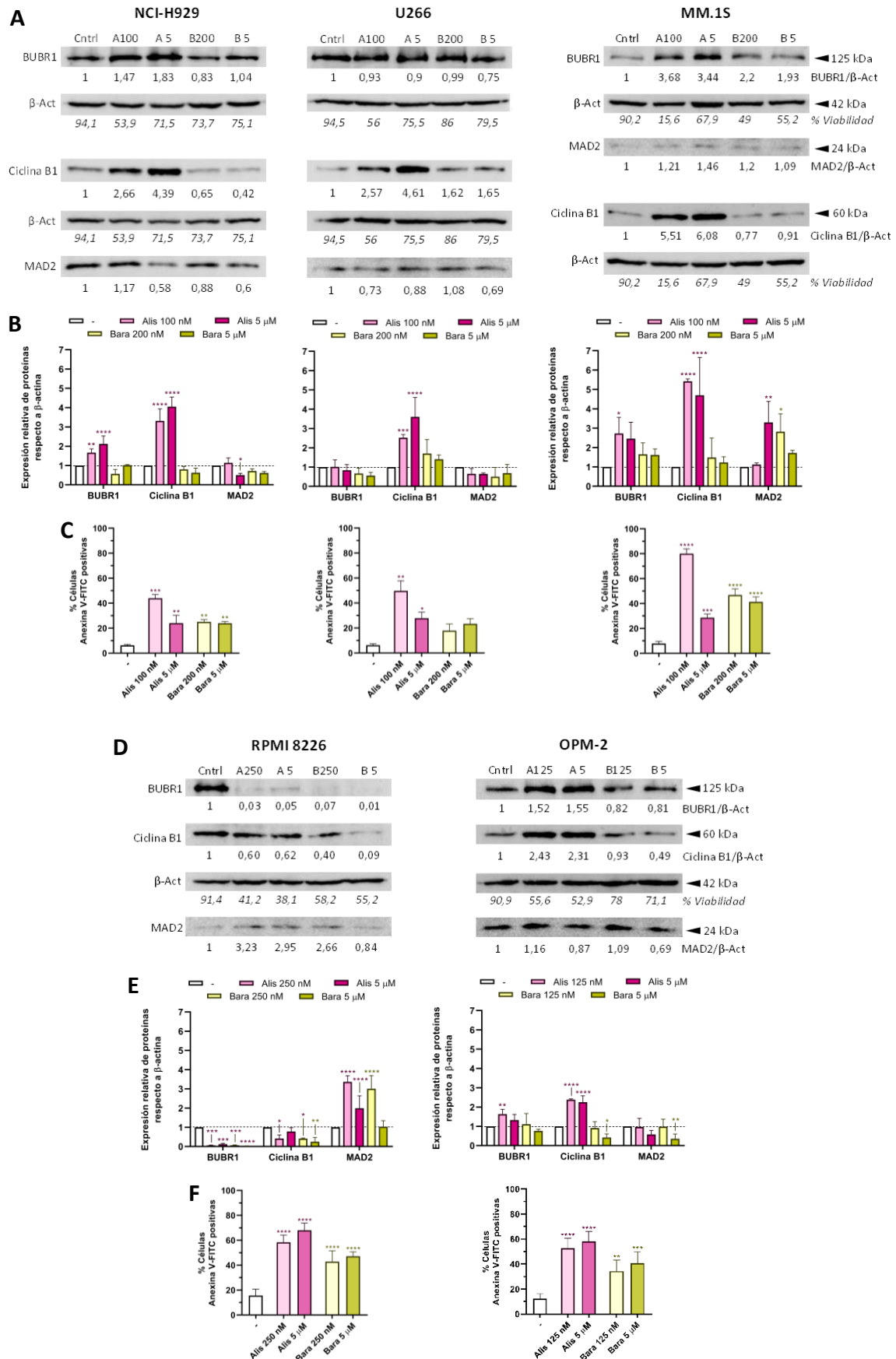


Figura 5.20 | Expresión de proteínas reguladoras de la mitosis en células de mieloma múltiple tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos, y estas fueron tratadas con alisertib y barasertib

a las concentraciones indicadas durante 72 horas. Tras este tiempo, se determinó la muerte inducida por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-FITC (**C y F**), y se prepararon extractos celulares según se indica en el apartado 3.8 de Materiales y métodos. Finalmente, se evaluó la expresión de las proteínas indicadas en cada línea celular, utilizando β -actina como control de carga (**A y D**), y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga (**B y E**). Imágenes representativas de $n=2-4$ experimentos independientes. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones. Los resultados de citometría y de las cuantificaciones son la media $\pm$ SD de $n=2-4$ experimentos independientes, en algunos casos con duplicados. Para la muerte celular se ha realizado el análisis estadístico *one-way* ANOVA con posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de ambos compuestos respecto al control, y para la cuantificación se ha llevado a cabo el análisis estadístico *two-way* ANOVA con el posterior análisis de Dunnett, comparando la cuantificación de cada proteína para cada tratamiento respecto a su estado basal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las gráficas de citometría de las Figuras 5.20C y F vuelven a demostrar el potencial citotóxico de los inhibidores de Aurora quinasa en las células de mieloma múltiple. En cuanto a las proteínas evaluadas, en las Figuras 5.20A-B y D-E se observa que los tratamientos provocan cambios en sus niveles de expresión. BUBR1 se sobreexpresa en las células NCI-H929 y MM.1S expuestas a alisertib, este aumento de la expresión es más sutil en las células OPM-2 y esta no varía en las U266. Sin embargo, cuando las células se tratan con barasertib, solamente se producen pequeñas modificaciones en su expresión, destacando el ligero incremento que sufren las MM.1S con ambas dosis. Sorprende especialmente lo sucedido en las células RPMI 8226, ya que estas células sufren una significativa pérdida de expresión de BUBR1 por la acción de ambos inhibidores. Respecto a ciclina B1, sus niveles ascienden drásticamente en cuatro de las cinco líneas celulares tratadas con alisertib, siendo las MM.1S las que experimentan un mayor aumento, seguidas de las NCI-H929; barasertib, en cambio, apenas altera su expresión, salvo en las células MM.1S y U266, donde a dosis bajas provoca un incremento de la expresión que no es estadísticamente significativo, y en las células OPM-2, en las que a dosis altas los niveles de esta proteína se reducen considerablemente. De nuevo, las que muestran un patrón de expresión particular son las células RPMI 8226, ya que los niveles de esta proteína decaen con barasertib y la dosis baja de alisertib. Por último, dosis altas de alisertib elevan los niveles de MAD2 en las MM.1S, pero los reducen en las NCI-H929 y OPM-2, mientras que ambas dosis de alisertib disminuyen de forma leve sus niveles en las U266; en cambio, su expresión aumenta en las RPMI 8226, independientemente de la dosis utilizada. Cuando barasertib es el inhibidor utilizado, sólo es destacable su menor expresión en las OPM-2 tratadas con la dosis mayor y su incremento en las RPMI 8226 y en las MM.1S con la dosis baja y con ambas dosis, respectivamente.

El complejo formado por ciclina B1/CDK1 es fundamental para la adecuada transición desde la fase G2 a la mitosis [696]. De hecho, la detención del ciclo en la fase G2, así como la entrada y salida de la mitosis, depende de la actividad de este complejo [697]. Si bien CDK1, la subunidad

catalítica, se expresa durante todo el ciclo celular, ciclina B1 lo hace en momentos concretos, pues comienza a acumularse al final de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la transición G2/M y disminuye justo antes del inicio de la anafase [697, 698]. Esta degradación es impulsada en la metafase por APC/C, una gran ubiquitin ligasa multimérica, y culminada por la subunidad 26S del proteasoma [699]. El complejo APC/C se mantiene inactivo por acción del complejo MCC, que secuestra a CDC20, su co-activador, hasta que todos los cinetocoros se han anclado correctamente al huso mitótico, y una vez que esto sucede, los niveles de ciclina B1 y securina descienden casi de manera inmediata, produciéndose la adecuada segregación de los cromosomas [143, 700]. Por el contrario, el mal anclaje de un solo cinetocoro mantiene activo el SAC y, por lo tanto, APC/C no se activa, evitando así la degradación prematura de ciclina B1 y, en consecuencia, la inactivación de CDK1 [480, 700, 701].

Teniendo en consideración todo esto y los efectos observados en la progresión del ciclo celular, es posible dar explicación a algunos de los cambios observados tras el tratamiento con los inhibidores de Aurora quinasa. Por un lado, los niveles de ciclina B1 tras el tratamiento con barasertib son menores o similares a los de las células no tratadas, lo que refuerza nuestra hipótesis de que las células consiguen escapar de la parada mitótica inducida por este compuesto mediante deslizamiento mitótico (Figs. 5.17 y 5.20). Aurora B, como componente del complejo CPC, reconoce la falta de tensión cuando se producen conexiones no bipolares, de manera que estas quedan disueltas y los cinetocoros no unidos son detectados por el SAC para prevenir la salida prematura de la mitosis [702]. No obstante, si Aurora B se encuentra inhibida, el punto de control mitótico queda anulado y se produce una rápida degradación de ciclina B1 que supera a las señales mortales acumuladas durante la mitosis [703]. Esta situación impulsa la entrada en la anafase a pesar de la existencia de alineaciones cromosómicas incorrectas, y las células terminan sufriendo deslizamiento mitótico, sin producirse la citoquinesis [703, 704]. Una vez que la mitosis se ha sorteado, las células pueden sufrir apoptosis, iniciar un nuevo ciclo de división que las llevaría a un estado poliploide o detener su crecimiento en la fase G1 y terminar activando el programa de senescencia celular [197, 703, 705].

Por otro lado, la acumulación de ciclina B1 en las células tratadas con alisertib correlaciona con un arresto mitótico prolongado (Figs. 5.16 y 5.20). Los fallos en el ensamblaje del huso mitótico provocados por la inhibición de Aurora A mantendrían activado el SAC durante al menos 72 horas, sin permitir la degradación de ciclina B1 [197]. Sin embargo, varios estudios asocian la parada en G2/M inducida por alisertib con la pérdida de expresión de ciclina B1 y CDK1 y el incremento de la expresión de moléculas que impiden la progresión del ciclo, incluidas p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1}, y de p53, que regula a ambos inhibidores; no obstante, estos cambios son más evidentes con concentraciones a partir de 1 μ M que en el rango nanomolar [522, 525, 706]. En este sentido, *Du et al.* encontraron que alisertib y otro inhibidor selectivo de Aurora A, LY3925668,

fomentaban la expresión de ciclina B1. LY3925668 la incrementaba progresivamente al aumentar la dosis, pero con alisertib el incremento se producía únicamente a dosis de 250 nM, mientras que al subir la dosis los niveles de ciclina B1 disminuyeron debido al viraje hacia la inhibición de Aurora B, cuyo fenotipo era el dominante a dosis del rango micromolar [662]. Sin embargo, en nuestro caso, el fenotipo de las células tratadas con dosis altas de alisertib es acorde con la inhibición de Aurora B (datos no mostrados), pero los elevados niveles de ciclina B1 detectados en las células NCI-H929, MM.1S, U266 y OPM-2 no correlacionan con los observados al bloquear Aurora B. Por lo tanto, esto podría indicar que alisertib en el rango micromolar inhibe a Aurora A dando lugar a un fenotipo equivalente al observado al inhibir Aurora B, pero sin que se produzca la inhibición de esta proteína. Además, durante el arresto mitótico inducido por alisertib a dosis altas es posible que las señales mortales se acumulen lentamente, no sean lo suficientemente potentes para superar el umbral apoptótico o incluso sean inhibidas a través de algún mecanismo desconocido. Por ello, se necesitan estudios adicionales para confirmar o descartar estas hipótesis. Por otra parte, en el caso de las células RPMI 8226 tratadas con alisertib a dosis bajas, la expresión de ciclina B1 disminuye de forma notoria (Fig. 5.20), pero aproximadamente la mitad de las células poseen una dotación cromosómica igual o superior a 4n (Fig. 5.16). Esto puede estar indicando las células no se detienen en la fase G2/M y escapan a la fase G1 de la siguiente interfase con un contenido de DNA de 4n, e incluso se generan células poliploides con una dotación cromosómica de 8n.

BUBR1 y MAD2 son dos de los componentes que constituyen el SAC y el complejo MCC (ver Fig. 1.13). Cuando se producen anclajes erróneos entre los cinetocoros y los microtúbulos, no se genera tensión, y Aurora B, como subunidad catalítica del complejo CPC, resuelve esta situación fosforilando la principal plataforma de unión entre las dos estructuras, lo que reduce la afinidad de los cinetocoros por los microtúbulos y estos se liberan [143]. En este contexto comienza la señalización del SAC, que recluta a todos sus componentes a través de sucesivas fosforilaciones. Mps1 es la primera en localizarse en el cinetocoro libre, y esta atrae a BUB1, BUB3 y BUBR1 hasta el exterior del cinetocoro [143]. Varias fosforilaciones de BUB1 permiten el reclutamiento de MAD1 y, estas a su vez, atraen a MAD2, que al asociarse con MAD1 modifica su conformación de abierta (O-MAD2) a cerrada (C-MAD2) [143]. En este punto, BUBR1, BUB3 y C-MAD2, junto con CDC20, el co-activador de APC/C, constituyen el complejo MCC, cuyo objetivo es mantener inhibido el complejo APC/C hasta que el anclaje cinetocoros-microtúbulos y el alineamiento cromosómico son los adecuados [143]. Cuando esto se consigue, el complejo MCC se desensambla y CDC20 liberado interacciona con APC/C y activa el complejo, promocionando el inicio de la anafase [707].

Teniendo en cuenta este mecanismo de acción, parece factible que la síntesis de los componentes del complejo MCC se incremente durante un arresto mitótico prolongado como el

ocasionado por alisertib, donde el SAC se encuentra activo. Esto explicaría el incremento de BUBR1 y de MAD2 en algunas líneas celulares expuestas a alisertib. Además, se ha descrito que la acetilación de BUBR1 en la posición K250 la protege de la ubiquitinación y una degradación anticipada durante la mitosis [708], lo que también podría contribuir al mantenimiento de los niveles de esta proteína. Sin embargo, estas teorías no explicarían la reducción de la expresión de BUBR1 en las células RPMI 8226 con todos los tratamientos.

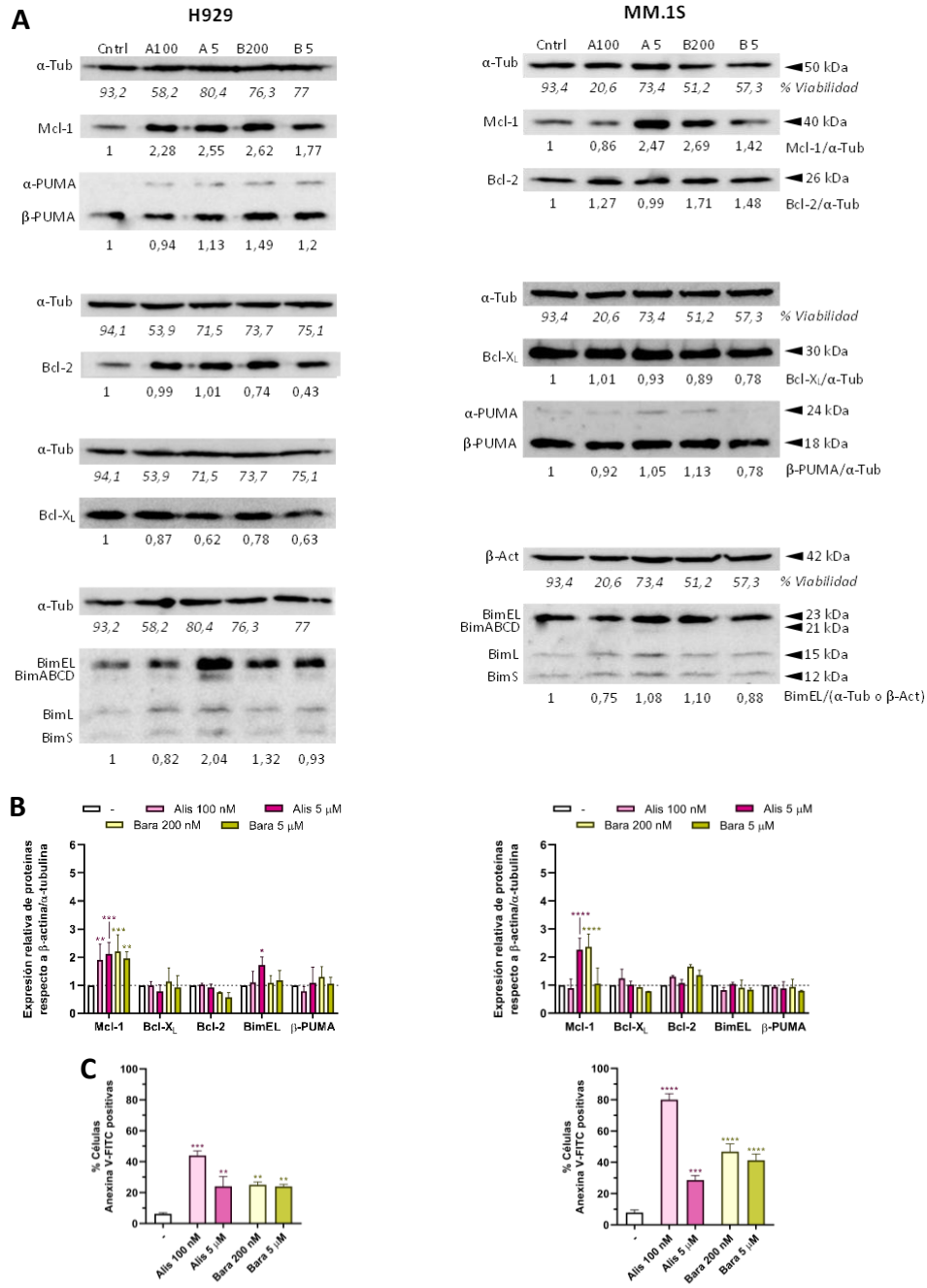
Por otra parte, p53 y c-Myc participan en la modulación de la expresión y/o la actividad de BUBR1 y MAD2 [709–711]. p53 regula positivamente la transcripción de BUBR1 y, posiblemente, esta es una diana posterior de p53; sin embargo, p53 reprime la expresión de MAD2 [709, 710]. De las células utilizadas en el presente estudio, las NCI-H929 y MM.1S poseen la forma *wild-type* de p53, mientras que el resto lo tienen mutado [685]. Esto podría estar detrás del aumento de la expresión de BUBR1 en las dos primeras líneas celulares y la escasa variación o incluso disminución de la expresión de esta proteína en las líneas U266, RPMI 8226 y OPM-2. Por su parte, c-Myc induce la expresión de ambas proteínas y las activa, retrasando la progresión mitótica [711]. A su vez, tanto p53 como c-Myc son potenciales dianas de Aurora A y B y, por tanto, la inhibición de las proteínas Aurora puede afectar indirectamente a la expresión y/o función de BUBR1 y MAD2. De hecho, se ha descrito que Aurora A forma complejos estables con N-Myc y c-Myc y que Aurora B estabiliza a c-Myc al fosforilarla en su residuo Ser67, pero la adición de alisertib o barasertib fomenta la degradación vía proteasoma de c-Myc [712, 713]. Extrapolando esto último a nuestros resultados, es posible que alisertib y barasertib promuevan la degradación de c-Myc y esto reprima la expresión de BUBR1, aunque esta hipótesis habría que confirmarla. En cuanto a p53, esta puede ser fosforilada por Aurora B en diferentes residuos y esto puede llevar a su inactivación o degradación proteasomal. En cambio, Aurora A puede fosforilar tanto a p53 como a reguladores positivos y negativos de esta, por lo que las consecuencias sobre la estabilidad y función de p53 pueden ser muy variadas [714]. Relacionado con esto se ha encontrado que alisertib y barasertib regulan positivamente la expresión de p53 *in vitro* e *in vivo* [395, 715, 716]. Por lo tanto, en vista de todo esto, la modulación de la expresión y/o actividad de p53 y c-Myc debido a la inhibición de Aurora A y B puede repercutir en BUBR1 y MAD2, haciendo que su actividad y expresión se vean modificadas.

En definitiva, en base a las variaciones en la expresión de ciclina B1, nuestros resultados apuntan, en general, a un arresto mitótico prolongado cuando actúa alisertib, mientras que barasertib impulsa el deslizamiento mitótico a las concentraciones testadas. Estos resultados estarían en consonancia con el efecto observado de cada compuesto sobre la progresión del ciclo a las dosis testadas. La excepción son las células RPMI 8226, pues si bien sus bajos niveles de ciclina B1 cuando se tratan con barasertib son consistentes con la salida mitótica, estos no son coherentes con la detención en G2/M observada en presencia de alisertib a dosis bajas, pero sí

podrían indicar que las células RPMI 8226 salen del arresto mitótico y una parte de ellas alcanzan un estado poliploide. Por otra parte, la relación entre los inhibidores de Aurora quinasa y la expresión de BUBR1 y MAD2 es todavía un campo muy poco explorado. De hecho, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, este es el primer trabajo en el que se analiza el efecto directo de inhibidores selectivos de Aurora A y B sobre la expresión de proteínas implicadas en la señalización del SAC. Teniendo en cuenta que el efecto de alisertib y barasertib sobre la expresión de BUBR1 y MAD2 es muy variado, existe la posibilidad de que múltiples factores, como modificaciones post-traduccionales y la implicación de intermediarios como p53 y c-Myc afecte de alguna manera a su expresión y/o actividad. Por ello, resultan indispensables nuevos estudios que ayuden a descifrar el mecanismo subyacente a la acción de estos compuestos y su relación con el fenotipo observado.

5.2.4. Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma múltiple

Como se ha confirmado en el punto 5.2.2, la inhibición de Aurora A y B paraliza el ciclo de las células de mieloma en la fase G2/M. Además, también hemos encontrado que alisertib en el rango nanomolar activa la catástrofe mitótica, un mecanismo que también se ha identificado cuando se inhiben Aurora B o ambas proteínas simultáneamente [542, 688]. Uno de los destinos finales de las células tras la catástrofe mitótica es la muerte celular, ya sea durante la mitosis o una vez que han escapado de ella [144]. Se ha propuesto que, si p53 está ausente, la necrosis será el tipo de muerte predominante, pero si p53 está presente, la apoptosis activada a través de la vía mitocondrial será el principal mecanismo de muerte [150]. Puesto que en la sección 5.2.1 se demostró el potencial citotóxico de alisertib y barasertib y dada la trascendencia de las proteínas de la familia Bcl-2 en el proceso apoptótico por la vía intrínseca, se decidió evaluar la expresión de miembros anti- y pro-apoptóticos en células de mieloma múltiple expuestas a concentraciones en los rangos nano- y micromolar de ambos inhibidores con el fin de poder determinar si variaciones en sus niveles correlacionaban con la mayor o menor sensibilidad a los compuestos.



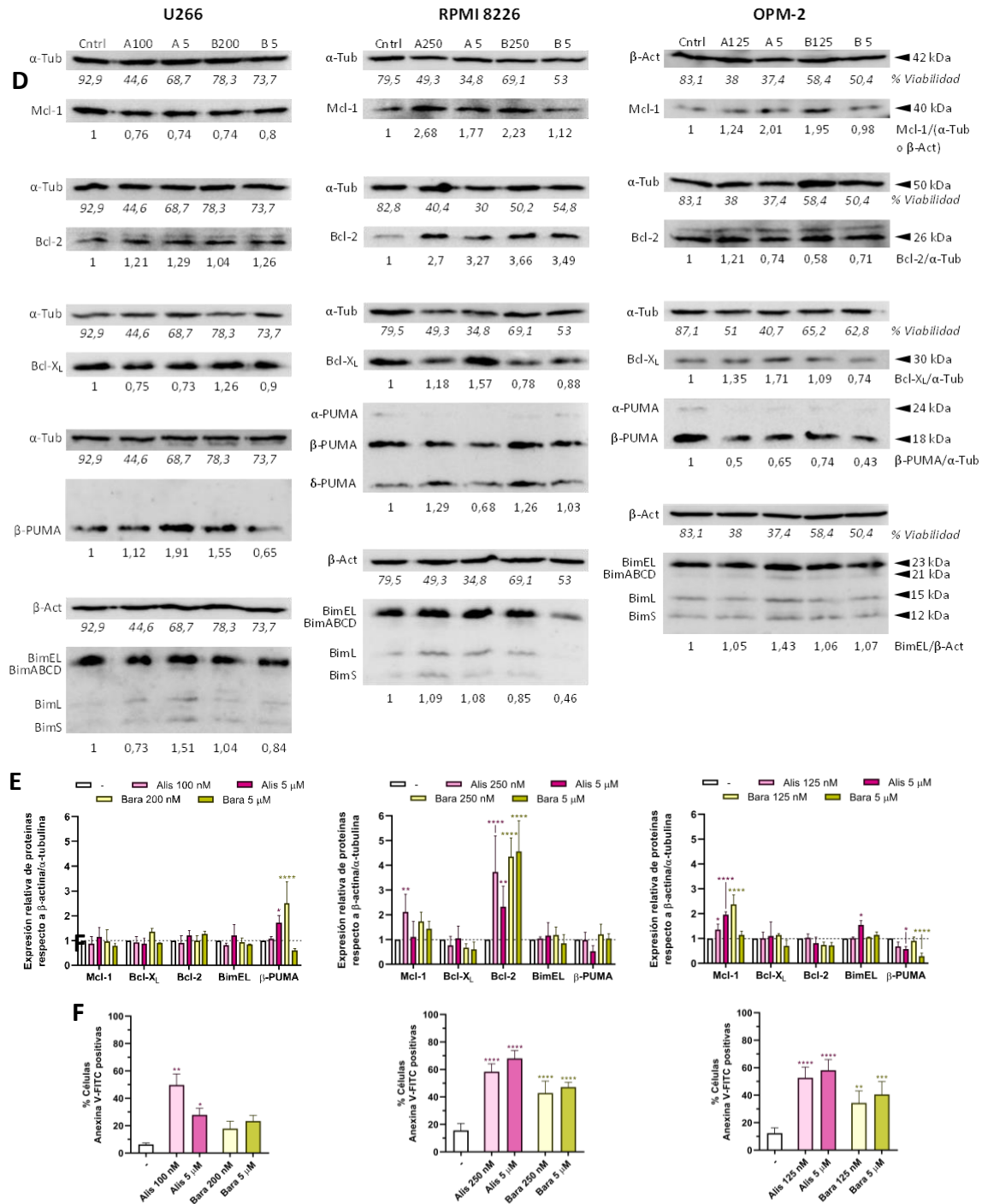


Figura 5.21 | Expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma múltiple tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^6$ células en 10 ml en placas de 6 pocillos, y estas fueron expuestas a alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la muerte inducida por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-FITC (C y F), y se prepararon extractos celulares siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.8 de Materiales y métodos. Por último, se evaluó la expresión de las proteínas indicadas en cada línea celular, utilizando β-actina o α-tubulina como control de carga (A y D), y se realizó un análisis cuantitativo de dicha expresión, referenciando cada cuantificación respecto al control y normalizando respecto al control de carga (B y E). Imágenes representativas de n=2-4 experimentos independientes. Las proteínas reveladas a partir de un mismo gel se muestran agrupadas. En cursiva se indica la viabilidad celular y debajo de cada proteína se muestran las cuantificaciones. Los resultados de citometría y de las cuantificaciones son la media ± SD de n=2-4 experimentos independientes. Para la muerte celular se ha realizado el análisis

estadístico *one-way* ANOVA con posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de ambos compuestos respecto al control, y para la cuantificación se ha llevado a cabo el análisis estadístico *two-way* ANOVA con el posterior análisis de Dunnett, comparando la cuantificación de cada proteína para cada tratamiento respecto a su estado basal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Teniendo en cuenta que la evaluación de las proteínas del ciclo y de la familia Bcl-2 en células tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa se realizó a partir de los mismos extractos celulares, los datos de muerte aquí mostrados (Figs. 5.21C y F) son idénticos a los recogidos en el apartado anterior, de manera que el análisis realizado entonces es extensible a estos ensayos. Y respecto a los niveles de expresión de las proteínas (Figs. 5.21A-B y D-E), estos no sufren excesivas variaciones cuando las células de mieloma se exponen a los inhibidores de Aurora quinasa.

Centrándonos primero en las proteínas anti-apoptóticas, las únicas que alteran significativamente su expresión por los tratamientos en algunas líneas celulares son Mcl-1 y Bcl-2, pues las variaciones que experimenta Bcl-X_L en todas las líneas celulares son mínimas. Las células RPMI 8226 son las que presentan mayores niveles de Bcl-2 con todos los tratamientos, especialmente con barasertib. Además, hay que destacar la presencia de una banda más tenue de mayor peso molecular en las células U266 y OPM-2 control y tratadas, así como en las MM.1S tratadas con la dosis baja de alisertib, que podría corresponder a la forma fosforilada de Bcl-2. Por último, Mcl-1 se sobreexpresa en todas las líneas celulares en función del tratamiento, exceptuando las U266, en las que no aprecian cambios destacables en los niveles de esta proteína. Las células NCI-H929 la sobreexpresan en presencia de ambos compuestos, independientemente de la dosis, mientras que en las MM.1S y las OPM-2 la expresión es mayor cuando se tratan con alisertib a la dosis alta y barasertib a la dosis baja. Finalmente, las RPMI 8226 incrementan su expresión ante dosis bajas de alisertib y ambas dosis de barasertib.

Por otra parte, en cuanto a las proteínas pro-apoptóticas, Bim y PUMA no experimentan importantes cambios en su expresión tras los tratamientos. La única variación reseñable en la expresión de Bim se produce en las NCI-H929 y OPM-2, donde sus niveles ascienden ligeramente con alisertib a 5 μ M. Y en cuanto a PUMA, atendiendo a su isoforma β , se observa una pérdida de expresión en las U266 expuestas a la dosis más alta de barasertib, en las RPMI 8226 sometidas a dosis altas de alisertib y en las OPM-2 tratadas con alisertib y la dosis más alta de barasertib, mientras que sus niveles aumentan en las U266 al exponerlas a dosis altas de alisertib y bajas de barasertib. Además, resulta curiosa la detección en las células RPMI 8226 de una tercera banda en la membrana correspondiente a PUMA, que pesa entre 11 y 15 kDa y que no se corresponde con las isoformas habitualmente detectadas (α y β). Esta banda podría ser un artefacto o más bien podría corresponder a la isoforma δ de PUMA, que posee un menor peso molecular que las principales isoformas y se ha descrito que no contiene el dominio BH3, no interacciona con

Bcl-2, no se localiza en la mitocondria y no altera el crecimiento celular ni muestra actividad apoptótica [717].

Existe un gran consenso acerca del papel trascendental de las proteínas de la familia Bcl-2 en la muerte de las células detenidas en mitosis, aunque se conoce con mayor detalle su relevancia en la muerte en mitosis que en la experimentada tras el deslizamiento mitótico. En cualquier caso, el destino final de las células detenidas en mitosis depende fundamentalmente de sus niveles y de las modificaciones post-traduccionales que estas proteínas puedan sufrir [718]. Bcl-2 y Bcl-X_L son dos proteínas anti-apoptóticas que mantienen estable su expresión durante el arresto mitótico gracias a la larga vida media de sus mRNAs y a que estos contienen un elemento IRES en su secuencia que les permite ser traducidos durante esta etapa [555]. Esto explicaría los niveles de expresión más o menos constantes a pesar de los tratamientos en todas las líneas celulares salvo en las RPMI 8226, donde tanto alisertib como barasertib potencian la expresión de Bcl-2, apuntando a esta proteína como una diana indirecta de ambos compuestos en esta línea celular. Skov *et al.* también encontraron sobreexpresada Bcl-X_L en células de cáncer de mama en respuesta a alisertib [719]. Shah *et al.* observaron que los niveles de Bcl-2 y Bcl-X_L se mantenían y los de PUMA y Noxa aumentaban tras la inducción de un estado de poliploidía por medio de barasertib en dos modelos tumorales, mientras que los de Bim, Bik y tBid incrementaban en función de la línea celular; sin embargo, esto no fue suficiente para desencadenar la apoptosis en estas células, ya que su supervivencia dependía de Bcl-X_L [558]. Sin embargo, otro estudio expuso una disminución de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L así como una mayor expresión de Bax y PUMA en células de cáncer colorrectal tratadas con alisertib, promoviendo la activación de la vía apoptótica mitocondrial [502].

Mcl-1 se ha postulado como un miembro anti-apoptótico clave durante la mitosis al actuar como un temporizador mitótico, ya que su baja o nula expresión durante un arresto mitótico duradero impulsa la apoptosis, pero cuando se sobreexpresa las células sobreviven y pueden llevar a cabo el deslizamiento mitótico [720]. Su fosforilación mediante las quinasas JNK, p38 y CDK1 y posterior ubiquitinación por E3 ligasas como FBW/SCF y APC/C, así como la breve vida media de su mRNA, son las causantes de su rápida desaparición durante la mitosis [555, 705, 721]. Las evidencias indican que Mcl-1 se degrada cuando agentes anti-microtúbulos e inhibidores de la familia Aurora prolongan la mitosis en el tiempo [722–726]. Además, la degradación mediada por la inhibición de Aurora A y B suele ir acompañada de la estabilización de miembros pro-apoptóticos, incluidos Bim y PUMA, lo que conlleva a la activación de la apoptosis [723, 725, 726]. En nuestro caso, en cambio, observamos el efecto contrario, pues los niveles de Mcl-1 aumentan generalmente con los tratamientos, mientras que Bim apenas experimenta cambios y PUMA aumenta o desciende en determinadas situaciones.

Noxa es el regulador endógeno de Mcl-1 y también es clave para que se produzca la muerte mitótica, pues durante la mitosis impulsa la degradación de Mcl-1 a la vez que ella misma se degrada, mientras que cuando Noxa no se expresa, Mcl-1 se estabiliza [718]. Además, Bim también aumenta su expresión cuando Noxa no está presente, y puesto que esta proteína puede asociarse con cualquier anti-apoptótica, su actividad pro-apoptótica puede verse comprometida si existe un exceso de una o varias de ellas, favoreciendo la supervivencia celular tras un largo arresto mitótico [555, 718]. No obstante, un estudio ha manifestado un incremento de los niveles de Noxa y una caída de Mcl-1 en células tumorales poliploides generadas tras la exposición a barasertib, pero el silenciamiento de la proteína pro-apoptótica mejora la estabilidad de Mcl-1 y hace que esta recupere su interacción con Bim y PUMA [558]. Otro estudio también detectó un incremento de los niveles de Noxa y PUMA en células tumorales deficientes en p53 tras su exposición a MLN8054 [727].

Por otro lado, la elevada expresión de los miembros anti-apoptóticos se relaciona con resistencias a distintos fármacos antimitóticos, incluidos los inhibidores de la familia Aurora [728–730]. Sin embargo, en nuestro caso, las células de mieloma son sensibles a alisertib y barasertib pese a que ambos inducen un aumento generalizado de los niveles de Mcl-1 y, en el caso de las células RPMI 8226, especialmente de Bcl-2.

Más allá de las variaciones mencionadas, la actividad citotóxica que muestran los inhibidores de Aurora quinasa sugiere que el nivel de expresión de las proteínas de esta familia no es tan importante para la supervivencia de las células de mieloma como podría creerse en un principio, aunque sería conveniente conocer el nivel de expresión del resto de proteínas de la familia, incluidas Noxa y las proteínas efectoras Bax y Bak, ya que tanto a estas últimas como a las proteínas “solo-BH3” por separado se les otorga un papel pro-apoptótico redundante [718]. Otro aspecto importante además de los niveles de expresión son las modificaciones post-traduccionales que estas proteínas pueden experimentar durante el arresto mitótico, ya que estas influyen en la estabilidad y la red de conexiones que establecen entre sí todas estas proteínas. Especialmente relevante es la fosforilación, que puede tener consecuencias muy variadas para las células en función de la proteína que se fosforila. Por lo general, la fosforilación de las proteínas anti-apoptóticas debilita su actividad anti-apoptótica, en el caso de Mcl-1 debido a su efecto desestabilizante y a la promoción de su degradación, mientras que las formas fosforiladas de Bcl-2 y Bcl-X_L se asocian con una menor afinidad por Bax y Bak y, por tanto, con la inducción de apoptosis antes de que se produzca el deslizamiento mitótico [156, 718]. Sin embargo, la fosforilación de las proteínas pro-apoptóticas se traduce en efectos variables en función de la proteína, pues Bid y Bad fosforilados estimulan la muerte celular, mientras que la fosforilación de Bim en múltiples residuos mediada por Aurora A la conduce a su ubiquitinación y posterior degradación durante la parada mitótica, pero la acción de la fosfatasa PP2A deshace esta

fosforilación y le devuelve la estabilidad tras la salida de la mitosis [718]. Según nuestros resultados, no se detectan formas fosforiladas de las proteínas pro-apoptóticas, pero Bcl-2 podría fosforilarse en las células MM.1S expuestas a dosis bajas de alisertib; asimismo, Bcl-2 se encontraría fosforilada en las células U266 y OPM-2 a nivel basal y los niveles de fosforilación parecen incrementar con los tratamientos, lo que podría contribuir al potencial citotóxico de los compuestos en dichas situaciones. Estos resultados coinciden parcialmente con dos estudios publicados por el grupo de Kim, pues barasertib no inducía la fosforilación de ninguna proteína de la familia Bcl-2 en células Jurkat (leucemia), pero alisertib sí que fosforilaba sutilmente a BimEL y, en ocasiones, a Bcl-2 y Mcl-1 [731, 732]. Por lo tanto, es de vital importancia profundizar en las modificaciones post-traduccionales de las proteínas de la familia Bcl-2 en presencia de este tipo de compuestos y desentrañar la red de conexiones que establecen, pues las alteraciones que se producen en este interactoma posiblemente modulan la sensibilidad a la apoptosis durante el arresto mitótico y tras el deslizamiento mitótico.

5.2.5. Efecto de fármacos antimitóticos en líneas celulares de mieloma deficientes en proteínas pro-apoptóticas o que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas

La sección anterior ha dejado patente que la mayoría de las proteínas de la familia Bcl-2 evaluadas no experimentan cambios notables en su expresión a consecuencia de los inhibidores de Aurora quinasa. Bim, considerada la proteína “solo-BH3” activadora más relevante en el mieloma [607], es una de estas proteínas; no obstante, es posible que la presencia del compuesto modifique sus interacciones con otros miembros de la familia, favoreciendo u obstaculizando la inducción de la apoptosis mitocondrial. Dada la importancia de Bim, así como la de Bax y Bak para dicho fin, y el papel protector que ejercen los miembros anti-apoptóticos frente a los fármacos antimitóticos [67, 607, 723, 733–738], se ha creído conveniente valorar la respuesta del panel de células de mieloma utilizado en el apartado 5.1.2 (células desprovistas de Bim (BimKO o shBim), Bax (BaxKO), Bak (BakKO) o Bax y Bak (DKO) y que sobreexpresaban Bcl-X_L o Mcl-1) a alisertib y barasertib, incluyendo además los agentes anti-microtúbulos vincristina y docetaxel. La duración de los ensayos varió en función del compuesto utilizado. Así, los experimentos con vincristina y docetaxel duraron 24 horas; los que incluían barasertib, 72 horas; y los que incluían alisertib, de 24 a 72 horas.

Al igual que en el apartado 5.1.2, en esta ocasión se ha optado por trabajar, de nuevo, con los datos de muertes específicas, y el estudio se inició evaluando el papel de Bim en la muerte instigada por los diferentes compuestos.

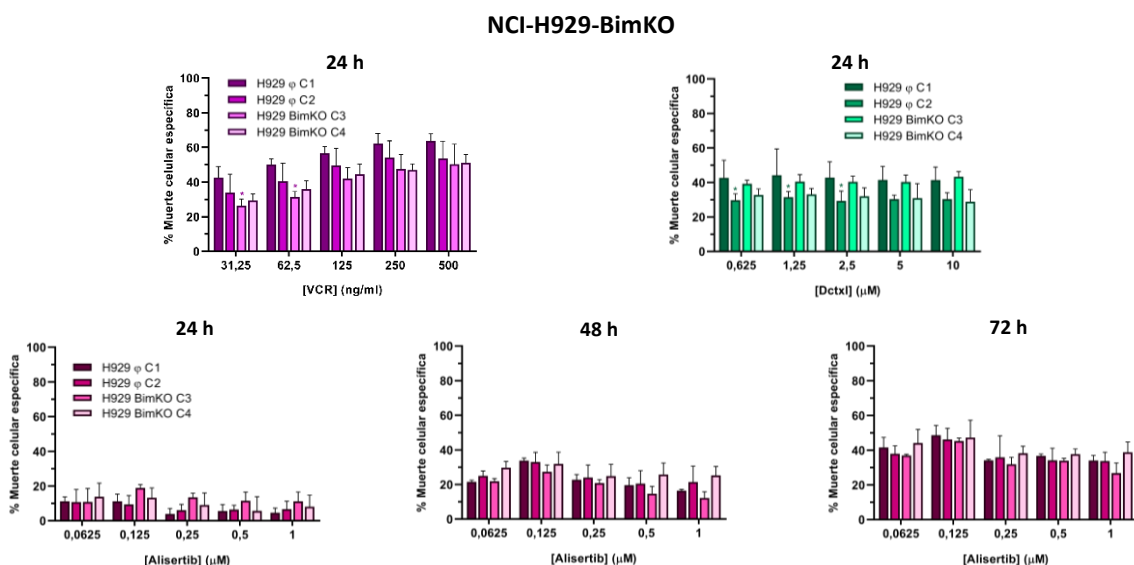


Figura 5.22 | Sensibilidad de células NCI-H929 deficientes en Bim a fármacos antimetabólicos. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μl en placas de 48 pocillos y estas fueron incubadas con concentraciones crecientes de los compuestos señalados durante los tiempos indicados. Seguidamente, se determinó la muerte celular desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-9 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey, comparando cada concentración de cada antimetabólico en las líneas BimKO respecto a las líneas vector vacío. *p < 0,05.

Según las gráficas de la Figura 5.22, tanto vincristina como docetaxel exhiben una toxicidad moderada-elevada tanto en los clones control como en los que carecen de Bim desde la primera dosis testada, mientras que alisertib incrementa progresivamente en el tiempo su actividad citotóxica en todas las sublíneas. Además, la respuesta de todas las sublíneas es similar para cada tratamiento y la mayoría de las diferencias que se aprecian no son estadísticamente significativas. No obstante, la ausencia de Bim conferiría cierta protección frente a concentraciones bajas de vincristina. En un estudio anterior se comprobó que Bim estaba totalmente ausente en ambos clones BimKO y que el nivel de expresión de las proteínas anti- y pro-apoptóticas en las líneas control y BimKO era similar [421], por lo que las pequeñas diferencias observadas en la respuesta a docetaxel, alisertib y dosis altas de vincristina podrían deberse a cuestiones intrínsecas a los procesos de infección y/o selección de los clones, lo que podría hacer que los antimetabólicos modifiquen de manera diferente la expresión y las interacciones que establecen entre sí las proteínas de la familia Bcl-2 en cada clon, repercutiendo en la sensibilidad de cada línea celular a cada uno de ellos.

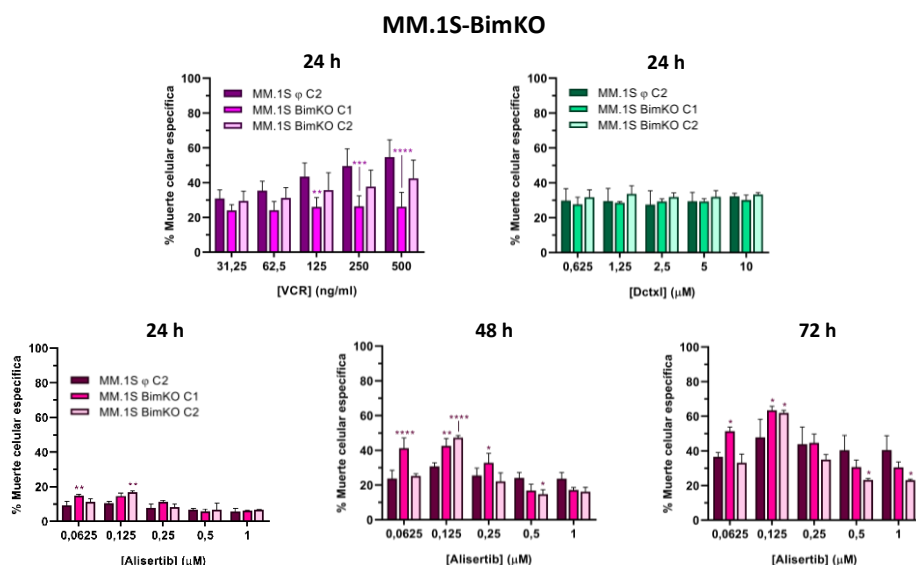


Figura 5.23 | Sensibilidad de células MM.1S deficientes en Bim a fármacos antimetabólicos. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos y estas fueron tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos señalados durante los tiempos indicados. Tras los tratamientos, se determinó la muerte celular desencadenada por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-5$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de cada antimetabólico en las líneas BimKO respecto a la línea control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A diferencia de las sublíneas derivadas de las células NCI-H929, la Figura 5.23 revela diferencias en la respuesta emitida por la línea MM.1S control y los clones MM.1S BimKO a algunos de los compuestos. Mientras que el nivel de muerte inducido por docetaxel es prácticamente idéntico en todas las sublíneas, sí que se aprecian diferencias en la sensibilidad a vincristina, pues la toxicidad sobre la línea control era mayor que en los clones deficientes en Bim cuando se aumentaba la dosis del compuesto; no obstante, el clon 1 de BimKO se ve ligeramente menos afectado que el clon 2 y, además, su sensibilidad a vincristina no varía a pesar del incremento la dosis. Finalmente, el efecto citotóxico de alisertib no consigue ser neutralizado por las células que no poseen Bim a ningún tiempo, e incluso estas células quedan ligeramente sensibilizadas a dosis iguales o inferiores a 125 nM, especialmente cuando los tratamientos se extienden en el tiempo. Sin embargo, después de 72 horas de incubación con dosis iguales o superiores a 500 nM sí se observa una pequeña protección en las sublíneas BimKO.

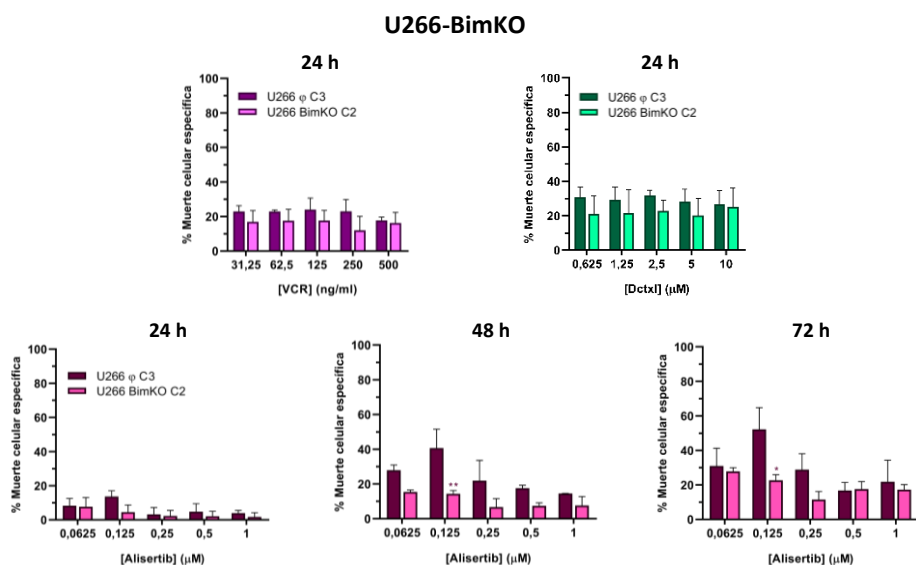


Figura 5.24 | Sensibilidad de células U266 deficientes en Bim a fármacos antimitóticos.

Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos, las cuales se expusieron a concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante los tiempos señalados. A continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada inhibidor mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-4$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de cada antimitótico en la línea BimKO respecto a la línea control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En el caso de las células U266, el silenciamiento de Bim altera su sensibilidad a todos los antimitóticos, especialmente a alisertib (Fig. 5.24). El hecho de que la muerte inducida en las células BimKO por vincristina y docetaxel fuera ligeramente menor a la ocasionada en las células control a cualquier dosis testada indica que la ausencia de Bim protege mínimamente a las células U266 de la acción citotóxica de ambos agentes anti-microtúbulos, aunque su función pro-apoptótica es, en general, prescindible. Sin embargo, esta protección es más notoria cuando se exponen a alisertib, especialmente durante largos periodos de tiempo, pues las células BimKO son más resistentes que las células control a la toxicidad provocada por el inhibidor a cualquier dosis cuando se tratan durante 48 horas y a dosis intermedias cuando el tratamiento se extiende hasta las 72 horas. En cambio, si alisertib actúa solo durante 24 horas, el efecto protector más notable en las células que carecen de Bim se observa a la dosis de 125 nM.

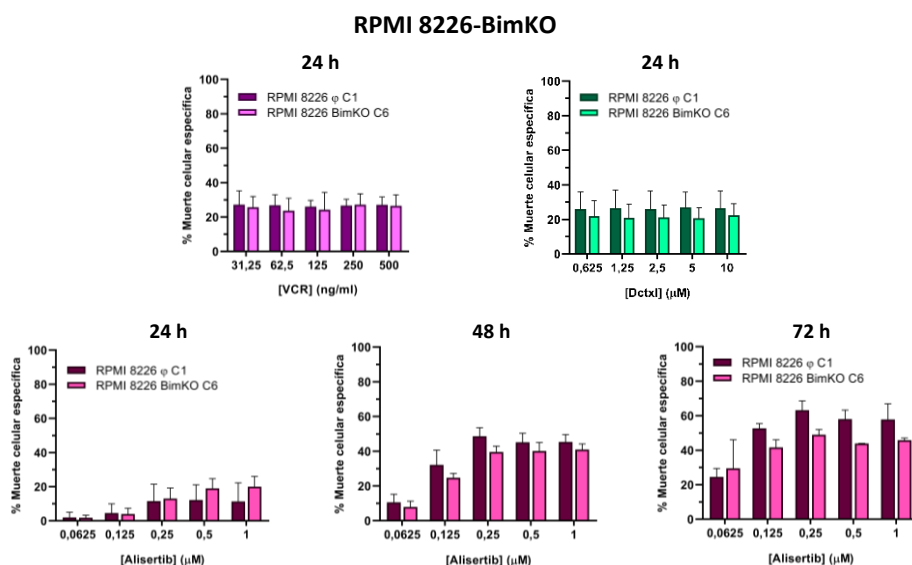


Figura 5.25 | Sensibilidad de células RPMI 8226 deficientes en Bim a fármacos antimitóticos. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 pocillos y estas fueron tratadas con concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante los tiempos señalados. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte celular inducida por cada inhibidor mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-7$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de cada antimitótico en la línea BimKO respecto a la línea control.

Atendiendo a la Figura 5.25, en las células RPMI 8226 se observa que la toxicidad de docetaxel y de alisertib tras 48, y en especial, 72 horas de actuación disminuye modestamente cuando Bim no está presente, mientras que el efecto citotóxico de vincristina es equiparable en ambas sublíneas.

Finalmente, la Figura 5.26 desvela que las células OPM-2 silenciadas en Bim se encuentran levemente protegidas frente a dosis bajas de vincristina, pero a dosis iguales o superiores a 62,5 ng/ml, el compuesto afecta en mayor medida a estas células que a la línea control. Esta mayor sensibilización de las células shBim también se advierte cuando las células se tratan con docetaxel y con alisertib durante 24 horas y especialmente a dosis bajas. Sin embargo, las células shBim vieron mermada de forma considerable su sensibilidad al inhibidor de Aurora A, particularmente a dosis intermedias-elevadas, cuando el tratamiento se extendía hasta las 72 horas. Por último, tras 48 horas de tratamiento, se observa que la toxicidad de alisertib a dosis bajas es ligeramente mayor en las células shBim, pero a dosis altas estas se encuentran levemente protegidas frente al fármaco. La mayor sensibilidad de las células con Bim silenciado a los compuestos puede deberse a su elevada muerte basal, aunque también puede influir el hecho de que estas células expresen más Bak que la línea control a nivel basal [421], o que estos tratamientos regulen positiva o negativamente las proteínas de la familia Bcl-2 y/o modifiquen sus interacciones en favor de la muerte de las células.

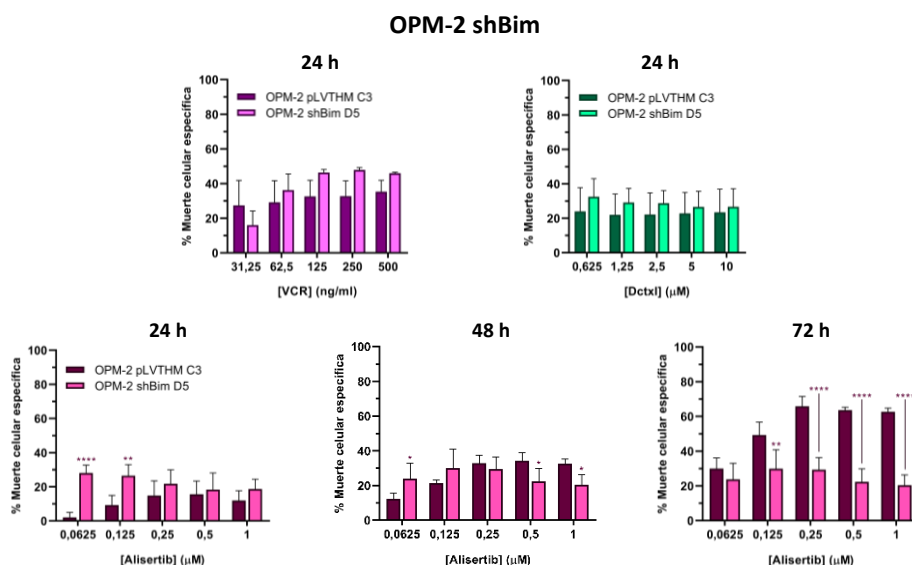


Figura 5.26 | Sensibilidad de células OPM-2 deficientes en Bim a fármacos antimitóticos. Se sembraron entre $1 \cdot 10^5$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 pocillos y estas fueron incubadas con concentraciones crecientes de los compuestos señalados durante los tiempos indicados. A continuación, se determinó la muerte celular provocada por cada inhibidor mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-11$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de cada antimitótico en la línea shBim respecto a la línea control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

El conjunto de todos estos resultados apunta a que la participación de Bim en la muerte inducida por vincristina dependería de la línea celular, ya que en algunas líneas como las MM.1S, esta proteína “solo-BH3” parece contribuir en cierta medida a dicho fin. No obstante, diversos estudios coinciden con nuestra percepción general de que la toxicidad asociada a vincristina no depende mayoritariamente de Bim. Por ejemplo, un trabajo previo del grupo confirmó mediante el silenciamiento de esta proteína “solo-BH3” en células leucémicas que Bim no participaba en la muerte ocasionada por vincristina y que su depleción potenciaba la expresión de PUMA, pudiendo asumir esta proteína el rol pro-apoptótico cuando Bim está ausente [419]; sin embargo, Bik y Noxa no adoptarían este papel en este tipo de células dado que su silenciamiento no afectaba a la apoptosis inducida por vincristina [419]. La menor expresión de Bim en células de melanoma expuestas a vincristina y docetaxel y el hecho de que su silenciamiento no alterara la apoptosis inducida por los compuestos sugería que esta proteína no era esencial para su citotoxicidad [739]. Sin embargo, PUMA y Noxa aumentaban su expresión en respuesta a estos tratamientos, pero esto tampoco se relacionó con la sensibilidad de las células a los fármacos [739]. Resultados similares obtuvieron *Zhu et al.* posteriormente, pues al silenciar Bim y PUMA en células de melanoma encontraron que ambas proteínas “solo-BH3” no contribuyen al efecto citotóxico de vincristina, a pesar de que este fármaco impulsaba la expresión de PUMA [740].

La letalidad de docetaxel en el mieloma múltiple, en líneas generales, tampoco depende de Bim; en cambio, esta proteína sería importante para paclitaxel en las células A549, pues su aumento de expresión en células A549 que sobreexpresaban Bcl-2 mejoró la sensibilidad a este compuesto, y su baja expresión se asocia con resistencia a dicho compuesto [741]. En otros tipos de tumores se ha visto que la sensibilidad a taxanos depende de otras proteínas “solo-BH3”. Tal es el caso de las células de cáncer de mama, que se mostraron dependientes de Bad dado que paclitaxel disociaba los complejos Bcl-X_L:Bad y no fomentaba la generación de otros que incluyeran a Bad y Bcl-2 o Bcl-w [742], e *in vivo* los tumores que sobreexpresaban Bad respondían mejor a docetaxel [743]. En cambio, el silenciamiento o la inhibición farmacológica de Bid permitió deducir que esta proteína estaba detrás de la acción citotóxica de docetaxel y paclitaxel en algunas células de cáncer de próstata y de colon, respectivamente [561, 744]. Por otro lado, aunque PUMA y Noxa se han encontrado reguladas positivamente en células de melanoma tras exponerse a docetaxel, su silenciamiento individual o conjunto mediante siRNA no ha supuesto una disminución de la sensibilidad celular a docetaxel [738].

Finalmente, la implicación de las proteínas “solo-BH3” en el mecanismo de muerte activado por los inhibidores de Aurora quinasa no ha sido tan estudiada como en los fármacos anteriores. A pesar de ello, existen estudios que respaldan parte de nuestros resultados, pues la ausencia de Bim en células HeLa y de glioblastoma expuestas a MLN8054 y alisertib, respectivamente, protegía parcialmente frente a estos compuestos [745, 746]. Además, esta proteína pro-apoptótica también participaría en la apoptosis desencadenada por la combinación de inhibidores de Aurora quinasa y otros compuestos, como vorinostat (pan-inhibidor de histona deacetilasas) y tozasertib en células de CML [747], pero no cuando alisertib se combina con ABT-737, pues en este caso son necesarias Bid, PUMA y Noxa [729]. Por otro lado, el silenciamiento génico de PUMA permitió sugerir a *Sun et al.* que PUMA es esencial para la actividad antitumoral de tozasertib y ZM447439 en células de cáncer colorrectal y de ZM447439 también *in vivo* [726, 748].

Tomando una visión global de estos resultados, se puede decir que la mediación de Bim en la muerte inducida por los fármacos antimetabólicos depende del fármaco y la línea celular. Dado que la deficiencia de Bim no proporciona protección completa en ningún caso, esto sugiere que otras proteínas pro-apoptóticas de su misma clase como PUMA o Bad podrían intervenir en la muerte inducida por vincristina, docetaxel y alisertib. No obstante, esta hipótesis debe ser comprobada mediante experimentos análogos a los aquí realizados. Por otra parte, Bim podría desempeñar cierta función protectora en determinadas situaciones en las que la muerte provocada por los tres compuestos fue superior en las células que carecían de Bim que en las células control. Esta curiosa situación podría ser el resultado de descompensaciones producidas en la expresión y/o el interactoma de las proteínas de la familia Bcl-2 como consecuencia de los procesos de infección y/o selección o incluso de los tratamientos aplicados. Por tanto, convendría analizar

estos aspectos en estudios posteriores para obtener información que ayude a comprender mejor el mecanismo de acción de estos compuestos. En este sentido también sería recomendable llevar a cabo ensayos de este tipo en células que tengan silenciadas una o varias proteínas “solo-BH3”.

Análogamente a lo que se hizo con los miméticos BH3, y teniendo en cuenta que hay estudios que sugieren que los fármacos antimitóticos despliegan su actividad citotóxica gracias a la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis [526, 671, 749–751], se ha querido evaluar el papel de Bax y Bak y la implicación de dicha vía en la muerte inducida por alisertib, barasertib y los agentes anti-microtúbulos en células MM.1S deficientes en Bax, Bak y ambas.

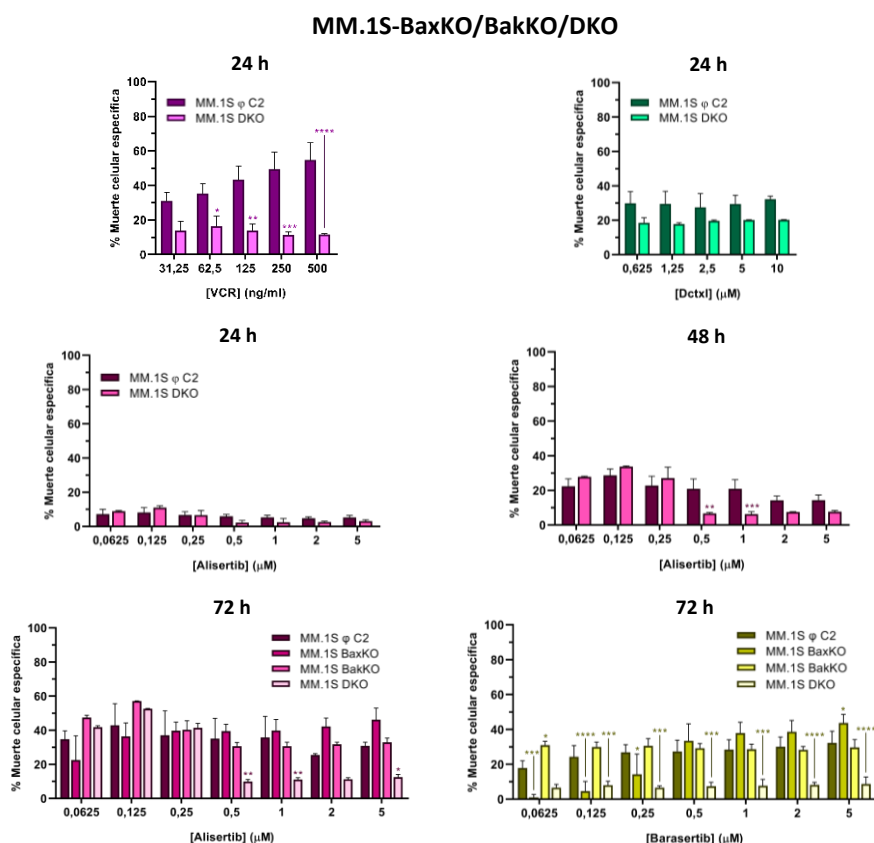


Figura 5.27 | Sensibilidad de células MM.1S deficientes en Bax, Bak o ambas a fármacos antimitóticos. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μl en placas de 48 pocillos y estas se trataron con concentraciones crecientes de los compuestos indicados durante los tiempos señalados. Seguidamente, se determinó la muerte celular provocada por cada inhibidor mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-4 experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el two-way ANOVA con el posterior análisis de Dunnett o Sidak, según conviniera, comparando cada concentración de cada antimitótico en las líneas KO y DKO respecto a la línea control. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Los resultados obtenidos en las células MM.1S modificadas (Fig. 5.27) revelan que la ausencia de Bax y Bak protege casi completamente frente a barasertib tras 72 horas de exposición, reduce de forma considerable la muerte inducida por vincristina y reduce levemente la ocasionada por docetaxel. En el caso de alisertib, se aprecia las células DKO son sensibles a dosis en el rango

62,5-250 nM, pero se encuentran altamente protegidas frente a dosis iguales o superiores a 500 nM, independientemente de la duración del tratamiento. Esto sugiere que alisertib desencadena distintos mecanismos de muerte en función de la dosis utilizada.

Por su parte, las células BaxKO y BakKO respondieron de forma distinta a tratamientos prolongados con alisertib y barasertib. Por un lado, las células carentes de Bak se mostraron más sensibles que las células BaxKO a dosis inferiores a 250 nM de alisertib, pero a dosis más altas fueron estas últimas las que experimentaron mayores niveles de mortalidad. Por último, el efecto citotóxico de barasertib en las células control y BakKO fue similar a dosis intermedias-elevadas y ligeramente mayor a dosis bajas en las BakKO, mientras que la toxicidad fue aumentando progresivamente con la dosis en las células BaxKO, pasando de ser inocuo a dosis bajas a provocar mayores niveles de muerte en estas células que en la línea control a dosis altas. Estos efectos quizá puedan deberse a la alta sensibilización de las células BaxKO de partida, de manera que este resultado podría verse alterado si los ensayos se realizaran con células MM.1S BaxKO con un bajo nivel de muerte basal, por lo que sería conveniente repetir estos ensayos cuando se cumplan dichas condiciones. No obstante, también es posible que los procesos de infección y/o selección, así como los tratamientos aplicados, hayan podido alterar el patrón de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y/o sus interacciones, modificando el destino de las células en función del tratamiento aplicado.

Curiosa y contrariamente a lo observado en las sublíneas MM.1S, un estudio previo del grupo reveló que la ausencia de Bax y Bak rebajaba moderadamente la toxicidad asociada a docetaxel en las células HCT-116 DKO, mientras que la protección frente a vincristina resultó más modesta [427]. Es posible que las diferencias detectadas entre ambos estudios se deban a los distintos tipos de células tumorales utilizadas en cada uno. Asimismo, estudios similares llevados a cabo por distintos autores defenderían que la actividad citotóxica de los taxanos y alcaloides de la vinca depende de Bax y/o Bak. Tal sería el caso de vincristina, vinblastina y paclitaxel, cuya actividad citotóxica se diluye en ausencia de Bax y Bak en células MEF, pero si está presente una de las dos proteínas, especialmente Bak, vinblastina conserva parte de su potencial citotóxico [561, 752, 753]. Sin embargo, en células de cáncer de ovario la supresión de Bak es suficiente para evitar la apoptosis inducida por paclitaxel, pero es necesario abolir Bax y Bak si este se combina con S63845 [754]. *Mhaidat et al.* sugieren que docetaxel también sigue la vía apoptótica intrínseca en modelos celulares de melanoma, donde la caspasa-2 activa provocaría cambios conformacionales en Bax y Bak, así como su activación, y promovería la localización mitocondrial de Bax [738]. En cambio, este compuesto no induce la activación de Bax ni de otros marcadores apoptóticos en células de cáncer de mama que sobreexpresan Bad y su toxicidad está ligada a la necroptosis [743]. Relacionando este último aspecto con nuestros resultados, parece factible que vincristina y docetaxel activen rutas mortales distintas a la apoptosis mitocondrial, dado que la eliminación

de Bax y Bak en células MM.1S no ha conseguido abolir al completo el potencial citotóxico de estos compuestos.

El nivel de implicación de las proteínas efectoras de la vía intrínseca de la apoptosis ha sido menos estudiado en el caso de los inhibidores de la familia Aurora. Aun así, *Li et al.* sugieren que la muerte provocada por ZM447439 en las células HCT-116 es absolutamente dependiente de Bax y Bak y ambas proteínas no tienen una función redundante, ya que tanto la supresión de ambas como de cada una por separado anula completamente el efecto citotóxico del inhibidor de Aurora B y mantiene el potencial mitocondrial en todos los casos [751]. Otro estudio evidenció que células de linfoma de Burkitt deficientes en Bax o en Bax y Bak de manera natural eran resistentes alisertib, ZM447439 y tozasertib [755]. Alisertib también se mostró menos letal en células de glioblastoma en las que se había silenciado Bak, al igual que su combinación con el taxano TPI 287 [746]. Finalmente, en el estudio del grupo mencionado en el párrafo anterior se observó que las células HCT-116 DKO eran menos sensibles a barasertib que las *wild-type* cuando se exponían al fármaco durante largos periodos de tiempo, pero si las células se lavaban, no se apreciaba apenas muerte en ninguna de las dos líneas celulares [427].

Una vez analizado el papel de las proteínas pro-apoptóticas clave de la ruta apoptótica intrínseca en el mecanismo de acción de los fármacos antimitóticos sobre células de mieloma múltiple, se pasó a determinar el efecto de la regulación positiva de Bcl-X_L y Mcl-1 en células RPMI 8226 en la respuesta a los agentes anti-microtúbulos y a los inhibidores de Aurora quinasa, ya que la abundante expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 se considera un factor de resistencia a los quimioterápicos, incluidos los fármacos antimitóticos [756, 757].

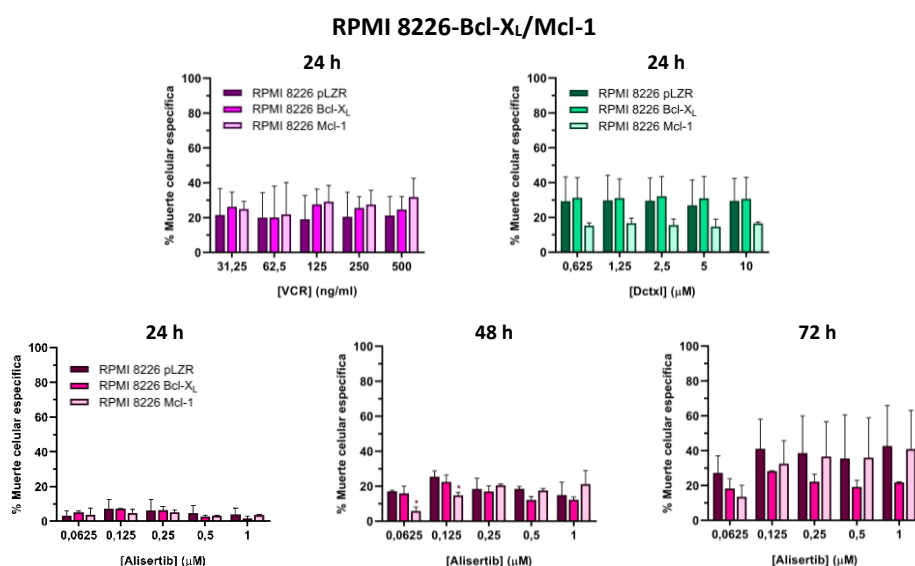


Figura 5.28 | Sensibilidad de células RPMI 8226 que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas a fármacos antimitóticos. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μl en placas de 24 pocillos, que fueron incubadas con concentraciones crecientes de los compuestos señalados durante los tiempos indicados. Finalizados los tratamientos, se determinó la muerte celular provocada por cada compuesto mediante marcaje

con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-3$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración de cada antimitótico en las líneas con mayor expresión de Bcl-X_L y Mcl-1 respecto a la línea control. * $p < 0,05$.

La Figura 5.28 muestra una respuesta heterogénea a los tratamientos. Por un lado, la sobreexpresión de Bcl-X_L o de Mcl-1 no protege frente a vincristina. Sin embargo, una mayor expresión de Mcl-1 reduce la muerte provocada por docetaxel, mientras que una mayor abundancia de Bcl-X_L no proporciona protección en este contexto. En el caso de alisertib, los altos niveles de ambas proteínas no afectan a la toxicidad inducida por este compuesto tras 24 horas. En contraposición, exposiciones de 48 y 72 horas evidencian una reducción parcial de la acción citotóxica del fármaco a dosis iguales o inferiores a 125 nM cuando Mcl-1 se sobreexpresa. Y en el caso de Bcl-X_L, los resultados sugieren que mayores niveles de esta proteína limitan parcialmente la muerte inducida por alisertib a las 72 horas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido a la elevada dispersión de los datos.

Numerosos estudios apuntan a que el nivel de expresión de las proteínas anti-apoptóticas es determinante para la actividad antitumoral de los agentes anti-microtúbulos. Se ha visto que la regulación positiva de Bcl-X_L implica resistencia a paclitaxel en el cáncer de mama, de próstata y de ovario [734, 749, 758], y a vinblastina y vincristina en células tumorales humanas y de ratón, respectivamente [735, 753, 759]. Una elevada expresión de Mcl-1 se opone a la acción citotóxica de docetaxel en el cáncer de próstata y el carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal [736, 760], de taxol en células HeLa [723] y de vinblastina en la AML [737]. No obstante, si ambas proteínas se suprimen génica o farmacológicamente, se consigue restaurar la toxicidad de los compuestos [734, 737, 758, 760]. Con respecto a Bcl-2, existe cierta controversia acerca de su papel en la resistencia a los agentes anti-microtúbulos, pues algunos estudios indican que su sobreexpresión protege a células leucémicas, de melanoma y de cáncer de mama frente a vincristina, docetaxel y paclitaxel, respectivamente [738, 749, 761], mientras que en otros, a través de la sobreexpresión o el silenciamiento de Bcl-2, se llegó a la conclusión de que la expresión de esta proteína era necesaria para que paclitaxel, docetaxel, vincristina y vinflunina desplegaran su actividad antitumoral *in vitro* en células de cáncer de ovario, de pulmón de células no pequeñas y de mama [762–765].

En el caso de alisertib, según nuestros datos, la mayor expresión de Bcl-X_L es la que protege mayoritariamente frente a este compuesto en las células RPMI 8226 al prolongar el tratamiento. Sin embargo, en el caso de las células MM.1S el aumento de Mcl-1 observado tras el tratamiento con alisertib a dosis altas (apartado 5.2.4) podría ralentizar su acción citotóxica. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la resistencia a alisertib en el mieloma depende de distintas proteínas anti-apoptóticas en función de la línea celular e, incluso, de la dosis utilizada. *Li et al.* también

encontraron que Bcl-X_L era un factor de resistencia a alisertib y danusertib en las células HCT-116, ya que, con su silenciamiento, pero no con el de otras proteínas anti-apoptóticas, se conseguía inducir apoptosis tras 24 horas de tratamiento; además, la combinación de ABT-737 con dichos inhibidores resultó eficaz [729]. Por otro lado, *Gabrielli et al.* vieron que las células HeLa que sobreexpresaban Mcl-1 se encontraban más protegidas frente a alisertib que aquellas con altos niveles de Bcl-2 [723]. Esto sugiere, por tanto, que la proteína anti-apoptótica que se opone a la acción antitumoral de alisertib también varía en función del tipo de cáncer evaluado. Por su parte, *Kollareddy et al.*, a través del silenciamiento de Bcl-X_L, descubrieron que esta proteína sustentaba la resistencia a CYC116 (inhibidor de Aurora A) en clones de células HCT-116 resistentes a este compuesto, pero si esta proteína era neutralizada con navitoclax se conseguía restaurar la apoptosis en algunas ocasiones. Además, dado que estas células también se mostraron resistentes a MLN8054, barasertib y VX-680, los autores propusieron que la sobreexpresión de Bcl-X_L podría estar detrás de este efecto [733].

En vista de los datos contradictorios que se tienen acerca de la implicación de Bcl-2 en la muerte inducida por los agentes anti-microtúbulos, sería interesante conocer qué sucede en las células de mieloma múltiple cuando se sobreexpresa Bcl-2 y estas se exponen a dichos agentes, así como a inhibidores de Aurora quinasa. Asimismo, estudios simultáneos a los realizados que evalúen la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y las interacciones que establecen entre sí en presencia de los fármacos antimitóticos proporcionarían información valiosa que permitiría comprender mejor el mecanismo de acción de los fármacos evaluados.

5.2.6. Alisertib como inductor de autofagia en células de mieloma múltiple

Puesto que los resultados presentados en la sección 4.3 evidencian que los inhibidores de Aurora quinasa activan la ruta autofágica en células de tumores sólidos, se quiso averiguar si alisertib también mostraba esta capacidad en células de mieloma múltiple, actuando sobre ellas durante 24 horas.

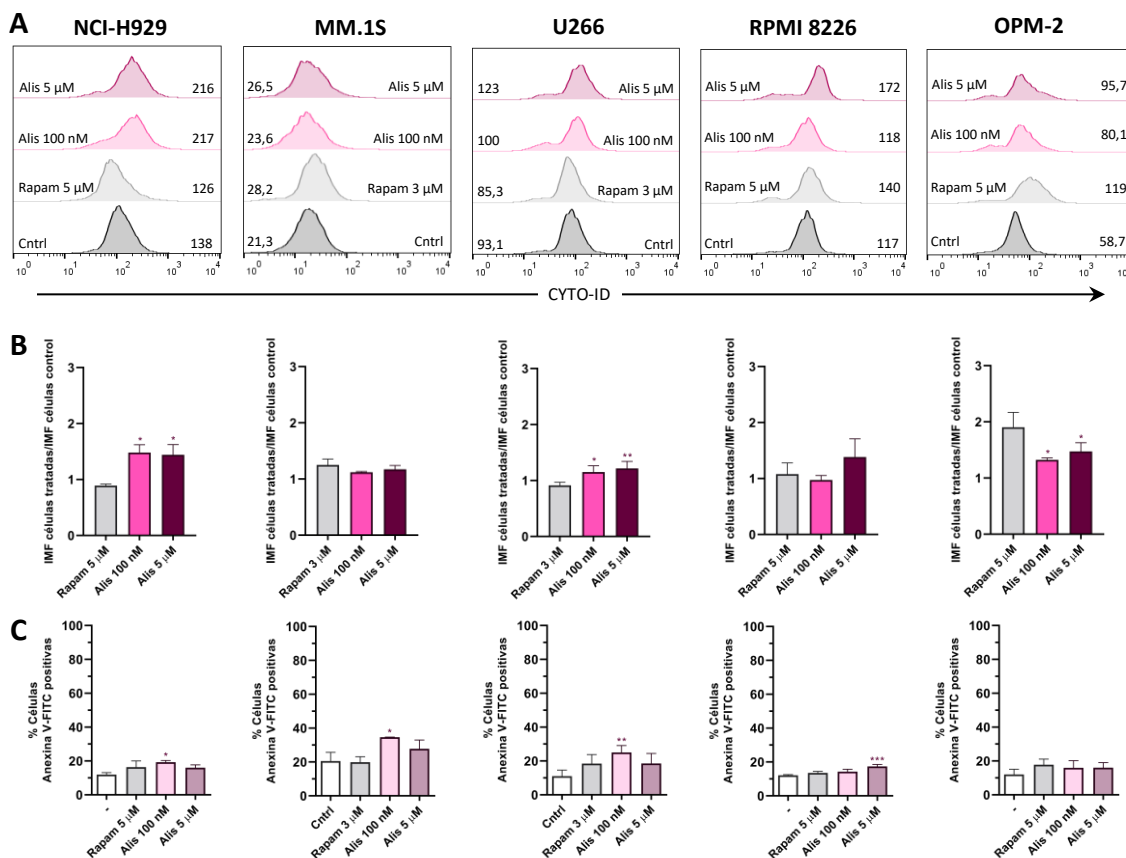


Figura 5.29 | Efecto de alisertib sobre la vía autofágica en células de mieloma múltiple.

Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y estas fueron tratadas con rapamicina (control positivo) y alisertib a las dosis señaladas durante 24 horas. A continuación, se determinaron el flujo autofágico (A y B) y la muerte inducida por cada compuesto (C) por citometría de flujo mediante el kit comercial CYTO-ID® y marcaje con Annexina V-FITC, respectivamente. Los histogramas son representativos de al menos dos experimentos independientes, y en ellos se indica la intensidad media de fluorescencia para cada tratamiento. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-4 experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración del compuesto con respecto a rapamicina o a las células sin tratar. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la señal fluorescente derivada del marcaje con CYTO-ID apenas varía después de 24 horas de tratamiento con rapamicina y ambas dosis de alisertib respecto a la emitida por las células sin tratar (Figs. 5.29A y B) y, de nuevo, evidencian la escasa toxicidad de alisertib a corto plazo (Fig. 5.29C) y. Esto indica que, por lo general, alisertib no es un inductor de autofagia en las células de mieloma, aunque la señal emitida en respuesta a determinados tratamientos sugiere que la autofagia se activa a niveles muy discretos.

Dado que, al igual que sucedía en los experimentos mostrados en el apartado 5.1.4, rapamicina no ha demostrado poder inductor de autofagia alguno salvo en el caso de las células OPM-2, sería conveniente aplicar los cambios propuestos entonces para conseguir un adecuado control positivo. Además, en algunos histogramas, como pueden ser los correspondientes a las células U266 o RPMI 8226, también es posible distinguir un pequeño pico o meseta a la izquierda

de la señal principal tras el tratamiento con alisertib, que correspondería a una pequeña subpoblación que presenta menor marcaje y, probablemente, no es viable.

En tumores sanguíneos, el estudio de la relación entre la autofagia y la inhibición de la familia Aurora se ha centrado en la leucemia. De hecho, se ha descrito que tanto alisertib como inhibidores de Aurora B (ZM447439) y pan-inhibidores (VX-680 y danusertib) inducen autofagia en células de distintos tipos de leucemia, incluidas la ALL, la AML y la CML [500, 766–769]. No obstante, el análisis de tejido tumoral procedente de ratones con un linfoma primario de células T reveló que VX-680 también provoca autofagia en otro tipo de neoplasias hematológicas y, además, lo hace *in vivo* [770]. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que la capacidad de alisertib de inducir autofagia en el mieloma múltiple en las condiciones ensayadas dependería de la línea celular de estudio, siendo más proclives a ello las células NCI-H929 y las U266, y las RPMI 8226 solamente a dosis altas del fármaco, aunque en todos estos casos el nivel de autofagia inducido sería bastante austero.

En cuanto al mecanismo que conduce a la activación de la ruta autofágica en los cánceres hematológicos, *Shu et al.* propusieron que la activación de la autofagia en células de CML a causa de alisertib se debía a la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR [769]. *Fu et al.* también concluyeron que esta vía se desactivaba en células de ALL como consecuencia del tratamiento con alisertib, pero que también se activaba AMPK [500]. En el caso de danusertib, *He et al.* han propuesto que la inhibición de Aurora A y B en células de leucemia inhibe el eje AURKB/p70S6K/RPL15 y las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y p38 MAPK, pero activa la vía de AMPK, lo que termina desencadenando la apoptosis y la autofagia [768]. Además, se ha visto que reversina, un potente inhibidor específico de la familia Aurora, Mps1 y JNK, es capaz de modular 25 de 84 genes relacionados con la autofagia, entre ellos *BCL2*, *ULK1*, *ATG10* y *MAP1LC3B* en células de ALL, lo que sugiere que esta molécula inicia la autofagia y la mantiene activa en estas células [767]. En el presente estudio no se ha llegado a abordar esta cuestión, pero en aquellos casos en los que los niveles de autofagia se incrementan sutilmente, podría resultar interesante indagar en los mecanismos moleculares que provocan esa ligera activación. Además, dado que los inhibidores de Aurora quinasa modifican el perfil de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 a largo plazo, estaría bien comprobar si esto sucede también a tiempos menores y determinar si la presencia de los compuestos altera las conexiones que estas proteínas establecen con la ruta autofágica.

5.2.7. Inhibidores de Aurora quinasa como inductores de senescencia

Como ya se ha comentado en la sección 5.2.2, la poderosa detención del ciclo celular en la fase G2/M como consecuencia de la acción de alisertib y la observación por microscopía de fluorescencia de células gigantes multinucleadas podrían estar indicando que parte de las células llevan a cabo el deslizamiento mitótico y conseguirían alcanzar el estado de senescencia, como ocurría en los tumores sólidos [418, 426]. Por lo tanto, para comprobar si la entrada en senescencia es una respuesta a los inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma múltiple, se realizó la medición de la actividad SA β -gal.

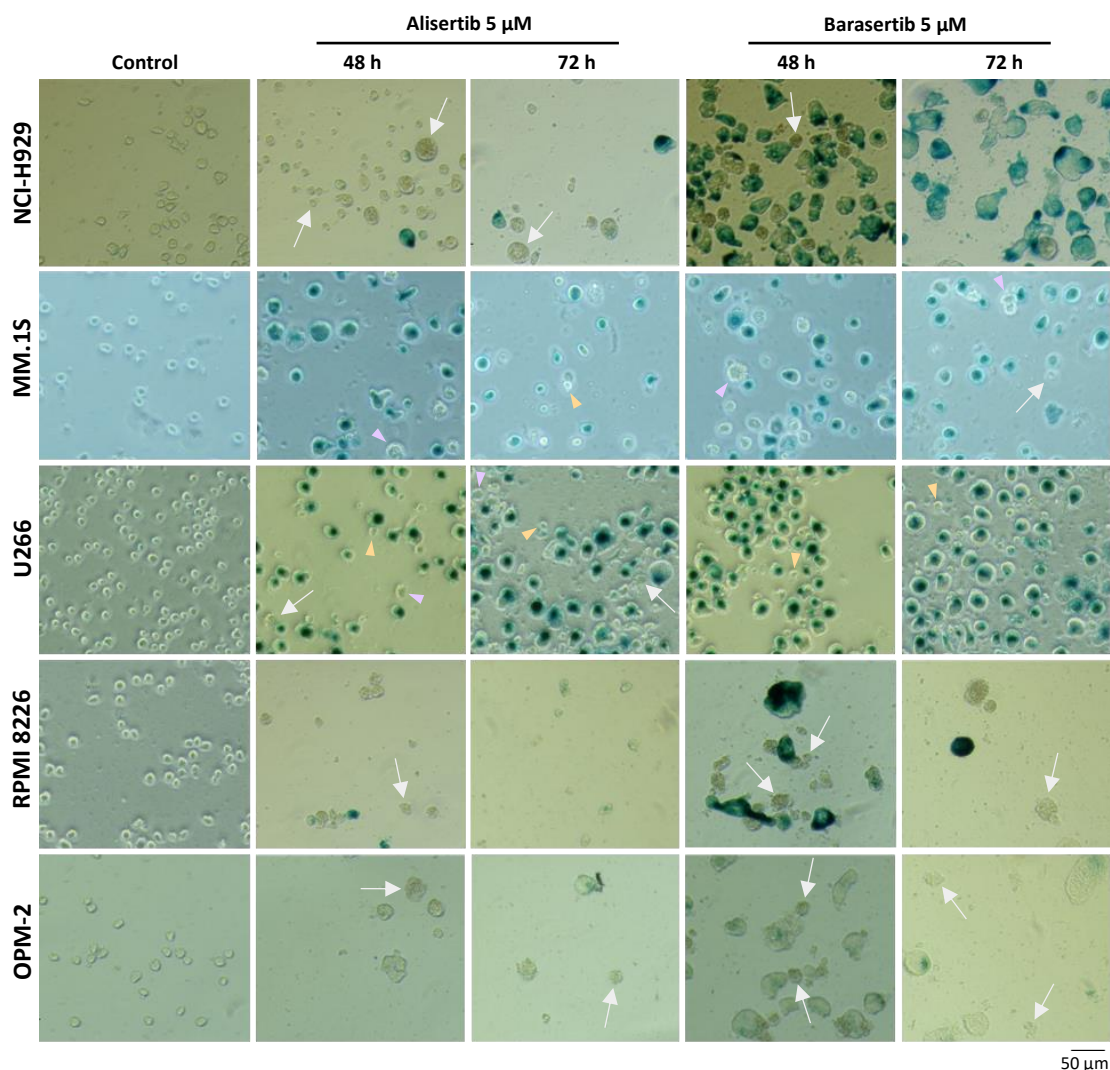


Figura 5.30 | Detección de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia en células de mieloma tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. De cada línea celular, se sembraron $1,5 \cdot 10^4$ células control y $1,5 \cdot 10^5$ células que fueron expuestas a alisertib y barasertib a una concentración final de 5 μ M durante 48 y 72 horas en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos. Seguidamente, el medio se sustituyó por 1 ml de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, se realizó la tinción con X-gal siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6 de Materiales y métodos. Por último, se tomaron imágenes de las células en el microscopio invertido pasadas 24 horas desde la tinción. Imágenes de microscopía invertida (x200) representativas de n=2-4 experimentos independientes. Las flechas blancas señalan células muertas, los triángulos naranjas indican células vivas en las fases G0/G1 o S y los triángulos lavanda apuntan a células que pueden encontrarse detenidas en mitosis o haber sufrido endoreduplicación.

Las imágenes de microscopía invertida (Fig. 5.30) denotan que alisertib y barasertib inducían importantes cambios a nivel morfológico. Concretamente, la inhibición de Aurora A y B provocaba un incremento del tamaño celular y la adopción de una morfología aberrante, dos observaciones que son compatibles con el deslizamiento mitótico y la entrada en senescencia. Esta teoría se confirmó al medir la actividad SA β -gal, pues las células control no presentaban dicha actividad, pero sí lo hacían las células expuestas a los inhibidores durante 48 y 72 horas, tal y como refleja la coloración azul. No obstante, la tinción en las células RPMI 8226 y OPM-2 ha sido mucho más débil que la detectada en el resto de líneas celulares, indicativo de que el potencial senescente de estos fármacos en estas líneas celulares es menor que en las demás, posiblemente debido a la elevada toxicidad de los fármacos en estas células. De hecho, en las imágenes correspondientes se pueden observar células muertas, al igual que en el resto de líneas celulares (flechas blancas), lo que es coherente con los resultados de citotoxicidad expuestos en el apartado 5.2.1. Además, resulta llamativo el escaso número de células detectadas en las imágenes correspondientes a las NCI-H929 tratadas con alisertib y en las RPMI 8226 y OPM-2 expuestas a ambos inhibidores en comparación con el resto de escenarios. Esto puede estar relacionado con el efecto citotóxico de los compuestos y al hecho de que el proceso de tinción afecte a la viabilidad y/o integridad de las células, y que estas se pierdan durante el proceso. Por otro lado, también es posible identificar células brillantes no teñidas que están vivas en las células MM.1S y U266, que podrían corresponder a la población celular que se encuentra en las fases G0/G1 y S del ciclo celular (triángulos naranjas) o a células que se encuentran detenidas en mitosis o han sufrido endorreduplicación, en cuyo caso aumentan de tamaño (triángulos lavanda).

Puesto que en las células MM.1S DKO la muerte detectada con dosis elevadas de ambos inhibidores es muy baja, quisimos extender el ensayo de medición de la actividad SA β -gal a estas células y su línea control para determinar si la inhibición de Aurora A y B culminaba en estas células con la entrada en senescencia.

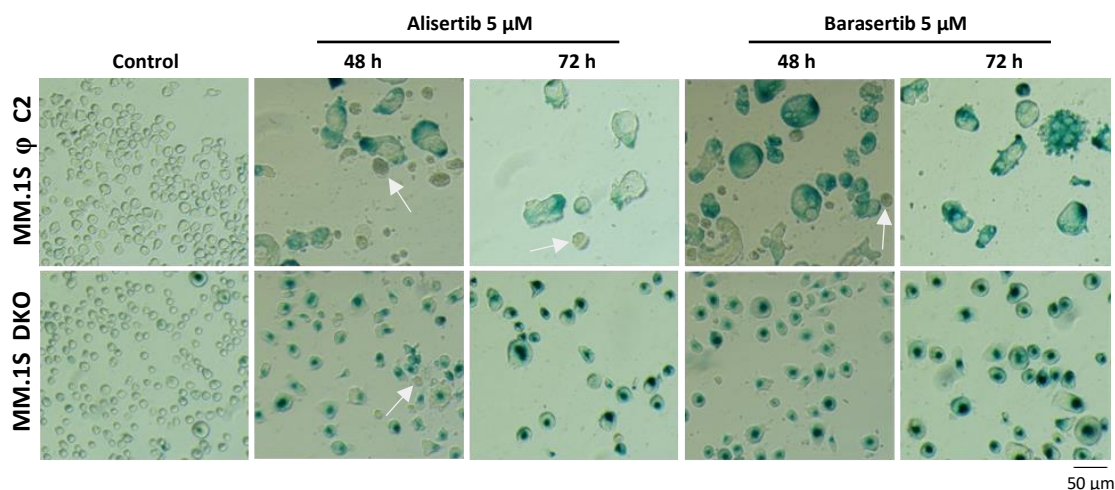


Figura 5.31 | Detección de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia en células MM.1S modificadas sometidas a los inhibidores de Aurora quinasa. De cada línea celular, se sembraron $1,5 \cdot 10^4$ células control y $1,5 \cdot 10^5$ células que fueron tratadas con alisertib y barasertib a una concentración final de $5 \mu\text{M}$ durante 48 y 72 horas en $500 \mu\text{l}$ en placas de 48 pocillos. A continuación, el medio se sustituyó por 1 ml de medio fresco y, tras cinco días en cultivo, se llevó a cabo la tinción con X-gal según se indica en el apartado 3.6 de Materiales y métodos. Por último, se tomaron imágenes de las células en el microscopio invertido 24 horas después de la tinción. Imágenes de microscopía invertida (x200) representativas de dos experimentos independientes. Las flechas blancas señalan células muertas.

Al igual que sucedía en las células *wild-type*, la Figura 5.31 muestra el aumento del tamaño celular y la adopción de morfologías aberrantes cuando las células MM.1S modificadas se exponían a los compuestos, mientras que las células no tratadas se mantenían en buen estado y creciendo de manera exponencial. La medición de la actividad SA β -gal revela una profusa coloración azul con todos los tratamientos, y en el caso de las células MM.1S DKO no tratadas también se observa alguna célula teñida, posiblemente debido a que es habitual que en los cultivos celulares exista un porcentaje detectable de células senescentes. En esta ocasión, no se observan células vivas sin coloración en ninguna línea y solamente es posible identificar alguna célula muerta (flechas blancas) con ambos compuestos, especialmente en las células MM.1S ϕ C2, una observación esperable dado que, como se ha expuesto en el apartado 5.2.5, el potencial citotóxico de barasertib y el de alisertib a dosis altas es mayor en las células control de infección que en las DKO.

En conclusión, una proporción variable de células de mieloma se mantienen vivas, activas metabólicamente y modifican su tamaño y morfología habituales, pero pierden su potencial proliferativo, generalmente de manera estable e irreversible. Teniendo en cuenta esto, se puede afirmar que una subpoblación de células de mieloma *wild-type* entra en un estado de senescencia ante la inhibición de Aurora A y B, mientras que otras no alcanzan dicho estado y otras se decantan por la muerte. Además, la generación de células senescentes deficientes en Bax y Bak revela que la entrada en senescencia no depende de estas proteínas. Esta conclusión puede

contradecir en parte las observaciones de *Deng et al.*, quienes encontraron que inhibidores reversibles de los microtúbulos activaban el programa senescente en MEFs y células HCT-116 *wild-type* y deficientes en Bax y Bak, pero eran estas últimas las que mostraban mayor predisposición a ingresar en un estado senescente, desempeñando Bak un papel relevante en este aspecto [771]. Esto quizá podría deberse a que la ausencia de Bax y Bak confiere resistencia a la muerte celular y, por tanto, las células tienen mayor probabilidad de sobrevivir, por ejemplo, alcanzando un estado senescente.

Varios estudios recogidos en la literatura demuestran que la inducción de senescencia es un destino final recurrente cuando se inhiben las proteínas Aurora. Así lo confirman diversos autores, quienes han descrito la generación de células senescentes tras tratamientos sostenidos en el tiempo con alisertib y barasertib en diversos modelos preclínicos de tumores sólidos y sanguíneos, tanto *in vitro* como *in vivo* [395, 682, 772–776]. Igualmente, otros inhibidores de esta familia, como los inhibidores de Aurora A MLN8054 y AKI603, el inhibidor de Aurora B BI 811283 y los pan-inhibidores VX-680 y AMG 900 actúan como inductores de senescencia en células de cáncer colorrectal, de pulmón, de mama, glioblastoma y de CML, así como en modelos animales de cáncer colorrectal y de pulmón [483, 542, 777–779]. Además, se ha visto que la inhibición farmacológica de otras proteínas y complejos reguladores de la mitosis, incluidos APC/C, PLK1, CDK1, Mps1, CENP-E y Eg5 conduce a un estado senescente tanto a células tumorales como no tumorales [482, 692, 780–783].

Finalmente, algunos estudios han pretendido arrojar algo de luz acerca del mecanismo que conduce al estado senescente cuando los inhibidores de Aurora quinasa entran en acción, aunque los resultados son controvertidos. Algunos apuntan a la implicación de la vía p53/p21 debido a la regulación positiva de p53 y p21 en presencia de inhibidores como MLN8054, alisertib o barasertib [715, 774, 776, 779]; otros abogan únicamente por la intervención de p21, independiente de p53, en respuesta a AMG 900 y AIK603 y, en el caso del segundo inhibidor, la acumulación de ROS contribuiría a la entrada en senescencia [542, 777, 784]. Sin embargo, *Liu et al.* propusieron que la senescencia inducida por alisertib está mediada por la activación de la vía ATM/Chk2 en respuesta a daño en el DNA y, en consecuencia, la vía IKK β /NF- κ B se activa y se inicia el desarrollo del SASP, que estimula la respuesta inmune [772]. Análogamente, *Bertran-Alamillo et al.* sostienen que la inhibición farmacológica de Aurora B conduce a la inducción de senescencia asociada a la respuesta de daño en el DNA y NF- κ B media en el SASP [775]. No obstante, todos estos estudios fueron llevados a cabo en distintos modelos tumorales y con distintos compuestos, por lo que es posible que las diferencias en los mecanismos implicados estén relacionadas con estos factores.

Dado que las referencias actuales a la inducción de senescencia en el mieloma son muy escasas, convendría complementar los resultados aquí obtenidos con estudios en los que se aborde

el mecanismo molecular subyacente a la entrada en senescencia inducida por inhibidores de Aurora quinasa.

5.2.8. Papel de las caspasas y RIPK1 en la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa

Tradicionalmente, las caspasas y la muerte apoptótica han estado estrechamente ligadas, pues las vías extrínseca e intrínseca activan las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10), y estas a su vez activan las caspasas efectoras (3, 6 y 7) [85]. No obstante, factores apoptogénicos como AIF, EndoG y OMI/HtrA2 son liberados de la mitocondria al permeabilizarse su membrana externa y provocan la muerte celular sin involucrar a las caspasas a través de mecanismos todavía poco comprendidos [785]. Dejando a un lado la apoptosis, las investigaciones de los últimos años han sacado a la luz la vinculación de las caspasas con otros procesos y tipos de muerte celular, incluidos la autofagia (caspasas-2, -3, -6 y -8), el ciclo celular (caspasa-2), la necroptosis (caspasa-8) y la piroptosis (caspasas-1, -4, -5 y -11), e incluso les han otorgado a algunas una función citoprotectora (caspasas-2, -3, -8 y -10) [8, 85, 785, 786]. Sin embargo, dicha vinculación no implica necesariamente la participación de las caspasas en la ejecución de un determinado proceso. Por ejemplo, las caspasas asociadas con la piroptosis serían necesarias para su consecución, pero en el caso de la necroptosis, la caspasa-8 actuaría como un elemento inhibidor de este tipo de muerte [8]. Por tanto, la necroptosis, al igual que otros tipos de muerte celular regulados como la ferroptosis y partanatos, son independientes de caspasas [8].

Teniendo en cuenta la relevancia de las caspasas en distintos tipos de muerte celular y que, según nuestros resultados, alisertib y barasertib resultan tóxicos para células que no expresan Bim y cuando la vía apoptótica mitocondrial está completamente bloqueada, hemos querido averiguar si la muerte inducida por estos compuestos depende de las caspasas y si otras vías de muerte, concretamente la ruta apoptótica extrínseca y la necroptosis, se activan en respuesta a estos compuestos en el mieloma múltiple. Para ello, se utilizaron el pan-inhibidor de caspasas Z-VAD, los inhibidores específicos de caspasa-3 (Z-DEVD) y caspasa-8 (Z-IETD) y el inhibidor de RIPK1 (necrostatina-1), implicada en la necroptosis.

En primer lugar, se evaluó la implicación de la necroptosis y el papel de las caspasas a nivel general en la muerte ocasionada por alisertib y barasertib en células de mieloma *wild-type* y silenciadas en Bax y Bak.

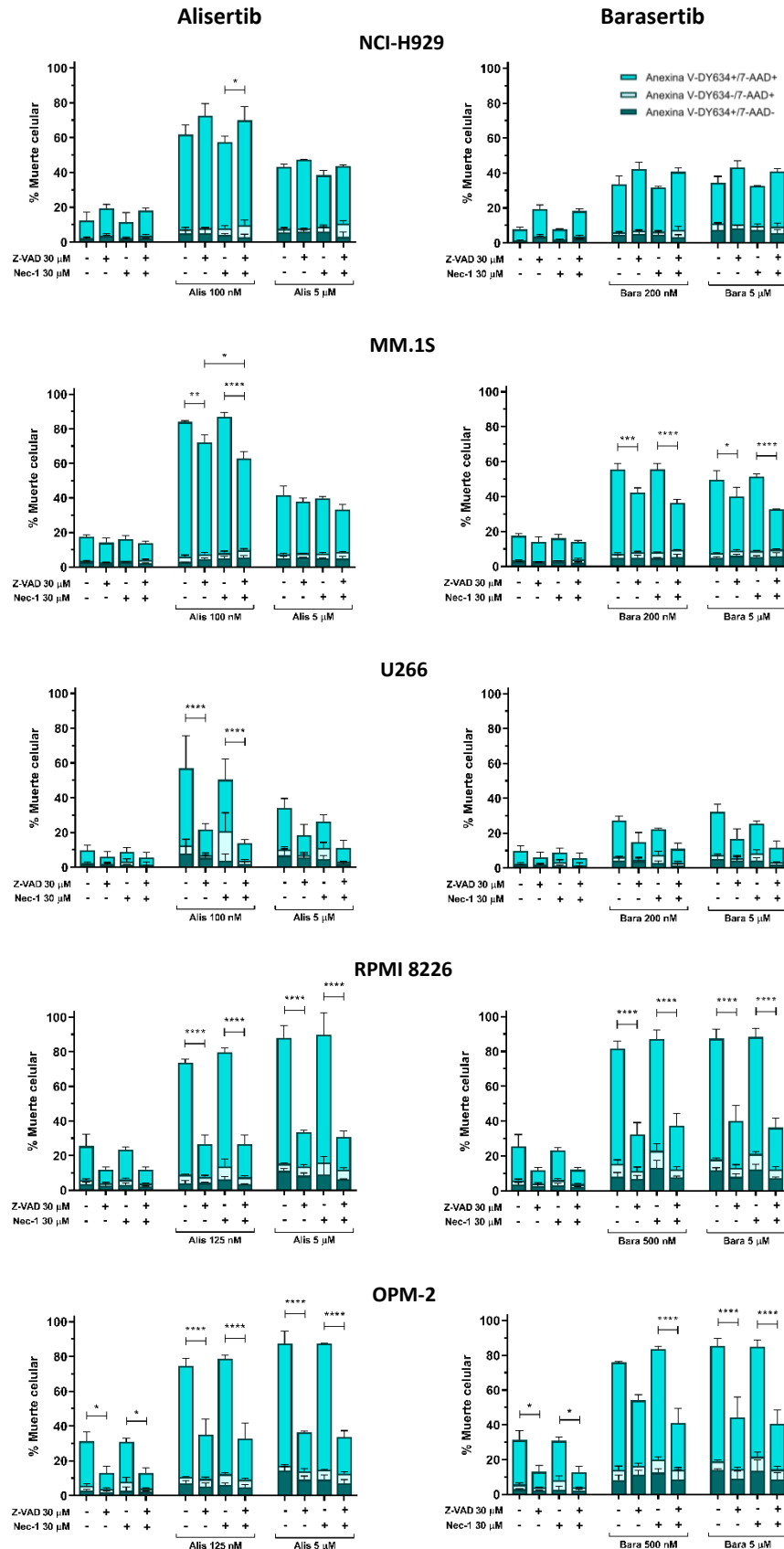


Figura 5.32 | Efecto de la inhibición de las caspasas y de la necroptosis en células de mieloma múltiple *wild-type* expuestas a alisertib y barasertib. De cada línea celular se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos, y estas se pre-incubaron con Z-VAD y/o necrostatina-1 a una concentración de 30 μ M durante al menos

una hora. Entonces, se adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas y estos se dejaron actuar durante 72 horas, renovando el pan-inhibidor de caspasas y la necrostatina-1 cada 24 horas. Finalizadas las incubaciones, se determinó la muerte desencadenada en cada línea por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-3$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey, comparando, para cada tratamiento, las células sin tratar con las tratadas con Z-VAD, y tanto estas últimas como las expuestas a necrostatina-1 con las tratadas con Z-VAD + necrostatina-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Las células RPMI 8226 y OPM-2 partían de un estado ligeramente sensibilizado, lo que podría explicar la mayor toxicidad que despliegan ambos inhibidores de Aurora quinasa en estos ensayos en comparación con la observada en las curvas dosis-respuesta del apartado 5.2.1. No obstante, la sensibilidad de las células NCI-H929 y U266 a los compuestos difiere levemente de la observada en dichos experimentos pese a encontrarse ambas en un buen estado basal. Estas variaciones podrían deberse, como se ha mencionado en otras ocasiones, al mantenimiento de los cultivos y al uso de distintos lotes de células en función del ensayo. Dejando de lado estas diferencias y poniendo el foco en el efecto del inhibidor de caspasas y de RIPK1, según la Figura 5.32 prima el doble marcaje con Anexina V y 7-AAD en todas las líneas celulares testadas y con todas las condiciones experimentales, siendo poco abundantes las poblaciones positivas solo para Anexina V o para 7-AAD. No obstante, resulta llamativo el incremento de la población de células U266 necróticas (7-AAD+) cuando alisertib a 100 nM se combina con necrostatina-1, comparado con el escaso porcentaje que representa esta población cuando las células se exponen únicamente a alisertib (20 % vs 5 %, aproximadamente). Esto sugiere que la inhibición simultánea de Aurora A y RIPK1 activa rutas de muerte alternativas que se manifiestan con un morfotipo necrótico solamente en esta línea celular.

Analizando el efecto producido por cada tratamiento, se observa que necrostatina-1 no afecta a la acción citotóxica de alisertib ni barasertib en ninguna línea celular excepto quizá en las células U266, aunque la diferencia no es significativa. Z-VAD, en cambio, ofrece por lo general una elevada protección frente a ambas dosis de alisertib y barasertib en las líneas U266, RPMI 8226 y OPM-2. En las MM.1S la letalidad de alisertib a dosis bajas y de ambas dosis de barasertib a es algo inferior cuando está presente el inhibidor de caspasas; sin embargo, este no afecta a la muerte inducida por dosis altas de alisertib. En cuanto a las células NCI-H929, estas responden a Z-VAD incrementando ligeramente la capacidad citotóxica de alisertib a dosis bajas y de barasertib a cualquier dosis, e incluso las células no tratadas se encuentran sutilmente más sensibilizadas en presencia de Z-VAD. Por último, la combinación de Z-VAD y el inhibidor de RIPK1 no consigue reducir los niveles de muerte más allá del efecto conseguido por Z-VAD en las células RPMI 8226 tratadas con ambos inhibidores y en las OPM-2 sometidas a ambas dosis de alisertib y a barasertib a 5 μ M. En cambio, sí se aprecia una pequeña disminución de la muerte

en comparación al efecto de Z-VAD en solitario cuando las células OPM-2 se exponen a dosis bajas de barasertib y en las células MM.1S y U266 tratadas con ambos inhibidores de Aurora quinasa. Por último, la combinación de Z-VAD y necrostatina-1 en las células NCI-H929 tiene el mismo efecto que Z-VAD.

Respecto a las células MM.1S modificadas, estas responden de forma diferente a la inhibición de las caspasas y de RIPK1 (Fig. 5.33). Las células MM.1S DKO muestran un perfil de respuesta más semejante al que exhiben las células MM.1S parentales, aunque la protección que experimentan estas células frente a alisertib es proporcionalmente mayor a la observada en las células *wild-type*. En el caso de barasertib, Z-VAD no protege, pero cuando se combina con necrostatina-1 se aprecia una leve disminución de la muerte inducida por el compuesto respecto a la acción única de Z-VAD. Por el contrario, Z-VAD solo o combinado con necrostatina-1 no protege a las células MM.1S ϕ C2 frente a alisertib ni barasertib, e incluso incrementa levemente la muerte basal y la que estos inducen. No obstante, en ambas líneas se observa que necrostatina-1 por sí sola no tiene ningún efecto sobre la muerte provocada por los fármacos. Probablemente las pequeñas diferencias observadas entre las células MM.1S modificadas y las parentales se deban a la influencia de factores intrínsecos a la metodología empleada para su obtención, como la infección y/o selección de los clones.

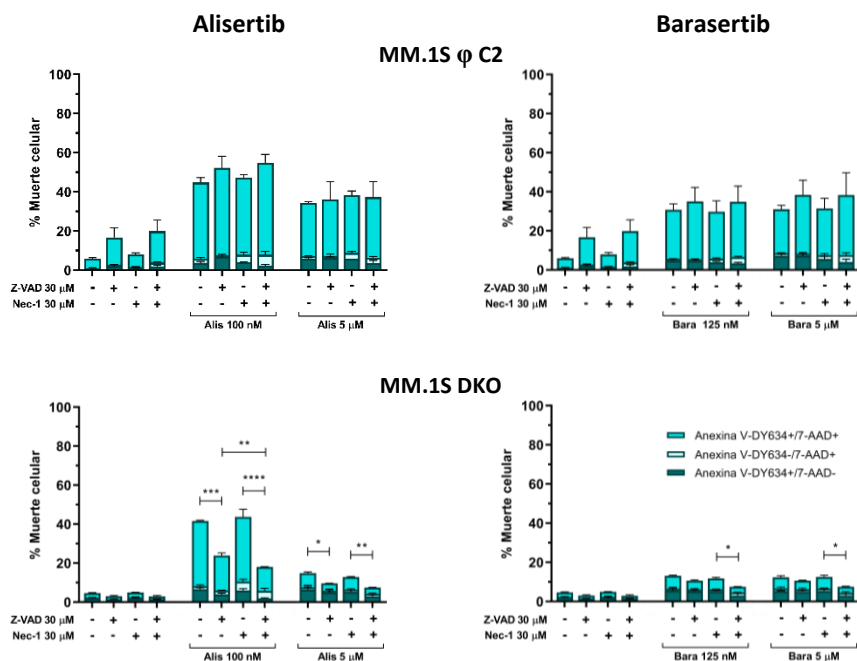


Figura 5.33 | Efecto de la inhibición de las caspasas y de la necroptosis en células de mieloma múltiple deficientes en Bax y Bak expuestas a alisertib y barasertib. Se sembraron entre $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos, y estas se pre-incubaron con Z-VAD y/o necrostatina-1 a una concentración de 30 μ M durante al menos una hora. Seguidamente, se adicionaron alisertib y barasertib a las dosis indicadas y estos se incubaron durante 72 horas, renovando el pan-inhibidor de caspasas y la necrostatina-1 cada 24 horas. Tras las incubaciones, se determinó la muerte inducida en cada línea por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-3$ experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey,

comparando, para cada tratamiento, las células sin tratar con las tratadas con Z-VAD, y tanto estas últimas como las expuestas a necrostatina-1 con las tratadas con Z-VAD + necrostatina-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Puesto que estos resultados sugieren una participación parcial de las caspasas en el mecanismo de muerte desencadenado por alisertib y barasertib en las células MM.1S parentales y todavía mayor en DKO, se estimó oportuno determinar el nivel de activación de la caspasa-3, considerada una de las principales caspasas ejecutoras de la apoptosis [787].

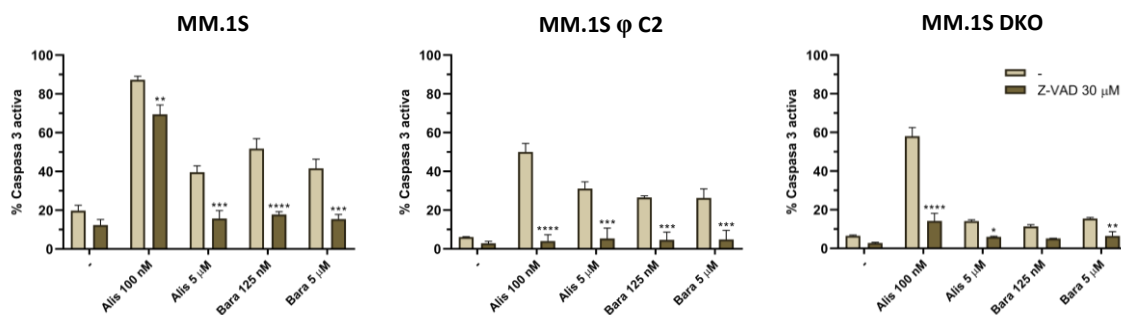


Figura 5.34 | Nivel de activación de caspasa 3 en células de mieloma múltiple deficientes en Bax y Bak tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron $3 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 1 ml en placas de 12 pocillos y estas fueron pre-tratadas con Z-VAD a una concentración de $30 \mu\text{M}$ durante al menos una hora. Tras este tiempo se incorporaron alisertib y barasertib a las dosis señaladas y estos se dejaron actuar durante 72 horas, renovando el pan-inhibidor de caspasas cada 24 horas. Concluidas las incubaciones, se determinó el nivel de activación de la caspasa-3 inducida por cada tratamiento en cada línea celular según el protocolo descrito en la sección 3.3 de Materiales y métodos. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-3$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico two-way ANOVA con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de los fármacos en presencia y ausencia de Z-VAD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para realizar un análisis completo de los datos expuestos en la Figura 5.34 es necesario acudir a los que se recogen en las Figuras 5.32 y 5.33, pues la muerte inducida por los compuestos y el nivel de activación de la caspasa-3 están estrechamente unidos. De hecho, los resultados indican que existe una alta correlación entre ambos parámetros en las tres líneas celulares, a pesar de que en las células MM.1S parentales se utilizaron dosis diferentes de barasertib en el rango nanomolar en ambos ensayos. No obstante, el efecto de Z-VAD sobre la activación de la caspasa-3 variaba en función del compuesto y la línea celular. Por un lado, los resultados de la Figura 5.34 indican que la concentración utilizada de Z-VAD no era suficiente para inhibir la activación de la caspasa-3 en las células MM.1S *wild-type* tratadas con alisertib a 100 nM , lo que sugiere que la muerte observada en presencia de dicho inhibidor (Fig. 5.32) podría deberse a una deficiente inhibición de las caspasas. En este sentido, hemos verificado que es preciso aumentar la concentración de Z-VAD para impedir en gran medida la activación de la caspasa-3 cuando las células se exponen a dosis bajas de alisertib, aunque la muerte inducida en este caso solo se inhibe parcialmente incluso con una concentración de Z-VAD de $100 \mu\text{M}$ (datos no mostrados). En

cambio, Z-VAD inhibía casi hasta niveles basales la activación de la caspasa-3 en las células MM.1S ϕ C2, DKO y *wild-type* cuando estas últimas se trataban con barasertib y dosis altas de alisertib, incluso en aquellas ocasiones en las que la muerte inducida no se inhibía o solo lo hacía parcialmente. Por lo tanto, todo esto en conjunto sugiere que la caspasa-3 no interviene en el mecanismo de muerte desencadenado por alisertib y barasertib en las células MM.1S y que dicho mecanismo es mayoritariamente independiente de caspasas.

La culminación de la apoptosis no depende exclusivamente de la caspasa-3, sino que existen otras caspasas ejecutoras que pueden llevar a cabo esta función, como la caspasa-7, la cual también es activada por las caspasas iniciadoras de las rutas extrínseca e intrínseca de la apoptosis [788]. Puesto que en las células MM.1S DKO la vía apoptótica mitocondrial no es funcional, pero estas se muestran sensibles a dosis bajas de alisertib y la inhibición general de caspasas mitiga en parte la acción citotóxica del fármaco, se decidió examinar el papel de la caspasa-8 en la muerte inducida por alisertib a 100 nM en estas células mediante su inhibidor específico (Z-IETD) con el fin de determinar si la ruta extrínseca de la apoptosis es la responsable del efecto citotóxico provocado por alisertib a dosis bajas. Además, se utilizaron también Z-VAD, necrostatina-1 y el inhibidor específico de caspasa-3 (Z-DEVD) para complementar los resultados obtenidos hasta ahora.

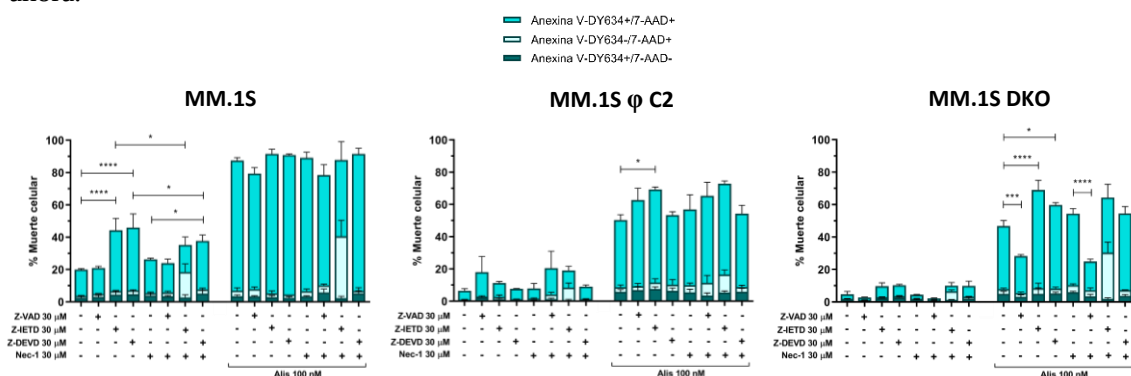


Figura 5.35 | Efecto de la inhibición de distintas caspasas y de la necroptosis en células de mieloma múltiple deficientes en Bax y Bak sometidas a alisertib. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos, y estas se pre-incubaron con Z-VAD, Z-IETD, Z-DEVD y/o necrostatina-1 a una concentración de 30 μ M durante al menos una hora. A continuación, se adicionó alisertib a la dosis indicada y este se dejó actuar durante 72 horas, renovando los inhibidores de caspasas y la necrostatina-1 cada 24 horas. Finalizadas las incubaciones, se determinó la muerte desencadenada en cada línea por cada tratamiento mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-4$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Tukey, comparando, para cada tratamiento, las células sin tratar con las tratadas con cada inhibidor de caspasas, y tanto este último grupo como las expuestas a necrostatina-1 con las tratadas con la combinación de los inhibidores de caspasas + necrostatina-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Atendiendo a la Figura 5.35, los niveles de muerte derivados de la acción de alisertib son equiparables a los detectados en los ensayos anteriores. De nuevo, el doble marcaje con Anexina

V y 7-AAD es el mayoritario con todas las condiciones experimentales a excepción de cuando las células, particularmente parentales y DKO, se exponen al inhibidor de la caspasa-8 y necrostatina-1, pues en estos casos, la población de células marcadas solamente con 7-AAD gana protagonismo en detrimento de las doblemente marcadas. Cabe resaltar que este incremento también se observa en las células tratadas únicamente con los inhibidores de caspasas y en las células MM.1S ϕ C2, aunque en ellas este ascenso es más discreto.

Como se ha descrito previamente en las células MM.1S *wild-type*, Z-VAD solo o combinado con necrostatina-1 despliega un efecto protector muy limitado a la concentración utilizada, mientras que necrostatina-1 por sí sola no protege de la acción de alisertib a 100 nM. Z-IETD y Z-DEVD, por su parte, sensibilizan notoriamente a las células en su estado basal, y tanto si actúan en solitario como en asociación con necrostatina-1, no protegen frente a la acción citotóxica de alisertib. En las células MM.1S ϕ C2, la muerte basal y la provocada por alisertib incrementan ligeramente en presencia de Z-VAD y Z-IETD, acompañados o no de necrostatina-1, mientras que este efecto no se detecta con Z-DEVD. Necrostatina-1 por sí sola tampoco afecta a la viabilidad basal ni a la acción citotóxica de alisertib, pero al combinarse con los inhibidores de las caspasas-8 y -3, predomina el efecto inducido por dichos inhibidores. Finalmente, las células MM.1S DKO quedan parcialmente protegidas por la acción de Z-VAD combinado o no con necrostatina-1, mientras que esta última por sí sola potenciaría de manera sutil la muerte inducida por alisertib. Con Z-IETD y Z-DEVD la sensibilidad de las células aumenta ligeramente a nivel basal en presencia y ausencia de necrostatina-1 y ambos inhibidores incrementan la muerte ocasionada por alisertib, sin que necrostatina-1 pueda neutralizar la muerte inducida.

Múltiples estudios llevados a cabo en distintos tipos celulares apuntan a que la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa, incluidos alisertib y barasertib, depende de la acción de las caspasas-9 y -3/7, aunque algunos también incluyen la caspasa-8 [395, 502, 525, 789–792]. Contrariamente, los resultados obtenidos en un estudio con el pan-inhibidor VE-465 en el glioblastoma multiforme desvinculan a las caspasas del mecanismo de acción de dicho compuesto [793]. Asimismo, la necroptosis también se ha hallado activada al bloquear Aurora A con CCT137690 en el cáncer pancreático [794]. Puesto que los resultados derivados del uso de los inhibidores de las caspasas-8 y -3 y de RIPK1 parecen descartar un papel de las mismas en la muerte inducida por alisertib a dosis bajas, pero Z-VAD sí protege parcialmente, sobre todo en las células DKO, todo esto apunta a la implicación de otras caspasas y a la activación de otros mecanismos de muerte, como podría ser la vía necroptótica independiente de RIPK1, aunque esta teoría debe ser comprobada.

Lamy et al. descubrieron que la caspasa-10 resulta vital para la supervivencia de las células de mieloma al modular la respuesta autofágica basal, un aspecto probablemente heredado de las células plasmáticas normales que ellas utilizan para mantener el equilibrio energético durante la

producción y secreción de inmunoglobulinas [795]. Una de las líneas celulares incluidas en dicho estudio y en la que se demostró esta función para la caspasa-10 fue la línea NCI-H929. Extrapolando estos resultados a nuestro estudio, es posible que Z-VAD esté perturbando la función pro-supervivencia de la caspasa-10 en dichas células y, en consecuencia, la muerte dependiente de autofagia se active, no solamente a nivel basal, sino también cuando se tratan con alisertib y barasertib y sin que necrostatina-1 pueda revertir esta sensibilidad, ya que su diana molecular no participa en la autofagia.

Si bien el mencionado estudio descartó un papel equivalente al de la caspasa-10 para la caspasa-8 en las líneas celulares testadas a pesar de su semejanza estructural y funcional, un trabajo anterior sí que asoció la inhibición de la caspasa-8 con la muerte celular dependiente de autofagia en células tumorales de ratón y humanas [795, 796]. Esto quizá podría suceder en las células MM.1S ϕ C2, pues tanto la inhibición selectiva de caspasa-8 como la inhibición general de caspasas incrementa sus niveles de muerte, tanto a nivel basal como en presencia de alisertib, independientemente de la inhibición de RIPK1. Puesto que el efecto de Z-IETD $\pm$ necrostatina-1 es el mismo en las células DKO, es posible que la caspasa-8 también ejerza su función protectora en estas células, y en el caso de las *wild-type*, esto sucedería solamente a nivel basal. Por otro lado, la inhibición exclusiva de la caspasa-3 sensibiliza a estas dos líneas a nivel basal y frente al tratamiento, esté necrostatina-1 o no presente, mientras que Z-VAD no afecta a las células MM.1S parentales y protege a las DKO de la acción de alisertib, combinado o no con necrostatina-1. Al igual que se ha descrito una función en pro de la supervivencia para las caspasas-8 y-10, bajos niveles de actividad de la caspasa-3 también pueden proteger de la muerte a células ligeramente estresadas promoviendo su supervivencia a través de las vías de mTOR y NF- κ B y evitando la amplificación de la actividad de las caspasas [797]. Las células MM.1S parentales se encontrarían en el límite en cuanto a lo que a sensibilización basal se refiere, pues sus niveles de mortalidad basal rondan el 20 %, así que es posible que en ellas la caspasa-3 presente cierto nivel de activación; en cambio, las células MM.1S DKO se encuentran en perfecto estado sin ningún tipo aparente de estrés, pero es posible que la inhibición de la caspasa-3 disturbe de una forma todavía desconocida su estado basal, y que este desequilibrio se mantenga en presencia de alisertib y/o necrostatina-1. No obstante, resulta curioso que la mayor sensibilización al bloquear las caspasas-3 y -8 en estas células no se detecte al tratarlas con Z-VAD, ya que estas caspasas también son dianas de este compuesto. Una posible explicación podría ser que el efecto anti-apoptótico derivado de la inhibición de otras caspasas impere sobre el efecto sensibilizador asociado a la inhibición de las caspasas-3 y -8 en estas líneas celulares. En cualquier caso, lo que parece evidente es que la muerte asociada a la inhibición específica de las caspasas en las células DKO no se produce a través de la vía mitocondrial.

Por otro lado, la caspasa-8 y RIPK1 son dos interlocutores comunes en distintos mecanismos regulados de muerte, incluidos la apoptosis y la necroptosis, que determinan el tipo de muerte desencadenado en respuesta a la activación de la vía de los receptores mortales [798]. RIPK1 es uno de los componentes del complejo I, que se induce tras el reconocimiento del ligando mortal por parte de su correspondiente receptor. Si esta molécula es ubiquitinada, las células sobreviven, mientras que si se encuentra desubiquitinada y RIPK3 no está presente o sus niveles son bajos, RIPK1 y TRADD se desligan del complejo I y forman el complejo II al reclutar a FADD y la caspasa-8, de manera que esta última se activa y algunos autores proponen que también procesaría a RIPK1/3, ejecutando así la ruta apoptótica extrínseca e inhibiendo la vía necroptótica [799]. En cambio, si la caspasa-8 está ausente o inhibida, RIPK1, RIPK3 y MLKL fosforilados constituyen el necrosoma, que conduce a la necroptosis [798, 799]. Por lo tanto, ambas vías de muerte suelen ser mutuamente excluyentes [799]. Recientemente, se ha descrito un incremento de los niveles de RIP y de la ratio de FADD fosforilado frente a no fosforilado en células de cáncer colorrectal tratadas con alisertib, lo que sugiere que este compuesto podría desencadenar la apoptosis mediada por la vía de receptores mortales [502]. Si esto sucediera en nuestro modelo tumoral, la inhibición de la caspasa-8 debería disminuir la muerte asociada a alisertib, pero esto no sucede en ningún caso. Además, si se inhibe conjuntamente RIPK1, sigue sin existir efecto protector e incluso la necrosis gana terreno a la apoptosis tardía en comparación a cuando solamente se inhibe la caspasa-8. Esto parece indicar que la inhibición dual conduce a las células MM.1S parentales y DKO en especial a una muerte de morfotipo necrótico mediante algún mecanismo alternativo y este efecto se acentuaría al adicionar alisertib. Dicho mecanismo podría ser la piroptosis, un tipo de muerte celular programada mediada por las caspasas inflamatorias y las gasderminas [8], pero se necesitan estudios adicionales para aceptar o refutar esta hipótesis. La vía clásica implica a la caspasa-1 y la gasdermina D, aunque esta última también puede ser activada por otra vía diferente a la canónica en la que intervienen las caspasas-4, -5 y -11 [800]. No obstante, la piroptosis inducida por quimioterápicos se ha relacionado con el procesamiento de la gasdermina E mediado por la caspasa-3, aunque también se ha reportado que esta gasdermina puede ser activada por la granzima B [800, 801]. Si bien estas gasderminas han sido las más estudiadas, también se ha reportado que la granzima A activaría a la gasdermina B y que la caspasa-8 activada por el TNF γ mediaría en la activación de la gasdermina C [800]. En el mieloma son pocas las referencias que existen hacia este tipo de muerte. Por un lado, un estudio *in vitro* ha demostrado que inhibidores del proteasoma inducen piroptosis a través de Bax y gasdermina E [802], mientras que en otro deducen que cloroquina promueve la piroptosis mediada por gasdermina E a través de la mitocondria al inducir los genes *IFIT1* e *IFIT3* tanto en células de mieloma como de AML [803]. Un tercer trabajo ha propuesto la activación de la piroptosis mediada por gasdermina D en líneas celulares de mieloma en respuesta a un compuesto que impide la transcripción de *Myc* al estabilizar una estructura terciaria del DNA rica en guanina (“G-quadruplex”, G4) localizada en

su promotor [804]. Por otro lado, un trabajo ha señalado que la gasdermina B se sobreexpresa en pacientes de mieloma y otro ha revelado que la expresión de la gasdermina E en pacientes es menor en comparación con sujetos sanos [805, 806].

Por otro lado, se ha descrito que Aurora B puede fosforilar e inactivar la caspasa-2 en el residuo Ser384 durante una mitosis normal, pero la reducción de la actividad de dicha quinasa permite la defosforilación y activación de esta caspasa, lo que puede conducir a un arresto mitótico mediante el procesamiento de MDM2 y la estabilización de p53, o a la muerte celular a través de la rotura de Bid y la activación de la vía apoptótica mitocondrial [807]. Otro estudio también detectó la activación de la caspasa-2 pero no de la caspasa-8 en respuesta a alisertib y danusertib, y que esta proteolizaba a Bid *in vitro*; sin embargo, la cantidad de tBid producida no fue suficiente para neutralizar Bcl-X_L endógeno en algunas células tumorales de cáncer de colon [729]. No obstante, el mecanismo por el cual alisertib activa la caspasa-2 todavía se desconoce, ya que se ha propuesto que dicha activación puede ser dependiente o independiente del PIDDosoma [729]. Por otro lado, se ha descrito que las caspasas-2 y -8 pueden conducir a la muerte celular a través de un mecanismo independiente de Bax y Bak en células de cáncer de colon tratadas con resveratrol [808]. Teniendo estos estudios en cuenta y sabiendo que Z-VAD es un pan-inhibidor que inhibe las caspasas de la -1 a la -10 exceptuando la -2 [809], es posible que en nuestro modelo la caspasa-2 se esté activando por la acción de los antimitóticos y esté induciendo la muerte de las células sin que Z-VAD ni la ausencia de Bax y Bak puedan impedirlo.

5.2.9. Participación de las especies reactivas de oxígeno totales en la muerte desencadenada por los inhibidores de Aurora quinasa

Procesos elementales como la respiración mitocondrial, la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos y la actividad NADPH oxidasa generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproductos del metabolismo celular en condiciones fisiológicas [810, 811]. Estos incluyen el peróxido de hidrógeno, el radical anión superóxido y el radical hidroxilo altamente reactivo que, cuando sus niveles son bajos, actúan como segundos mensajeros en la señalización celular de numerosos procesos, como la supervivencia, la inflamación y la diferenciación celulares [810–812]. Por el contrario, si sus niveles rebasan la capacidad de defensa de los sistemas antioxidantes propios de las células, se produce estrés oxidativo, que puede ser transitorio o dañar irreversiblemente a los cuatro tipos de biomoléculas esenciales para la vida, lo que desembocaría en la muerte de las células [812]. No obstante, los ROS también se han asociado con otros eventos celulares, incluidos el ciclo celular y la senescencia [777, 810]. En cuanto al ciclo celular, los niveles de ROS varían, siendo necesarios unos niveles basales para que las células transiten de la fase G0 a G1 y de la G1 a la S, pero no existe un consenso acerca del estado redox durante la mitosis, pues hay estudios que apuntan a un mayor estrés oxidativo en esta fase y otros que

apuestan por su reducción [810, 813]. De hecho, todavía no se ha esclarecido la conexión entre la generación de ROS, el estado redox y la progresión hacia la mitosis, pero sí se ha descrito que la detención prolongada de la mitosis provocada por fármacos antimitóticos incrementa la producción de ROS [813]. Por otra parte, las células tumorales presentan un estado redox alterado, pues su producción de ROS y su capacidad antioxidante se encuentran aumentadas con respecto a las células normales, lo que puede hacerlas susceptibles a terapias que modifiquen dicho estado [814].

Tomando en consideración todo lo anterior, se decidió evaluar si las especies reactivas de oxígeno totales actuaban como agentes causales de la muerte suscitada por alisertib y barasertib en el mieloma múltiple. Para ello, se utilizó glutatión (GSH), un tripéptido ubicuo que contiene un grupo tiol y actúa como el principal mecanismo antioxidante en la mayoría de las células de mamíferos frente a ROS y los electrolitos [815].

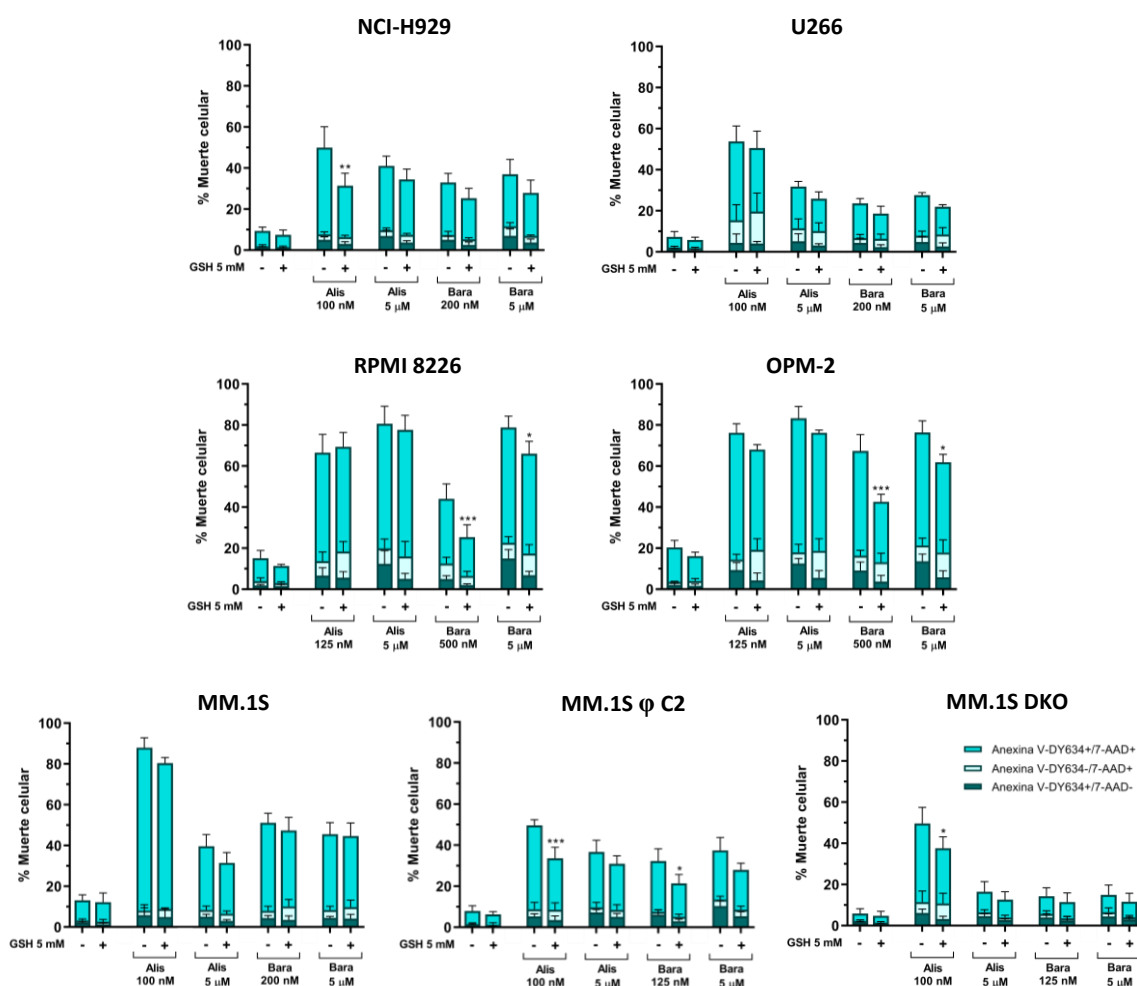


Figura 5.36 | Efecto de la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno totales en células de mieloma múltiple *wild-type* y deficientes en Bax y Bak expuestas a los inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos, y estas se pre-incubaron con glutatión a una concentración de 5 mM durante al menos media hora. Seguidamente, se adicionaron alisertib y barasertib a las dosis indicadas y estos se incubaron durante 72 horas. Tras este tiempo, se determinó la muerte inducida en cada línea por los tratamientos mediante marcaje

con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-4$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de los fármacos en presencia y ausencia de glutatión. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Las gráficas de la Figura 5.36 recogen un porcentaje elevado de células positivas para Anexina V y 7-AAD en todas las condiciones ensayadas. En cambio, la población necrótica habitualmente es despreciable cuando las células se tratan solo con los inhibidores de Aurora quinasa, exceptuando las células U266, en las que esta población representa en torno a un 10 % de la muerte inducida. No obstante, en algunas ocasiones la inclusión de GSH favorece la muerte necrótica. Tal es el caso de las células OPM-2 con ambas dosis de alisertib y la dosis alta de barasertib, y de las RPMI 8226 tratadas con la dosis baja de alisertib, donde este tipo de muerte pasaría de suponer, aproximadamente, el 5 % de la mortalidad registrada al 10-15 %. Contrariamente, en las células RPMI 8226 expuestas a 500 nM de barasertib y GSH, la población necrótica disminuye. Esta reducción podría deberse a la menor actividad citotóxica de este compuesto en presencia de glutatión en estas células, ya que también desciende el porcentaje de células apoptóticas y, especialmente, el de las doblemente marcadas. En cambio, el incremento de la población necrótica se produce independientemente de la capacidad de glutatión para inhibir parcialmente o no la muerte inducida por los fármacos. Esto sugiere que glutatión activaría mecanismos moleculares que, en ocasiones, suprimirían la apoptosis temprana y conducirían a las células a una muerte de tipo necrótico. Resultados similares se han descrito con otro antioxidante, N-acetilcisteína, cuando células pancreáticas acinares se exponen a TLC-S (sulfato ácido de taurolitocolato), ya que los niveles de ROS intracelulares y de apoptosis disminuyen, pero los de necrosis aumentan en su presencia [816]. Esto parece un poco contraintuitivo porque se ha descrito que los ROS pueden inducir muerte por necrosis o incluso por ferroptosis [817, 818]. Además, también se ha descrito que la depleción de glutatión en células leucémicas mediante exposiciones prolongadas a BSO, un compuesto que inhibe su síntesis al inhibir específicamente la γ -glutamylcisteina sintetasa, provoca un cambio en la muerte inducida por cisplatino y melfalán de apoptosis a necrosis [819]. En cambio, su depleción en células del epitelio pigmentario de la retina mediante distintos métodos, incluido el uso de BSO, induce muerte por ferroptosis [820]. Por lo tanto, se requieren más estudios que permitan explicar nuestras observaciones.

En cuanto al efecto del glutatión sobre la acción citotóxica de los inhibidores de Aurora quinasa, los resultados indican que este antioxidante reduce parcialmente la toxicidad de alisertib a 100 nM en las células NCI-H929, MM.1S ϕ C2 y MM.1S DKO (entre un 15 % y un 20 %) y de barasertib a 500 nM en las células RPMI 8226 y OPM-2 (entre un 20 % y un 25 %), lo que sugiere que la inhibición de los ROS totales protegería a estas células, al menos en parte, frente a la acción citotóxica de alisertib y barasertib a las dosis indicadas. En las células MM.1S, en cambio,

glutación no confiere protección frente a ningún compuesto al no producirse una reducción de la mortalidad, y en el resto de situaciones, incluidas las células MM.1S modificadas, la protección detectada es insignificante (entre un 5 % y un 10 %).

Varios autores han reportado que los inhibidores de Aurora quinasa incrementan la producción de ROS, lo que conlleva diferentes consecuencias en función del estudio. Algunos de ellos asocian el ascenso de los niveles de ROS derivado del tratamiento con alisertib con la activación de la autofagia y la vía intrínseca de la apoptosis en células de osteosarcoma [526]. Además de la mencionada vía apoptótica, los ROS también pueden activar la ruta extrínseca, mediar en la muerte dependiente o independiente de caspasas, e incluso inducir la apoptosis celular a través de la vía UPR, como se ha visto con TSC7010 (inhibidor de Aurora A) [811, 812, 821]. En células de cáncer de próstata se ha descrito que el estrés oxidativo ocasionado por barasertib es culpable, al menos en parte, de la inducción de poliploidía y de la muerte celular [812]. Además, los ROS se consideran uno de los principales inductores del estado senescente, por lo que no resulta extraño que células de CML entren en un estado de senescencia ante el incremento de las especies reactivas de oxígeno debido a la acción de alisertib y AKI603 [777, 822]. No obstante, se ha visto que esta mayor generación de especies reactivas de oxígeno se extiende a otros antimitóticos con capacidad de provocar el arresto mitótico, como inhibidores de PLK1 y agentes anti-microtúbulos [813]. Pese a todo, la excesiva producción de ROS y sus efectos asociados se han visto neutralizados, al menos parcialmente, por la acción de distintos antioxidantes, como piruvato, selenio, N-acetilcisteína y aminoguanidina [777, 810, 822–825].

En el presente estudio, aunque no se ha evaluado el nivel de estrés oxidativo celular en presencia de alisertib y barasertib, es cierto que la acción antioxidante de glutación ofrece cierta protección frente a la actividad citotóxica de alisertib a 100 nM en las células NCI-H929, MM.1S ϕ C2 y MM.1S DKO y de barasertib a la dosis de 500 nM en las células RPMI 8226 y OPM-2. Esto podría ser indicativo de que el estado redox de las células en estas situaciones se encuentra alterado. No obstante, dado que en todas las líneas celulares se induce muerte celular en presencia del antioxidante en mayor o menor medida, deducimos que los ROS totales no son la principal causa de muerte asociada a la acción citotóxica de los inhibidores de Aurora quinasa en las células de mieloma, aunque contribuiría a ella en las situaciones señaladas, sea o no funcional la ruta apoptótica mitocondrial. Esto invita a dilucidar la razón por la que glutación protege parcialmente en algunas ocasiones y en otras, no. En este sentido, quizá pueda ser de utilidad conocer los niveles basales de estrés oxidativo de las células utilizadas y determinar si los tratamientos alteran o no dichos niveles. Además, estos experimentos complementarían los resultados aquí obtenidos y permitiría extraer conclusiones más fehacientes en cuanto al papel del estrés oxidativo a nivel global en la actividad anti-mieloma de los inhibidores de Aurora quinasa.

5.2.10. Papel de la mitocondria en el mecanismo de acción de inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma múltiple

Durante décadas Aurora A ha sido considerada una quinasa mitótica cuya localización se reducía a los centrosomas y el huso mitótico y su función quedaba limitada a la estabilización de los centrosomas y del huso mitótico y a asegurar la adecuada segregación cromosómica [826]. Sin embargo, diversas técnicas novedosas de microscopía han sacado a la luz funciones y localizaciones subcelulares de esta quinasa hasta ahora desconocidas, tanto en células especializadas no transformadas como en células tumorales [826]. En ambos tipos celulares existe un grupo de proteínas Aurora A que se expresan durante la interfase y se localizan en las mitocondrias y, aunque varios estudios apuntan a su intervención en la regulación de la morfología y dinámica de estos orgánulos, sus funciones en ambos tipos celulares difieren considerablemente [194, 826–828]. En lo que respecta al contexto tumoral, esta proteína actúa como factor de transcripción, favorece la reparación del DNA, controla la estabilidad del citoesqueleto, activa el programa senescente, estimula la migración y la invasión celulares, y cuando se sobreexpresa altera la producción de ATP y la dinámica mitocondrial al fomentar la fusión de las mitocondrias durante la interfase y su fisión en la mitosis [826].

Pese a la similitud estructural y funcional de Aurora A y B, no se tiene constancia de que esta última se localice fuera de los cinetocoros y de la placa ecuatorial [156, 826]. No obstante, algunos estudios han demostrado cierta conexión entre Aurora B y las mitocondrias, pues en las neuronas del hipocampo actúa como regulador negativo del tráfico mitocondrial, y en células de distintos tipos de cáncer su bloqueo eleva la producción de ROS y el número de copias de DNA mitocondrial, aumentando la actividad metabólica en células de cáncer de próstata [812, 829].

Por lo tanto, en vista de la estrecha relación existente entre las mitocondrias y Aurora A se decidió estudiar más en detalle cómo afectan los inhibidores de Aurora quinasa a dichos orgánulos en el mieloma. En concreto, se evaluaron la salida del citocromo c y posibles variaciones en el potencial de membrana mitocondrial, la masa mitocondrial y la generación de ROS mitocondriales en respuesta a exposiciones prolongadas de alisertib y barasertib.

5.2.10.1. Alisertib y barasertib alteran el potencial transmembrana mitocondrial

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa una vez activada la ruta apoptótica intrínseca va acompañada de la disipación del potencial de membrana mitocondrial, un evento que contribuye al deterioro de la función de las mitocondrias [830]. Puesto que en la sección 5.2.1 quedó patente que tanto alisertib como barasertib promovían la apoptosis, especialmente si su acción se mantenía en el tiempo, se decidió complementar aquellos resultados

con el análisis del potencial mitocondrial tras exposiciones largas a dosis de cada compuesto en el rango nano- y micromolar en todas las líneas celulares *wild-type* de mieloma.

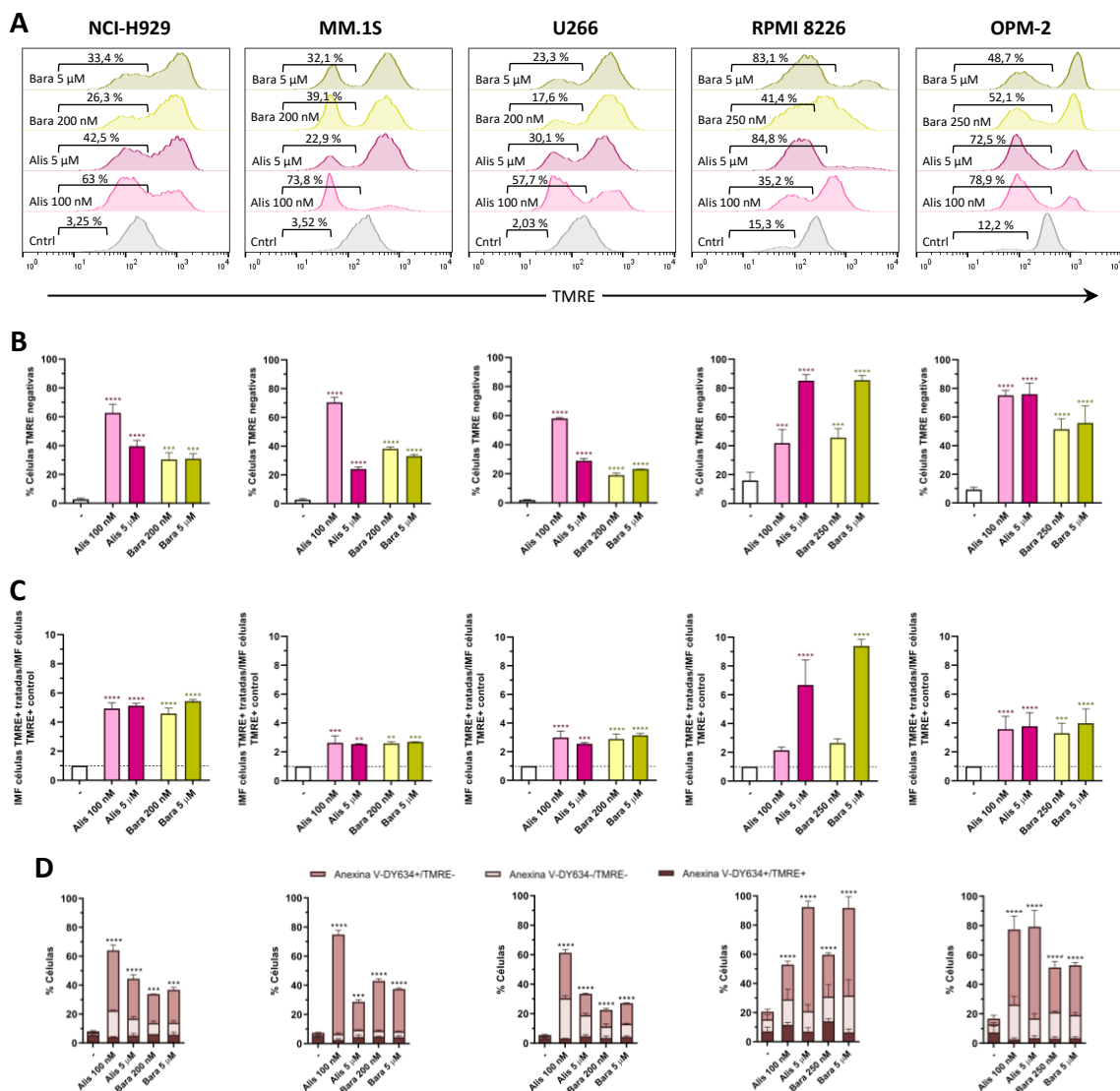


Figura 5.37 | Alteración del potencial transmembrana mitocondrial en células de mieloma múltiple tratadas con alisertib y barasertib. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos, las cuales fueron tratadas con las dosis indicadas de alisertib y barasertib durante 72 horas. Concluidos los tratamientos, se determinaron el potencial mitocondrial y la muerte inducida mediante la sonda TMRE y Anexina V-DY634, respectivamente, por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de n=2-6 experimentos independientes donde se indica el porcentaje de células que han perdido el potencial de membrana mitocondrial con cada tratamiento. **(B)** Caída del potencial de membrana mitocondrial tras los tratamientos. **(C)** Representación gráfica de la intensidad media de fluorescencia de la población celular TMRE positiva con cada condición respecto a la de las células no tratadas. **(D)** Cuantificación simultánea de la caída del potencial mitocondrial y la muerte inducida. Los resultados son la media $\pm$ SD de entre n=2-6 experimentos independientes, y el análisis estadístico llevado a cabo ha sido el *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración respecto al control. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Tal y como reflejan las Figuras 5.37A y B, el potencial mitocondrial se veía sustancialmente perturbado al tratar las células con los inhibidores de Aurora A y B durante 72 horas. Por un lado,

alisertib y barasertib provocaban la caída del potencial mitocondrial, la cual era más o menos pronunciada en función del compuesto, de la dosis empleada y de la línea celular estudiada. Coincidiendo con nuestros resultados, este evento, acorde con la activación de la vía apoptótica mitocondrial, ha sido reportado en numerosos tipos de células tumorales al inhibir farmacológicamente las proteínas Aurora, [789, 831–833]. Por otra parte, en la Figura 5.37A se observa que el pico correspondiente a las células que conservan el potencial de membrana mitocondrial aparece desplazado hacia la derecha con respecto al pico equivalente en situación basal. Ambos efectos también se detectaron tras exposiciones más cortas (24 y 48 horas) (datos no mostrados), y si bien a las 24 horas la caída del potencial mitocondrial y el desplazamiento del pico positivo del potencial mitocondrial eran, por lo general, bastantes discretos, a las 48 horas ambos eventos eran más pronunciados.

Respecto a la disipación del potencial con alisertib, esta era mayor en las células NCI-H929, MM.1S y U266 ante la dosis más baja, mientras que en las células RPMI 8226 se dio la situación inversa, y en las OPM-2 ambas concentraciones reducían el potencial de forma equivalente. Este último comportamiento se observó también con las dos dosis de barasertib en todas las líneas celulares salvo en las células RPMI 8226, pues con la dosis de 5 μM se observaban dos picos correspondientes a las células que perdían y mantenían el potencial de membrana, pero con la de 250 nM la respuesta fue más heterogénea y estos picos no estaban definidos.

Si se comparan las gráficas de las Figuras 5.37B y D, se observa que solamente en el caso de las células MM.1S existe una gran correlación entre la caída del potencial mitocondrial y la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular (células Anexina V+/TMRE-) con todos los tratamientos. En cambio, en el resto de líneas celulares se puede identificar una población variable de células que perdía el potencial, pero no exponía fosfatidilserina (células Anexina V-/TMRE-, 10-25 %) (Fig. 5.37D). Esta situación es coherente con el proceso apoptótico, pues la disipación del potencial mitocondrial es un evento anterior a la exposición de fosfatidilserina en la semicapa externa de la membrana celular [834]; no obstante, también es posible que la pérdida excesiva de potencial se esté produciendo por la activación de otros mecanismos de muerte que cursen con la caída del potencial mitocondrial, como la necrosis mediada por MPT o partanatos [8]. Finalmente, la Figura 5.37D también muestra que una pequeña parte de las células (5-10 %), especialmente las células RPMI 8226 tratadas con las dosis bajas de ambos inhibidores, mantenían el potencial mitocondrial y presentaban fosfatidilserina en su superficie (células Anexina V+/TMRE+), lo que sugiere que en estos casos la pérdida del potencial de membrana mitocondrial tiene lugar después de la exposición de la fosfatidilserina. De hecho, en este sentido se ha propuesto que, ante algunos estímulos apoptóticos como inhibidores de quinasas, la pérdida del potencial de membrana es un evento tardío que tiene lugar tras la activación de las caspasas [835]. No obstante, también es

posible que estos fármacos hayan activado otros mecanismos de muerte celular que no afecten al potencial mitocondrial.

Por otra parte, el desplazamiento del pico relativo a la conservación del potencial de membrana mitocondrial, podría deberse a un aumento de la masa mitocondrial impulsada por alisertib y barasertib o a que estos compuestos inducen la hiperpolarización de la membrana mitocondrial, independientemente de la dosis (Fig. 5.37A). Si se compara la intensidad media de fluorescencia relativa del marcaje con TMRE para el pico positivo del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 5.37C) y la del marcaje con MitoTracker Green (masa mitocondrial, Fig. 5.39A) para cada tratamiento, se observa que los valores de ambas gráficas son muy similares en las líneas NCI-H929, MM.1S, U266 y OPM-2, lo que apunta a que el incremento del marcaje con TMRE en todas estas células tiene su origen en el incremento de la masa mitocondrial provocada por ambas dosis de alisertib y barasertib. Esta explicación también encajaría con lo observado en las células RPMI 8226 tratadas con las dosis bajas de los inhibidores. Sin embargo, cuando alisertib y barasertib se utilizan a 5 μ M en estas células, los valores de la intensidad media de fluorescencia relativa correspondientes al pico positivo para el marcaje con TMRE (Fig. 5.37C) son mayores que los que se muestran en la gráfica relativa a la masa mitocondrial (Fig. 5.39A), sugiriendo que, en este caso, el aumento del potencial de membrana mitocondrial sí podría deberse a un efecto hiperpolarizante de los compuestos y no únicamente al incremento del número de mitocondrias.

Una de las causas de la hiperpolarización mitocondrial en las células tumorales está relacionada con la reprogramación metabólica que estas pueden experimentar, denominada “efecto Warburg” en honor a su descubridor [836]. Para satisfacer la gran demanda energética, las células cancerosas dejan de depender de la fosforilación oxidativa para obtener energía y, en su lugar, explotan la ruta glucolítica y generan grandes cantidades de lactato que acidifican el citoplasma [836]. No obstante, algunas células tumorales también requieren del sistema OXPHOS para cubrir sus necesidades energéticas [836]. En el caso del mieloma, esta es una enfermedad con elevada plasticidad metabólica en la que la glucólisis va ganando terreno a la respiración mitocondrial a medida que la enfermedad va progresando [837, 838].

Una prueba realizada con concentraciones crecientes del inhibidor metabólico DCA reveló el estado de salud del sistema OXPHOS de las células tras 72 horas de tratamiento, ya que este compuesto reprime la glucólisis al inhibir la acción de las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa y fuerza el metabolismo celular hacia la fosforilación oxidativa [839].

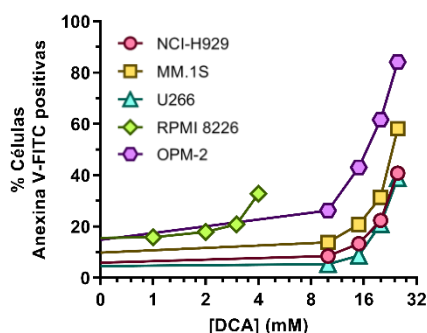


Figura 5.38 | Sensibilidad de las diferentes líneas celulares de mieloma múltiple a DCA. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y estas fueron tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes (0-25 μ M) de DCA. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte inducida en cada línea celular mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo. Los resultados provienen de un único experimento.

La Figura 5.38 reveló un efecto dosis-respuesta en todas las líneas celulares. Asimismo, queda patente que las células más sensibles al compuesto fueron las RPMI 8226, seguidas de lejos por las OPM-2, MM.1S, H929 y U266, en este orden. Esto implicaría que las células menos afectadas poseen un sistema OXPHOS en mejor estado que el de las células más afectadas, lo que les permitiría obtener energía para sobrevivir a pesar del bloqueo de la glucólisis hasta cierto punto (hasta 20 mM la toxicidad del DCA ronda el 20 % en las células menos sensibles). Como la ruta glucolítica es más rápida suministrando energía que la respiración mitocondrial, la capacidad proliferativa de las células glucolíticas es mayor [840, 841]. De hecho, se ha observado que, de las cinco líneas celulares utilizadas, las células RPMI 8226 se encuentran entre las tres que más rápido proliferan y acidifican el medio de cultivo en condiciones basales, mientras que las células MM.1S y U266 son las que mostrarían un ritmo metabólico y proliferativo más lento. Parte de estas observaciones estarían respaldadas por varios estudios en los que se vio que la actividad glucolítica era mayor en las células RPMI 8226 que en las U266 [842, 843]. Tomando todo esto en conjunto, es posible que las células RPMI 8226, al tener el sistema OXPHOS dañado, potencien la glucólisis ante la exposición a alisertib y barasertib a dosis altas, ocasionando la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna. En cambio, pensamos que las alteraciones metabólicas que pueden producir los inhibidores de Aurora quinasa no están relacionadas con el desplazamiento del pico positivo del potencial mitocondrial en estas células cuando se tratan con dosis bajas de los compuestos ni en el resto de líneas celulares, independientemente del tratamiento que se les aplique.

La relación entre las proteínas Aurora y el metabolismo celular todavía es un campo poco explorado. Uno de los escasos estudios disponibles es el publicado muy recientemente por *Sharma et al.*, quienes han observado que células de cáncer de mama que sobreexpresan Aurora A son más dependientes del metabolismo oxidativo, mientras que las que poseen bajos niveles de esta proteína utilizan preferentemente la glucólisis como fuente de energía. Además, describieron la conexión física entre Aurora A y las subunidades ATP5F1A y ATP5F1B de la ATP sintasa, y encontraron que la regulación negativa de cualquiera de los tres componentes mermaba la tasa de consumo de oxígeno (OXPHOS) y la acidificación extracelular (glucólisis), de manera que la glucólisis no podía actuar como mecanismo compensatorio. Por tanto, sugirieron que la ATP

sintasa no podía funcionar en sentido inverso, fomentando la ruta glucolítica [844]. Hasta la fecha, solamente *Nguyen et al.* han descrito la reprogramación metabólica en células de glioblastoma al inhibir Aurora A con alisertib, el cual conseguía suprimir la glucólisis regulando negativamente c-Myc y activaba la fosforilación oxidativa [832]. Sin embargo, no se tiene constancia de ningún trabajo que relacione directamente el metabolismo con las alteraciones que sufre el potencial mitocondrial cuando se inhiben las proteínas Aurora, por lo que, para avanzar en esa dirección sería interesante analizar si alisertib y barasertib impulsan la ruta glucolítica en el mieloma.

5.2.10.2. Alisertib y barasertib incrementan la masa mitocondrial y fomentan la producción masiva de ROS mitocondriales

Además del potencial de membrana mitocondrial, existen otros parámetros que permiten conocer la funcionalidad, dinámica y capacidad bioenergética de las mitocondrias [845, 846]. Dos de ellos son la masa mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales.

En los mamíferos, la principal fuente de especies reactivas de oxígeno es la respiración mitocondrial [847]. Tradicionalmente, los complejos I y III de la cadena respiratoria se han considerado los mayores surtidores de ROS en forma de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [848]. Estos subproductos son generados tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembrana por el complejo III, y solo en la matriz en el caso del complejo I [849]. No obstante, cuando ambos complejos se inhiben y la presencia de succinato es baja, el sitio de flavina del complejo II también puede generar ROS en la matriz [848, 850]. En condiciones fisiológicas, los ROS mitocondriales participan en múltiples procesos, incluidos la transducción de señales, la autofagia, la adaptación metabólica a condiciones de hipoxia, la diferenciación, la activación del sistema inmune y el envejecimiento, pero una producción excesiva de estos subproductos metabólicos se asocia con diversas patologías, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y autoinmunes, el envejecimiento prematuro y el cáncer [849, 851, 852]. A nivel molecular, el incremento excesivo de ROS mitocondriales o el deterioro de las defensas antioxidantes de la mitocondria se traducen en el daño de componentes y macromoléculas celulares, incluidos los lípidos, las proteínas y el DNA, y pueden provocar el colapso energético mitocondrial [849, 853]. Esto pondría en jaque la funcionalidad de estos orgánulos, y facilitaría la liberación de factores apoptogénicos desde el espacio intermembrana que acabarían activando la apoptosis [849].

Por otra parte, la masa mitocondrial viene definida por el equilibrio entre la biogénesis mitocondrial, que consiste en la duplicación del DNA mitocondrial y la síntesis de proteínas de localización mitocondrial, y la degradación de las mitocondrias no funcionales mediante mitofagia en los autofagosomas [845, 854]. El mantenimiento de dicho equilibrio depende del estrés al que están expuestas las células, incluyendo la disponibilidad de nutrientes, el estado

redox y el daño oxidativo, y en esto último, las especies reactivas de oxígeno tienen un papel determinante [854].

Por todo ello, en este trabajo se ha optado por analizar la masa mitocondrial y la producción de ROS mitocondriales con el fin de profundizar en el daño ocasionado por los inhibidores de Aurora quinasa a las mitocondrias.

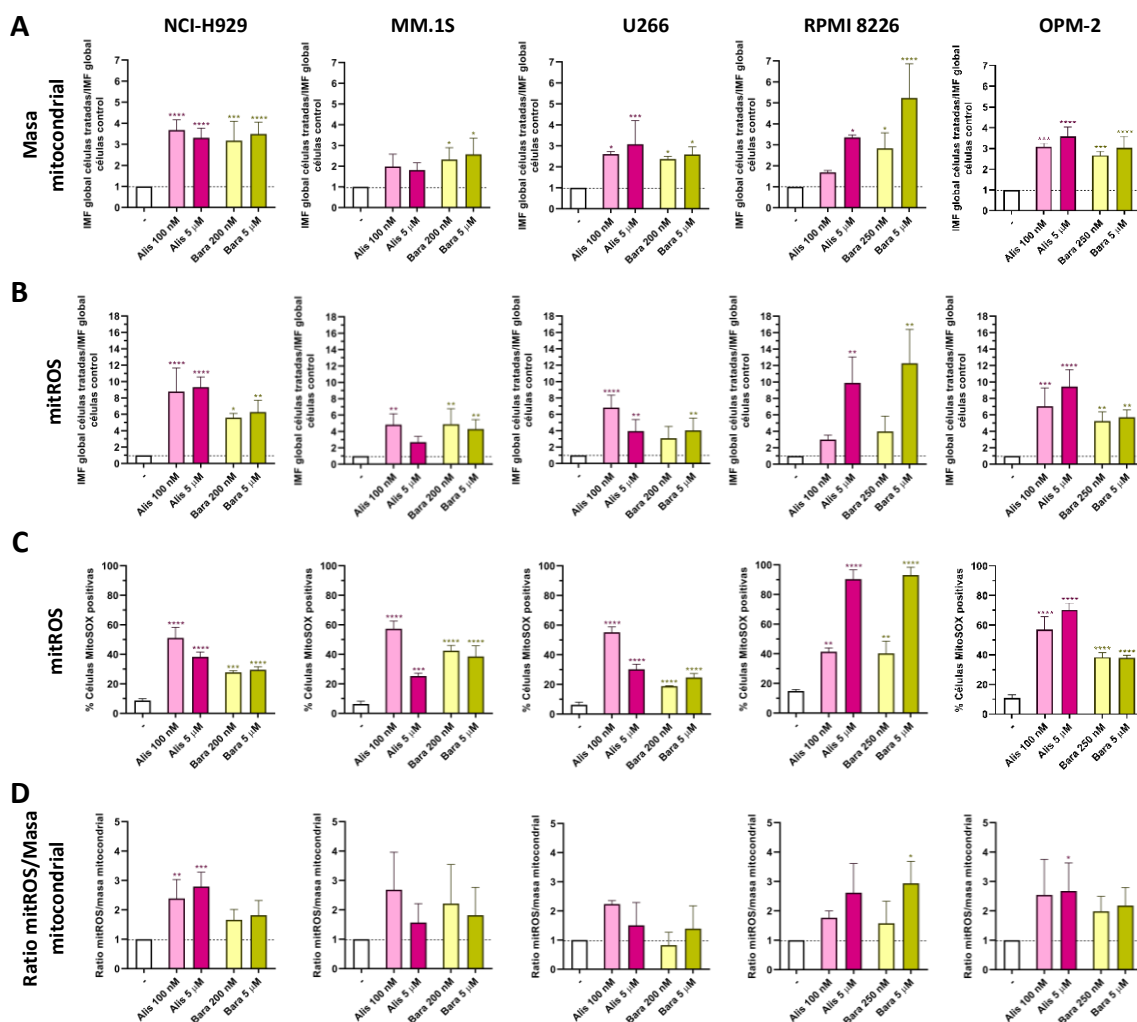


Figura 5.39 | Efecto de los inhibidores de Aurora quinasa sobre la masa mitocondrial y la producción de ROS mitocondriales en células de mieloma múltiple. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y estas fueron expuestas a las dosis señaladas de alisertib y barasertib durante 72 horas. A continuación, se determinaron la generación de ROS en las mitocondrias y la masa mitocondrial con las sondas MitoSOX™ y MitoTracker Green FM, respectivamente, ambas por citometría de flujo. **(A y B)** Intensidad media de fluorescencia global correspondiente a los tratamientos respecto a la de las células no tratadas para la masa mitocondrial (A) y la generación de ROS mitocondriales totales (B). **(C)** Porcentaje de células que han aumentado la producción de ROS mitocondriales. **(D)** Producción de ROS mitocondriales con cada tratamiento respecto a las células control normalizada respecto a la masa mitocondrial. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-5 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *one-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada concentración respecto al control. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

Tras 72 horas de tratamiento, las células de mieloma incrementaban sustancialmente su masa mitocondrial (Fig. 5.39A) así como la producción de ROS mitocondriales (Figs. 5.39B y C), aunque la magnitud de estas alteraciones dependía de la línea celular, el compuesto y la dosis utilizada del mismo. Dado que es muy posible que parte del aumento observado en ambas medidas se deba al aumento del tamaño celular y que el incremento de la masa mitocondrial también influya en la producción de ROS mitocondriales, se decidió calcular la ratio $[\text{ROS mitocondriales}]/[\text{masa mitocondrial}]$ (Fig. 5.39D) para determinar la cantidad de ROS que produce cada mitocondria, y los resultados indican que esta relación también aumentaba.

Según la Figura 5.39A, ambas dosis de los fármacos inducían un aumento de la masa mitocondrial similar en cada línea celular, exceptuando a las células RPMI 8226, y dicho aumento fue más notable en las células NCI-H929 y OPM-2 que en las MM.1S y U266. En el caso de las células RPMI 8226 la masa mitocondrial aumentaba en mayor medida ante exposiciones a dosis altas de los compuestos, especialmente barasertib.

En el caso de los ROS mitocondriales, estos se evaluaron de dos formas distintas. Por un lado, la Figura 5.39B representa la intensidad media de fluorescencia relativa global, es decir, la que se deriva de los picos positivo y negativo, respecto al control; por otro, la Figura 5.39C hace referencia al porcentaje de células que se marcaron positivamente con la sonda MitoSOX. Atendiendo a la intensidad media de fluorescencia relativa global (Fig. 5.39B), se observa que la producción de ROS mitocondriales se incrementó en todas las líneas celulares tras los tratamientos, aunque siguiendo distintos patrones en función de la línea celular. Por un lado, ambas dosis de barasertib estimularon la generación de ROS en las mitocondrias de forma equivalente en cada línea celular, salvo en las RPMI 8226, pues en ellas barasertib a 5 μM fue un inductor de ROS mitocondriales más efectivo que barasertib a dosis bajas. Esta mayor eficacia de la dosis alta también se observó con alisertib en la misma línea celular y de forma menos llamativa en las células OPM-2; sin embargo, en las MM.1S y U266 fue a dosis bajas cuando más se promovió la generación de ROS mitocondriales. En cambio, en las células NCI-H929 ambas concentraciones de alisertib repercutían de forma equivalente en dicha producción. Estos resultados difieren de los arrojados por un estudio realizado en células de cáncer de mama, pues después de 6 horas de tratamiento con los inhibidores de Aurora quinasa A alisertib y ENMD-2076, los niveles de ROS mitocondriales experimentaron una pequeña disminución [855]. Si estos resultados se comparan con los obtenidos al analizar el porcentaje de células que incrementan sus niveles de ROS mitocondriales (Fig. 5.39C), se observa correlación entre ellos en cuatro de las cinco líneas celulares estudiadas. La excepción fueron las células NCI-H929 tratadas con alisertib, pues si bien ambas concentraciones del compuesto aumentaban la producción de ROS mitocondriales de forma equiparable, era a dosis bajas cuando un mayor porcentaje de células incrementaban sus niveles de ROS en las mitocondrias.

Pese al aumento de ambos parámetros, la tasa de producción de ROS por mitocondria (Fig. 5.39D) fue elevada y estadísticamente significativa para las células NCI-H929 tratadas con ambas dosis de alisertib, las RPMI 8226 expuestas a barasertib 5 μ M y las OPM-2 sometidas a alisertib 5 μ M. En cambio, el aumento observado cuando las células U266 y RPMI 8226 se enfrentaban a alisertib 100 nM, aunque notable, no era estadísticamente significativo. En el resto de situaciones, la dispersión de los resultados hace que los cambios observados no sean estadísticamente significativos.

La sobreproducción de ROS en las mitocondrias provoca la oxidación de macromoléculas y se relaciona con múltiples eventos celulares [856]. Por un lado, el exceso de ROS mitocondriales puede desencadenar la ruta apoptótica mitocondrial al provocar la salida citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, tal y como demostraron *Sun et al.* que sucedía en células de cáncer de mama tratadas con el inhibidor de histona deacetilasas tricostatina A [857, 858]. Además, se ha visto que distintos secuestradores de ROS consiguen reducir la apoptosis inducida por este fármaco en dichas células y por un nuevo agente anti-microtúbulos en células de cáncer gástrico [858, 859]. No obstante, los ROS mitocondriales también pueden mediar en programas de muerte celular regulada de tipo necrótico, como la necroptosis y partanatos [860–862]. Por otra parte, también existen estudios que respaldan la participación de los ROS mitocondriales en la inducción y el mantenimiento del fenotipo senescente *in vitro* e *in vivo*. Las mitocondrias de las células senescentes no son funcionales y generan elevados niveles de ROS que oxidan lípidos, proteínas y el DNA, y en las regiones teloméricas de este último, también pueden provocar roturas de hebra simple o de doble hebra que conducen al estado senescente. Además, pueden regular el SASP mediante la activación directa o indirecta de NF- κ B y pueden tener una acción autocrina manteniendo la senescencia mediante un ciclo de retroalimentación positiva que produce daño constante en el DNA, y paracrina induciendo senescencia en células circundantes a través del SASP [166]. Finalmente, existe una teoría que explica el envejecimiento desde un punto de vista mitocondrial, denominada teoría mitocondrial del envejecimiento, la cual se resume en un círculo vicioso en el que los ROS producidos por la cadena respiratoria mitocondrial generan mutaciones en el DNA mitocondrial, lo que da lugar a un sistema OXPHOS aberrante que retroalimenta la excesiva generación de ROS y estos, a su vez, siguen originando mutaciones en el DNA mitocondrial; no obstante, los datos experimentales no secundan al completo esta teoría [863, 864]. Por tanto, no está claro si el estrés oxidativo mitocondrial es una causa o una consecuencia del envejecimiento; no obstante, este estaría altamente implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [864, 865].

Existen referencias anteriores a este trabajo que han evaluado la posible correlación existente entre la masa y los ROS mitocondriales en diferentes contextos, aunque en ningún caso se incluyen los inhibidores de Aurora quinasa ni el mieloma múltiple. Por ejemplo, la elevada

producción de ROS mitocondriales en células tumorales a consecuencia del daño en el DNA ocasionado por etopósido se asocia con una mayor síntesis de DNA mitocondrial y el incremento de la masa mitocondrial [866]; en cambio, en la enfermedad granulomatosa crónica, el exceso de ROS mitocondriales no estaba vinculado a alteraciones en la masa mitocondrial [867]. Asimismo, tanto la masa como los ROS mitocondriales se identificaron elevados en células poliploides de próstata [868]. En el caso que nos ocupa, los resultados parecen apuntar a que el exceso de especies reactivas de oxígeno generadas en las mitocondrias por la acción de los inhibidores de Aurora quinasa afecta a la funcionalidad de estos orgánulos, de manera que las células podrían intentar recobrar dicha funcionalidad mediante el incremento de su masa mitocondrial. No obstante, en algunos casos como en las células MM.1S expuestas a ambas dosis de alisertib y en las RPMI 8226 tratadas con dosis bajas de alisertib la masa mitocondrial solo se duplica con respecto a los controles. Por tanto, en estos casos el aumento de masa mitocondrial estaría asociado al bloqueo en G2/M y/o al deslizamiento mitótico que sufren las células a causa de estos tratamientos (apartados 5.2.2), ya que en ambos escenarios las células han duplicado su contenido intracelular, incluidas las mitocondrias, para llevar a cabo la división, aunque esta no llegue a producirse.

Del mismo modo que se ha encontrado una relación entre los ROS y la masa mitocondriales en determinadas situaciones, también se han establecido distintas asociaciones entre los primeros y el potencial de membrana mitocondrial. Por ejemplo, los ROS generados por la acción de etopósido provocan la caída del potencial mitocondrial y la salida de factores apoptogénicos al citosol [866]. Análogamente, trastornos mitocondriales relacionados con disfunciones de los componentes del sistema OXPHOS conllevan una caída del potencial mitocondrial y una sobreproducción de ROS simultánea. Sin embargo, acciones como la inhibición/disfunción de la ATP sintasa o el cierre del poro de transición de permeabilidad mitocondrial se asocian con la hiperpolarización de la membrana mitocondrial y una mayor generación de ROS [869]. Además, un elevado potencial de membrana favorece el transporte de electrones inverso mitocondrial, que también suministra importantes cantidades de superóxido. Este transporte depende de un pequeño grupo de coenzima Q y tiene lugar cuando se produce una fuga de electrones al transferirse estos desde el complejo I al complejo II, de manera que estos circulan en contra del gradiente del potencial redox de la cadena de transporte de electrones [849]. Por el contrario, no existen referencias previas a este trabajo de una correlación positiva entre la masa y el potencial mitocondriales en ningún contexto farmacológico; sin embargo, la disminución de ambos parámetros sí ha sido detectada tras la inducción de apoptosis en células U937 tratadas con quercetina y también se ha asociado con el envejecimiento y la hipertrofia cardíaca, mientras que otro estudio describió la disipación del potencial de membrana y el incremento de la masa mitocondrial cuando se indujo la apoptosis de linfocitos T con un anticuerpo anti-CD95 [870–

873]. No obstante, dejando a un lado la terapia antitumoral, *Farge et al.* encontraron que células de AML con una elevada actividad respiratoria y que eran resistentes a citarabina mostraban *per se* un alto potencial de membrana mitocondrial, un incremento de la masa mitocondrial y elevados niveles de ROS mitocondriales comparadas con células sensibles a dicho agente antitumoral [874].

En definitiva, nuestros resultados revelan que las células de mieloma aumentan su masa mitocondrial y la generación de ROS mitocondriales y, en general, cada mitocondria incrementa su producción de ROS como consecuencia del tratamiento con alisertib y barasertib. Este exceso de ROS mitocondriales podría impulsar la caída del potencial mitocondrial al inducirse la apoptosis en las células de mieloma tratadas con alisertib y barasertib. Además, la literatura incita a pensar que estos subproductos podrían participar en la inducción del fenotipo senescente adquirido por las células de mieloma en respuesta a estos compuestos. Por otro lado, en el apartado anterior se ha comentado que, en la mayoría de los casos, el aumento de la masa mitocondrial y del potencial mitocondrial correlacionan, y solamente cuando las células RPMI 8226 se exponen a dosis altas de alisertib y barasertib podría producirse la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna. Todas estas hipótesis deberían ser confirmadas en futuros estudios y, además, sería interesante elucidar el mecanismo que provoca la hiperpolarización de las mitocondrias. Relacionado con esto último, se ha descrito que el aumento del potencial mitocondrial en las células tumorales puede deberse a múltiples factores: la acidificación del citoplasma al producirse grandes cantidades de piruvato y lactato; el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y la regulación positiva de Bcl-2; o el cambio en los niveles de expresión de los canales ANT en la membrana mitocondrial interna [836, 875]. Las células tumorales disminuyen la expresión de ANT1 (transporta ADP a la matriz y ATP al espacio intermembrana) y sobreexpresan ANT2, que exporta ADP desde la matriz e introduce ATP [875]. Esto hace que la ATP sintasa actúe en sentido inverso, hidrolizando ATP y bombeando protones a través de la membrana interna, de manera que esta menor disponibilidad de ATP fomentaría la ruta glucolítica para obtener energía [875].

5.2.10.3. Implicación del DNA mitocondrial en la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa

Para determinar si los ROS generados por las mitocondrias eran los responsables de la citotoxicidad asociada a alisertib y barasertib, se utilizaron dos eliminadores específicos del anión superóxido mitocondrial, MitoTEMPO y MitoQ [876, 877]; sin embargo, en nuestras células no solo no ejercieron un papel antioxidante, sino que MitoQ incluso estimulaba la producción de ROS mitocondriales a dosis muy bajas (1,25-50 nM) y resultaba tóxico a dosis superiores (≥ 250 nM) (datos no mostrados). Ante esta situación, decidimos evaluar la sensibilidad de células

que carecían de DNA mitocondrial, ya que este codifica, entre otros elementos, para 13 subunidades proteicas del sistema OXPHOS [878], de manera que la cadena de transporte electrónico de estas células está dañada. Lo ideal habría sido realizar este ensayo en células de mieloma sin DNA mitocondrial, pero el grupo no disponía de ellas. En su lugar, poseía células U937 (leucemia pro-monocítica humana) con estas características (U937 ρ^0), de manera que el estudio se llevó a cabo con ellas.

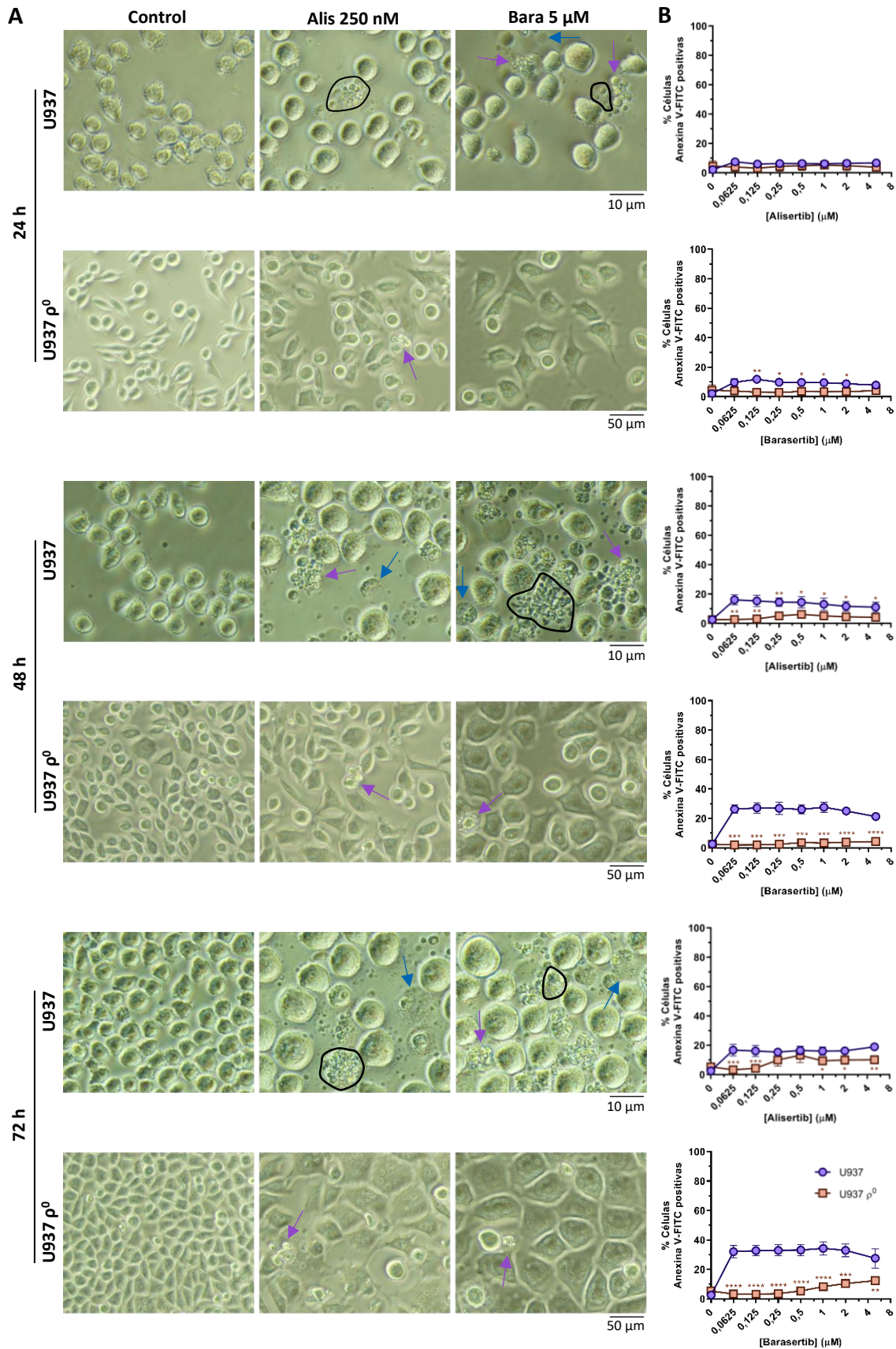


Figura 5.40 | Sensibilidad de células U937 *wild-type* y desprovistas de DNA mitocondrial a inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células U937 *wild-type* y $5 \cdot 10^4$ células U937 ρ^0 en 500 μ l en placas de 48 y 24 pocillos, respectivamente. Se añadieron concentraciones crecientes de alisertib y barasertib (0-5 μ M) inmediatamente a las células

wild-type y a las 24 horas de la siembra en el caso de las células ρ^0 . Los fármacos se dejaron actuar durante los tiempos estipulados y, a continuación, las células se visualizaron al microscopio invertido **(A)** y se determinó la muerte inducida por los compuestos en cada línea celular mediante marcaje con Anexina V-FITC y citometría de flujo **(B)**. Imágenes de microscopía invertida (x200 o x400) representativas a las condiciones indicadas de un experimento. Las flechas púrpura señalan células apoptóticas, las flechas azules apuntan a células necróticas y las formas irregulares negras muestran restos celulares en forma de esferas. Los resultados son la media $\pm$ SD de al menos tres experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* desapareado de dos colas, comparando para cada concentración y tiempo el efecto entre ambas líneas celulares. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Previamente al análisis cuantitativo de la toxicidad de los inhibidores de Aurora quinasa en las células U937 *wild-type* y ρ^0 mediante citometría de flujo, estas se visualizaron al microscopio invertido para evaluar los cambios a nivel morfológico que ocasionaron los tratamientos (Fig. 5.40A). En primer lugar, cabe destacar que la forma de las células parentales es redondeada, acorde con una morfología de tipo monocito-macrófago, pero aquellas que carecen del DNA mitocondrial adoptan una morfología de tipo epitelial. Como ya detectamos en las células de mieloma y de tumores sólidos, tanto alisertib como barasertib aumentaron el tamaño celular de ambas líneas celulares desde las 24 horas y, en el caso de las células ρ^0 , este incremento fue más evidente con concentraciones en el rango micromolar y un mayor tiempo de exposición. Además, el aumento de la dosis y el paso del tiempo propiciaron la apoptosis (flechas púrpura) inducida por los compuestos en los dos tipos celulares, observándose siempre una mayor abundancia de cuerpos apoptóticos en las células parentales que en las ρ^0 . No obstante, en las células U937 *wild-type* también se advirtió en ocasiones la presencia de células necróticas (flechas azules) y restos celulares en forma de pequeñas esferas (formas irregulares negras) que pertenecían a células muertas desintegradas. Dichas esferas se hacían más patentes cuando los tratamientos se prolongaban, por lo que es probable que en el análisis por citometría de flujo se haya subestimado la muerte inducida por los compuestos.

Según dicha técnica, la viabilidad de ambas líneas celulares se redujo en mayor o menor grado tras la exposición a alisertib y barasertib (Fig. 5.40B). A las 24 horas de incubación, el nivel de apoptosis inducido por alisertib en las células U937 *wild-type* y ρ^0 fue similar incluso a la dosis más elevada ($\approx 5\%$), mientras que la muerte asociada a barasertib fue ligeramente mayor en las células parentales que en las ρ^0 (10 % frente a 5 %, aproximadamente). No obstante, la prolongación de los tratamientos sensibilizó en mayor medida a las células *wild-type*, especialmente a la acción de barasertib. En ellas, el perfil citotóxico de los compuestos se ajustaba al de un “efecto *plateau*”, con niveles de muerte que rondaban el 20-25 % a las 48 horas y el 20-30 % a las 72 horas. Sin embargo, las células U937 ρ^0 se mostraron resistentes a ambos inhibidores tras 48 horas de incubación, y solo a las 72 horas experimentaron un pico de toxicidad

de en torno al 15 % con alisertib a 500 nM y un incremento sutil y progresivo de la mortalidad hasta el 10 % con dosis de barasertib en el rango micromolar.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que el genoma mitocondrial es relevante en la respuesta de células leucémicas a los inhibidores de Aurora quinasa, en especial a barasertib. Pese a que en la actualidad no se disponen de referencias previas en las que se haya valorado el papel del DNA mitocondrial en la respuesta a esta familia de compuestos, sí se ha propuesto que este es importante en la muerte celular desencadenada por agentes terapéuticos como adriamicina (doxorrubicina) y la terapia fotodinámica [879]. La insensibilidad a dichos tratamientos puede ser debida a la disfunción mitocondrial de las células ρ^0 , lo cual no permite la activación de la adriamicina ni alcanzar los niveles de ROS necesarios para inducir la muerte de las células tratadas con este agente antitumoral y la terapia fotodinámica [879]. Análogamente y de acuerdo con nuestros resultados, parece factible que los ROS generados por las mitocondrias constituyan un factor esencial para el efecto citotóxico de los inhibidores de Aurora quinasa. Para afianzar esta hipótesis, sería conveniente realizar estudios complementarios que incluyan antioxidantes mitocondriales para comprobar que estos previenen la muerte inducida por alisertib y barasertib, del mismo modo que algunos trabajos han corroborado que eliminadores de ROS como N-acetilcisteína reducen la citotoxicidad de tozasertib, y piruvato y selenio hacen lo propio con la provocada por paclitaxel en células de cáncer urotelial de vejiga y de glioma, respectivamente [824, 825].

5.2.10.4. Efecto de inhibidores metabólicos sobre la generación de ROS mitocondriales

En la sección siguiente se analizarán con detalle todas las combinaciones testadas en el mieloma múltiple con los inhibidores de Aurora quinasa como denominador común. Una de ellas incluyó los inhibidores metabólicos DCA y metformina (apartado 5.4.7). Como ya se ha comentado previamente, DCA inhibe las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa, lo que bloquea la ruta glucolítica e impulsa la respiración mitocondrial [839]; en cambio, la diana mejor definida de metformina es el complejo I de la cadena respiratoria. Este fármaco inhibe dicho complejo, lo que implica una reducción de la oxidación de NADH a NAD^+ y la disminución de la síntesis de ATP. Por ello, en esta situación, las células hacen uso de otras moléculas y vías metabólicas, entre ellas la glucólisis, con la que consiguen potenciar la producción de ATP y transformar NADH en NAD^+ [880]. Un mayor uso del sistema de fosforilación oxidativa conllevaría un aumento de la producción de ROS mitocondriales, mientras que la disfunción del complejo I impediría la generación de estos subproductos metabólicos. Con estas premisas, quisimos determinar si DCA incrementaría los niveles de ROS mitocondriales generados por alisertib y barasertib, y si metformina mermaría dichos niveles. Para ello, se determinó la cantidad

de ROS mitocondriales producidos por cada mitocondria en las células NCI-H929, U266 y OPM-2 tratadas y sin tratar con los inhibidores de Aurora quinasa y/o los inhibidores metabólicos durante 72 horas en aquellos casos en los que se detectó cierta sinergia o antagonismo.

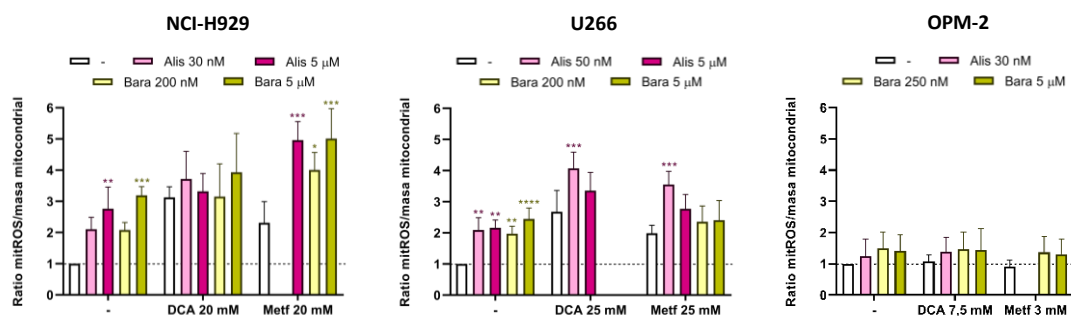


Figura 5.41 | Efecto de inhibidores metabólicos sobre la producción de ROS mitocondriales por mitocondria en células de mieloma múltiple tratadas con los inhibidores de Aurora quinasa. Se sembraron 10^5 o $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 µl en placas de 24 o 48 pocillos, y estas se incubaron simultáneamente con las dosis señaladas de alisertib/barasertib y DCA/metformina durante 72 horas, renovando cada 48 horas los inhibidores metabólicos. Finalizados los tratamientos, las células se marcaron con las sondas MitoSOX™ o MitoTracker Green FM y se analizaron por citometría de flujo. Las gráficas representan la producción de ROS mitocondriales con cada tratamiento respecto a las células control normalizada respecto a la masa mitocondrial, y los resultados son la media $\pm$ SD de $n=3-5$ experimentos independientes, donde el análisis estadístico realizado ha sido el *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Dunnett, comparando cada condición respecto a las células no tratadas o tratadas con DCA/metformina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Al igual que en el apartado anterior, la Figura 5.41 demuestra que las mitocondrias intensifican la producción de ROS en presencia de alisertib y barasertib.

Por su parte, DCA y metformina aumentan la tasa de ROS por mitocondria en las células NCI-H929 y U266, pero no así en las OPM-2. Es bien sabido que ambos fármacos acrecientan la producción de ROS totales [824, 881–884], y su papel cuando los generan las mitocondrias también ha sido evaluado. Por ejemplo, contrariamente a los resultados aquí mostrados, un estudio previo expuso que DCA solamente acentuaba la producción de ROS mitocondriales en células de mieloma altamente glucolíticas, como las RPMI 8226, pero no en aquellas que no dependían de ella, como las U266 [843]. Además, también se ha visto que DCA incrementa los niveles de ROS generados en las mitocondrias en modelos celulares de tumores sólidos [885–888]. Este compuesto favorece la sobreproducción de ROS en el complejo I del sistema OXPHOS, pues al forzar la entrada del piruvato en el ciclo de Krebs, la producción de NADH dentro de la mitocondria aumenta y este es utilizado por dicho complejo. No obstante, niveles de ROS elevados y sostenidos pueden dañar la cadena de transporte electrónico, especialmente al complejo I, ya que contiene nueve centros hierro-azufre y siete subunidades codificadas por el DNA mitocondrial que son particularmente sensibles al daño oxidativo. La menor actividad del complejo I puede provocar la caída del potencial mitocondrial y, si esta se mantiene, la membrana

mitocondrial externa terminará permeabilizándose y permitiendo la salida de factores apoptogénicos que iniciarán la apoptosis. Ante esta situación, la producción de ROS mitocondriales se intensifica y estos entrarían en un bucle de retroalimentación positiva que potenciaría la apoptosis [885]. Por otro lado, metformina inhibe el complejo I de la cadena respiratoria de forma leve, transitoria y específica [889]. Este complejo puede generar aniones superóxido mediante transporte directo e inverso de electrones, según el sustrato que alimente este proceso, pero metformina solamente reduce los ROS generados en sentido inverso, sin aumentar los producidos por el flujo directo [890]. No obstante, varios estudios describen un aumento de los niveles de superóxido asociados al uso de metformina en distintos modelos celulares humanos y animales [888, 891, 892]. De hecho, nuestros resultados para las células NCI-H929 y U266 estarían en la línea de los mencionados trabajos. A pesar de lo descrito, es posible que metformina actúe en nuestro modelo inhibiendo la generación de ROS mitocondriales en sentido inverso en el complejo I, pero a la vez fomente su producción en sentido directo; no obstante, esta teoría debe ser comprobada. En cambio, otro estudio en células de neuroblastoma no reveló variaciones significativas en los niveles mitocondriales de ROS debido a la acción de metformina [893], al igual que sucede en este trabajo con las células OPM-2.

En cuanto al efecto de la acción conjunta de inhibidores de Aurora quinasa y del metabolismo sobre la tasa de ROS por mitocondria, se observa que esta es ligeramente mayor a la que se obtendría sumando la contribución individual de cada compuesto solo cuando metformina se combina con alisertib a dosis altas o con barasertib a dosis bajas en las células NCI-H929, por lo que, en estos casos, metformina fomenta levemente la producción de ROS mitocondriales por parte de los inhibidores de Aurora quinasa a las condiciones señaladas. Por el contrario, en las células OPM-2 ni DCA y metformina alteran la tasa de ROS por mitocondria asociada a alisertib y barasertib, y en las situaciones restantes, incluyendo a las células U266, el efecto de los inhibidores metabólicos sobre dicha tasa se incrementa de forma equivalente a la suma del efecto de cada compuesto por separado o se reduce. Por lo tanto, en estos casos DCA y metformina no potenciarían la generación de ROS mitocondriales por parte de los inhibidores de Aurora quinasa.

Varios autores han evaluado cómo afecta la combinación de DCA/metformina con otras terapias antitumorales a los niveles de ROS en las mitocondrias y la muerte inducida. Por ejemplo, DCA combinado con sirtinol (inhibidor de SIRT1), cisplatino o ácido ursólico resulta en un mayor efecto citotóxico y una mayor producción de ROS mitocondriales en células de cáncer de pulmón, de ovario y de melanoma, respectivamente [894–896]. Análogamente, la combinación de metformina con everolimus (inhibidor de mTOR) y nelfinavir (inhibidor de la proteasa para el tratamiento del VIH) amplifica la generación de ROS en la mitocondria y la muerte ocasionada en comparación con cada uno por separado en células de cáncer cervical [897, 898]. Incluso algunos autores también han observado que la combinación simultánea de ambos fármacos

metabólicos es más tóxica y estimula la producción de superóxido mitocondrial en mayor medida que cada uno de manera individual en células de tumores sólidos [888, 899]. No obstante, hasta donde sabemos, este sería el primer estudio en evaluar la capacidad de inhibidores metabólicos de modular de manera específica la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales derivadas de la acción de inhibidores de Aurora quinasa en el mieloma múltiple.

5.2.10.5. Implicación del citocromo c

Otro evento clave de la ruta apoptótica mitocondrial es la liberación de factores apoptogénicos tras la permeabilización de la membrana externa de las mitocondrias [830]. Uno de ellos es el citocromo c, una molécula clave para las células cuya actividad varía en función de la localización celular y los estímulos a los que se exponen las células [900]. En las células sanas se encuentra recluido en el espacio intermembrana de las mitocondrias y allí constituye una molécula esencial para la bioenergética celular, ya que actúa como transportador de electrones en la cadena respiratoria gracias a su grupo hemo, que le permite aceptar electrones provenientes del complejo III y difundir así al complejo IV, donde cede los electrones al oxígeno molecular, convirtiéndolo en moléculas de agua [901]. Además, en condiciones fisiológicas también desempeña una función antioxidante al eliminar las especies reactivas de oxígeno derivadas de la oxidación de NADH y FADH₂ durante la respiración mitocondrial [900]. Sin embargo, ante un estímulo apoptótico de origen intracelular, la célula responde liberando el citocromo c al citosol, donde se convierte en un factor decisivo para la ejecución de la vía apoptótica intrínseca [900]. Este cambio en el papel del citocromo c dentro de las células se debe a su interacción con la cardiolipina, un fosfolípido aniónico específico de la membrana mitocondrial interna, cuando este se encuentra en su estado férrico [900]. La formación de este complejo modifica la estructura terciaria de la proteína al alterar la región donde se localiza el grupo hemo, lo que provoca su desplegamiento parcial y le confiere una actividad peroxidasa [900]. Gracias a esta nueva propiedad, el citocromo c puede llevar a cabo la peroxidación de la cardiolipina y promover así la disociación del complejo, liberándose, por tanto, la proteína, que llegará al citosol a través de los poros formados en la membrana mitocondrial externa al producirse su permeabilización como consecuencia de la acción de Bax y Bak [900]. Una vez allí, el citocromo c interacciona con Apaf-1, y junto con dATP constituyen el apoptosoma, el cual es capaz de iniciar la cascada de activación de las caspasas [900].

En el apartado 5.2.2 de este trabajo se ha demostrado que los núcleos de las células MM.1S DKO exhiben morfologías apoptóticas tras su exposición prolongada a alisertib a 100 nM. Además, en distintas secciones se ha comprobado que este tratamiento cursa con marcaje positivo para Anexina V en estas células (apartados 5.2.8 y 5.2.9), pero la inhibición de la caspasa 8 no previene su muerte (apartado 5.2.8). Partiendo de la base de que estas células tienen bloqueada la vía apoptótica mitocondrial y que dichos resultados nos hicieron descartar la activación de la ruta

apoptótica extrínseca, nos planteamos la posibilidad de que el citocromo c fuera capaz de alcanzar el citosol de estas células a través de un mecanismo independiente de Bax/Bak y promover así la apoptosis.

El estudio de la salida del citocromo c se planteó inicialmente para las líneas celulares MM.1S *wild-type*, vector vacío y DKO, evaluando este fenómeno tras la acción de alisertib y barasertib a dosis altas y bajas, y en presencia y ausencia de Z-VAD. Sin embargo, este enfoque únicamente resultó concluyente para las células parentales y la dosis baja de alisertib (100 nM) con y sin Z-VAD en las células MM.1S DKO. En el resto de situaciones, dificultades asociadas a la técnica empleada para determinar la salida del citocromo c y, posiblemente, cambios en distintas características de las células tras los tratamientos interfirieron en la obtención de resultados concluyentes. Es por ello por lo que, a continuación, solamente se muestran los resultados obtenidos con las células MM.1S *wild-type* y las MM.1S DKO a las condiciones indicadas, en las que además se determinó simultáneamente la caída del potencial de membrana y la muerte celular inducida para completar el estudio.

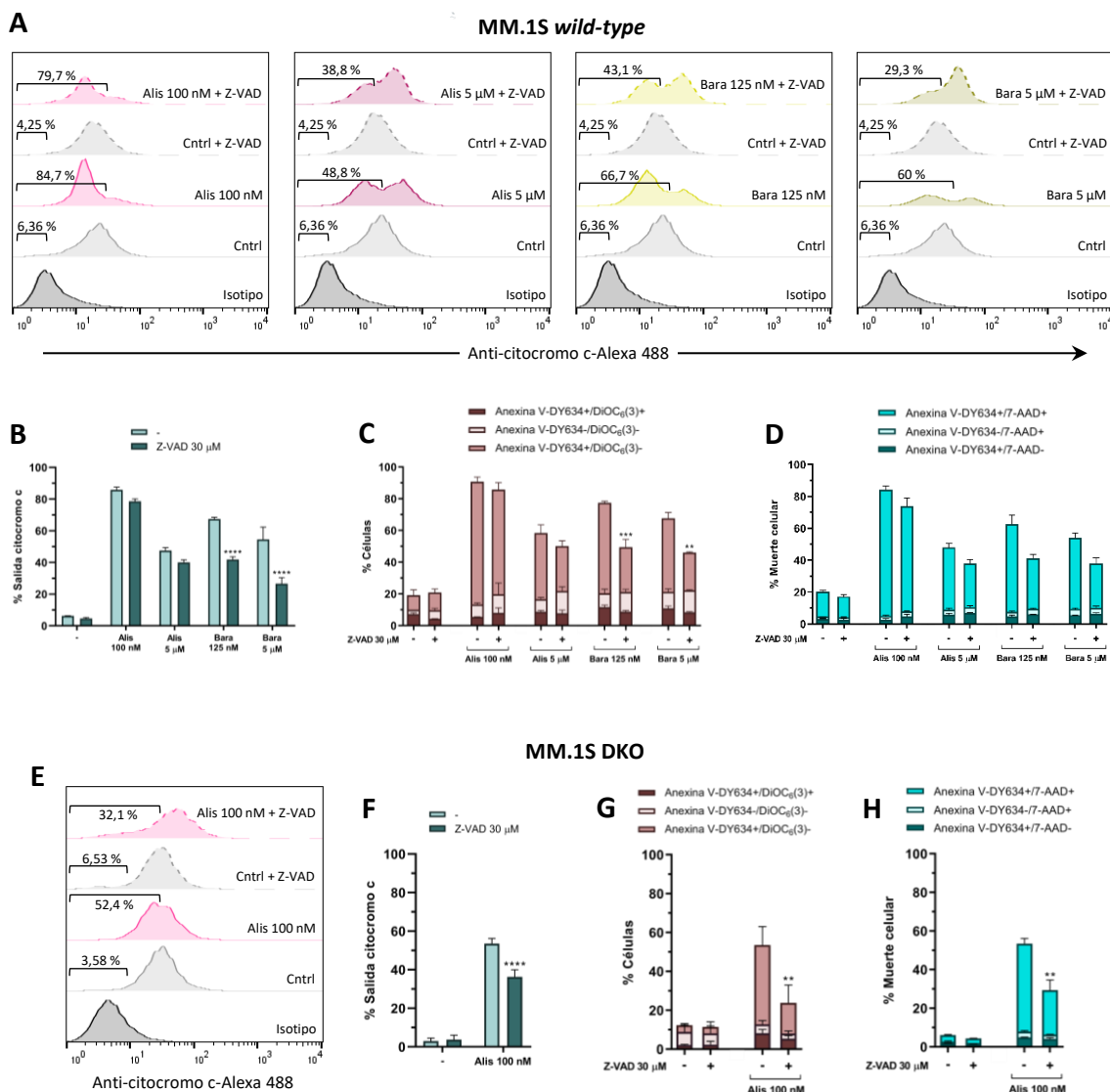


Figura 5.42 | Liberación del citocromo c, caída del potencial mitocondrial y muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa en células MM.1S *wild-type* y DKO. De cada línea celular, se sembraron 10^6 células en 10 ml en placas de 6 pocillos o $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos y, en ambos casos, la mitad de ellas fueron pre-incubadas durante al menos una hora con Z-VAD a una concentración final de 30 μ M. A continuación, se adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas y estos se dejaron actuar durante 72 horas, renovando Z-VAD cada 24 horas. Tras los tratamientos, se analizó la salida del citocromo c de la mitocondria según se indica en el apartado 3.4.2 de Materiales y métodos (**A-B**; **E-F**) y se determinaron el potencial mitocondrial y la muerte inducida mediante marcaje con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) (**C** y **G**) o 7-AAD (**D** y **H**), todo ello mediante citometría de flujo. Los histogramas son representativos de al menos dos experimentos independientes y en ellos se incluye el porcentaje de células que han perdido el citocromo c con cada tratamiento. Los resultados de citometría son la media $\pm$ SD de $n=2-3$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *two-way ANOVA* con el posterior análisis de Sidak, comparando cada concentración de los fármacos en presencia y ausencia de Z-VAD. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Iniciando el análisis de los resultados con las células MM.1S *wild-type*, los histogramas de la Figura 5.42A ponen de manifiesto que el citocromo c se libera tras los tratamientos con alisertib o barasertib, ya que con todos ellos se observa un doble pico. En los histogramas, teniendo como

referencia la curva del isotipo, la correspondiente a las células no tratadas y tratadas exclusivamente con Z-VAD se encuentra desplazada hacia la derecha, indicativo de que estas células mantenían el citocromo c confinado en las mitocondrias. De hecho, la Figura 5.42B confirma que menos del 5 % de las células control presentaban un contenido reducido de citocromo c. No obstante, tanto alisertib como barasertib a dosis bajas y altas en presencia y ausencia de Z-VAD provocaban el ensanchamiento de la curva y su desdoblamiento en dos picos (Fig. 5.42A). El hecho de que el pico correspondiente a las células que retienen el citocromo c apareciera desplazado hacia la derecha con respecto al observado en las células no tratadas probablemente se debía al incremento del tamaño celular y del número de mitocondrias por célula a causa de los tratamientos. Por otro lado, la Figura 5.42B evidencia que el tratamiento con 100 nM de alisertib provocó la salida del citocromo c en más 80 % de las células, mientras que este porcentaje se redujo casi a la mitad cuando la dosis de alisertib se subió a 5 μ M, y en ningún caso Z-VAD consiguió prevenir eficazmente dicha liberación. En cambio, ambas dosis de barasertib indujeron la salida del citocromo c en, aproximadamente, el 60 % de las células, pero esta fue reducida por la acción de Z-VAD en torno a un 20 % en el caso de 125 nM y un 30 % con 5 μ M.

En el caso de las células MM.1S DKO, los histogramas (Fig. 5.42E) no reflejan cambios tan evidentes en cuanto a la localización del citocromo c tras los tratamientos. En este caso, el histograma sugiere la presencia de dos picos superpuestos cuando las células se trataron con alisertib a 100 nM, indicando que parte del citocromo c podría haber sido liberado de las mitocondrias (50-55 %), y aunque en presencia de Z-VAD estos no se observan, una parte de la población se encuentra ocupando la margen izquierda del histograma, lo que indicaría que Z-VAD previno parcialmente la salida del citocromo c (en torno a un 20 %), tal y como recoge la Figura 5.42F. No obstante, estos resultados deberían confirmarse utilizando una línea celular control adecuada o mediante técnicas alternativas, como fraccionamiento subcelular o inmunofluorescencia.

Por lo general, los resultados de ambas líneas celulares correlacionan muy bien con sus respectivos niveles de muerte y caída del potencial mitocondrial inducidos (Figs. 5.42C y D para MM.1S *wild-type* y Figs. 5.42G y H para MM.1S DKO). Con los tratamientos los porcentajes de células MM.1S *wild-type* y DKO que se marcaron con Anexina V (apoptosis) y eran negativas para el marcaje con DiOC₆(3) (pérdida del potencial mitocondrial) son coherentes con los obtenidos para la salida del citocromo c, mientras que el porcentaje de células marcadas únicamente con 7-AAD fue desdeñable. No obstante, existe una subpoblación de células MM.1S *wild-type* negativa para ambos marcajes al tratarlas con los inhibidores de las proteínas Aurora $\pm$ Z-VAD. Esto se traduce en una pérdida del potencial mitocondrial y en la ausencia de expresión de fosfatidilserina en la semicapa externa de la membrana celular, lo que podría

correlacionar con etapas tempranas de la apoptosis, donde el citocromo c todavía no habría sido liberado. Por otro lado, un pequeño porcentaje de las células MM.1S *wild-type* y DKO fueron positivas para Anexina V tras los tratamientos, pero mantuvieron el potencial mitocondrial, lo que sugiere que la disipación del potencial mitocondrial en estas células era un evento tardío que dependía parcialmente de caspasas.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa acontecida tras la activación de la vía apoptótica mitocondrial trae consigo la disipación del potencial de membrana mitocondrial y el cambio de localización subcelular del citocromo c de la mitocondria al citosol [42, 902]. En el caso de los inhibidores de Aurora quinasa, son cuantiosos los estudios *in vitro* que han detectado una mayor abundancia de citocromo c citosólico tras la acción de inhibidores de esta familia, incluidos alisertib, MK8745, barasertib, ZM447439, danusertib y VX-680, en diferentes modelos celulares de tumores sólidos y sanguíneos y, en general, esta ubicación del citocromo c se ha vinculado con la activación de las caspasas-9 y -3 y el procesamiento de PARP, lo que permite consumar la apoptosis [501, 502, 525, 526, 558, 683, 726, 769, 903, 904]. Sin embargo, ninguno de ellos ha evaluado simultáneamente la variación del potencial mitocondrial, por lo que el presente estudio sería el primero, hasta donde sabemos, que establece una correlación positiva entre la despolarización mitocondrial y la salida del citocromo c derivada del tratamiento con inhibidores de Aurora quinasa.

Curiosamente, nuestros resultados parecen apuntar a que alisertib provocaba la salida del citocromo c en las células MM.1S DKO tanto en presencia como en ausencia de Z-VAD a pesar de no contar con las principales proteínas ejecutoras de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Por lo tanto, nuestros datos plantearían la existencia de mecanismos independientes de Bax y Bak que permiten que el citocromo c sea liberado de la mitocondria, tal y como han propuesto diversos autores. Algunos simplemente se percataron de dicho evento cuando MEFs deficientes en Bax y Bak sufrían estrés en el retículo endoplásmico y se les privaba levemente de suero [905], mientras que otros propusieron distintos mecanismos. Tal es el caso de *Mizuta et al.*, quienes sugirieron que una(s) serín-proteasa(s) desconocida(s) mediaba(n) en la salida del citocromo c de la mitocondria de MEFs Bax/Bak DKO sometidos a la combinación de A23187 (ionóforo de calcio) y ácido araquidónico [906]; en cambio, dos estudios propusieron que el citocromo c se escapaba de la mitocondria a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en estas mismas células cuando se trataban con ácido betulínico o queleritrina [907, 908]; *Lei et al.* asociaron el cambio conformacional de Bcl-2 promovido por gossipol con la liberación del citocromo c y la posterior muerte de fibroblastos embrionarios transformados con el virus SV40 que procedían de ratones Bax/Bak DKO [909]; y *Nutt et al.* demostraron que dosis altas de trióxido de arsénico provocaban estrés oxidativo que mediaba en la salida del citocromo c y en la muerte por necrosis de MEFs Bax/Bak DKO [910].

Por otro lado, la literatura recoge discrepancias acerca de la dependencia de la liberación del citocromo c por las caspasas, posiblemente debido al modelo de estudio y a los estímulos apoptóticos empleados. Algunos estudios, al igual que parte de los resultados de este trabajo, defienden que las caspasas no participan en dicha liberación cuando es propulsada por estímulos tan variados como radiación ultravioleta (B), estaurosporina, actinomicina D, peróxido de hidrógeno, la expresión ectópica de tBid y la sobreexpresión de Bax [911–915]. No obstante, cuando las células sobreexpresaban Bax o se exponían a radiación ultravioleta B, aunque Z-VAD no retenía el citocromo c en las mitocondrias, el potencial mitocondrial se conservaba [912, 914]. En cambio, *Chen et al.* determinaron que las células de mieloma múltiple IM-9 sometidas a estrés genotóxico liberaban el citocromo c en dos fases distintas, una temprana en la que la salida del citocromo c era discreta y no se veían afectados el potencial de membrana mitocondrial ni los niveles de ATP, y una tardía en la que se producía una liberación masiva de esta proteína apoptogénica mediada por caspasas acompañada de la caída del potencial mitocondrial y los niveles de ATP [916].

En conclusión, si bien los resultados aquí obtenidos sugieren que la exposición a los inhibidores de Aurora A y B provoca la liberación del citocromo c incluso en ausencia de Bax y Bak, la dificultad del marcaje utilizado para estudiar la salida del citocromo c y otros posibles factores intrínsecos a los tratamientos indican que estos resultados deberían comprobarse mediante técnicas complementarias, como inmunohistoquímica o fraccionamiento subcelular seguido de análisis por *Western Blot*. Además, para poder obtener conclusiones más robustas, deberían incluirse en dichos ensayos los puntos que quedaron por evaluar en las células MM.1S DKO y las células MM.1S ϕ C2 expuestas a todos los tratamientos.

5.3. Estudio de la sensibilidad de células de mieloma múltiple a los inhibidores de Hsp90 y de su mecanismo de acción

La producción y secreción de cantidades muy elevadas de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas es una propiedad que define al mieloma múltiple, por lo tanto, estas células deben lidiar con el estrés proteotóxico derivado de estos procesos para mantenerse con vida [584]. Para ello, disponen de diferentes herramientas, incluyendo la vía de respuesta a proteínas desplegadas (vía UPR), la vía de degradación ubiquitina-proteasoma, la autofagia y los agregomas [584]. En este contexto, las chaperonas, entre las que se incluyen las proteínas de choque térmico, reciben proteínas desplegadas o mal plegadas de la vía UPR y agregados de estas por parte de los agregomas para plegarlas adecuadamente, por lo que su papel en la regulación del plegamiento de las inmunoglobulinas y en el mantenimiento de la homeostasis proteica es decisivo [584]. Además, las proteínas de choque térmico también favorecen la supervivencia del mieloma a otros

niveles, por ejemplo, impidiendo la apoptosis de las células malignas o estabilizando oncoproteínas [584]. Por tanto, todo esto las convierte en atractivas dianas para atacar al mieloma.

De las cinco familias de proteínas de choque térmico que existen, en el mieloma únicamente se han testado inhibidores frente a dos de ellas: Hsp70 y Hsp90 [584]. Mientras que los inhibidores de Hsp70 todavía se encuentran en fases tempranas de desarrollo, los de Hsp90 han demostrado actividad antitumoral frente al mieloma *in vitro* e *in vivo*, y algunos de ellos han llegado a ser evaluados a nivel clínico en esta enfermedad [410–412, 584, 917–919]. Por ello, en esta sección se quiso evaluar la respuesta de células de mieloma *wild-type* y deficientes en Bax y Bak a los inhibidores de Hsp90 17-AAG y KW-2478 y ahondar en el mecanismo de muerte que desencadenan.

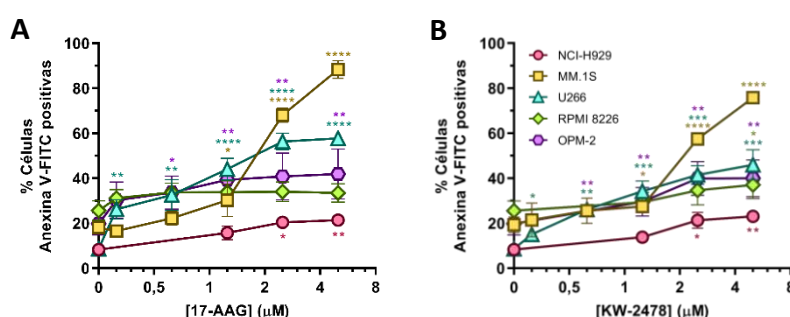


Figura 5.43 | Sensibilidad de diferentes líneas celulares de mieloma múltiple a inhibidores de Hsp90. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos y se expusieron durante 24 horas a concentraciones crecientes (0-5 μ M) de 17-AAG (A) y KW-2478 (B). Tras este tiempo, se determinó la muerte inducida en cada línea por cada compuesto mediante marcaje con Annexina V-FITC y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de $n=2-5$ experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* desapareado de dos colas, comparando cada concentración de cada inhibidor respecto a su control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

La Figura 5.43 refleja una sensibilidad variable a los inhibidores de Hsp90 en función de la línea celular, aunque la respuesta de cada línea a ambos inhibidores es similar. Es decir, 17-AAG y KW-2478 apenas acaban con el 20 % de las células NCI-H929 en el mejor de los casos, mientras que en las células MM.1S, la toxicidad de ambos compuestos se incrementa progresivamente con la dosis, pasando de una mortalidad de alrededor del 20 % con la concentración más baja de los dos inhibidores, a niveles de muerte de en torno al 70-80 % con la dosis más elevada. Esta tendencia ascendente también se observa en las células U266, aunque en este caso los compuestos no llegan a ser tan letales, ya que la apoptosis inducida por la máxima concentración de 17-AAG y KW-2478 ronda el 50 % y el 40 %, respectivamente. Por último, las células RPMI 8226 y OPM-2 ya presentaban un nivel de apoptosis basal relativamente elevado (20-30 %) y, pese a ello, la apoptosis inducida por ambos inhibidores se mantiene entre el 30 % y 40 % incluso con la dosis más alta. Por lo tanto, de estos resultados se deduce que las células MM.1S son las más sensibles a los dos inhibidores de Hsp90 testados, seguidas de las células U266, mientras que las células

NCI-H929, RPMI 8226 y OPM-2 se muestran resistentes a las dosis probadas. Además, si estos resultados se comparan con los obtenidos en las células A549 (Fig. 4.6), es evidente el mayor potencial citotóxico de estos inhibidores a tiempos cortos en las células de mieloma que en las de cáncer de pulmón.

Estos resultados están en la línea de datos publicados relativos al potencial antitumoral de los inhibidores de Hsp90 como monoterapia en el mieloma múltiple y en otros tipos de tumores. 17-AAG ya demostró su capacidad de inhibir el crecimiento de las células U266 y de inducir niveles moderados de apoptosis en esta línea celular y en células de pacientes tras 72 horas de exposición [570]. NVP-HSP990 mostró una eficacia variable en un panel de 10 líneas celulares de mieloma, pues seis de ellas fueron muy sensibles, dos moderadamente sensibles y en otras dos la toxicidad fue incompleta incluso a las dosis más altas; además, también resultó ser eficaz en un porcentaje elevado de células primarias de mieloma múltiple, mientras que las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) no se veían apenas afectadas [920]. *Okawa et al.* encontraron que SNX-2112 era más potente que 17-AAG tanto en tumores sólidos como en cánceres hematológicos, y en cuanto al mieloma múltiple, este compuesto inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*, y promueve su muerte sin afectar a los PBMCs [921]. Por otro lado, 17-AAG reducía sensiblemente la viabilidad de células de cáncer de mama y de leucemia, y AUY922 hacía lo propio en estas últimas y en células de cáncer de ovario, pero variantes multirresistentes de estas células no se mostraban excesivamente afectadas por estos compuestos [922]. Estudios como los mencionados promocionaron la entrada en fase clínica de 18 inhibidores de esta familia; sin embargo, estos ensayos han tenido que posponerse o darse por concluidos dada su limitada eficacia y sus toxicidades asociadas. Pese a ello, estrategias combinatorias con otras terapias se encuentran bajo estudio, proporcionando por el momento resultados satisfactorios [408].

En vista de la intensa respuesta de las células MM.1S a ambos inhibidores, se decidió testarlos en la sublínea deficiente en Bax y Bak.

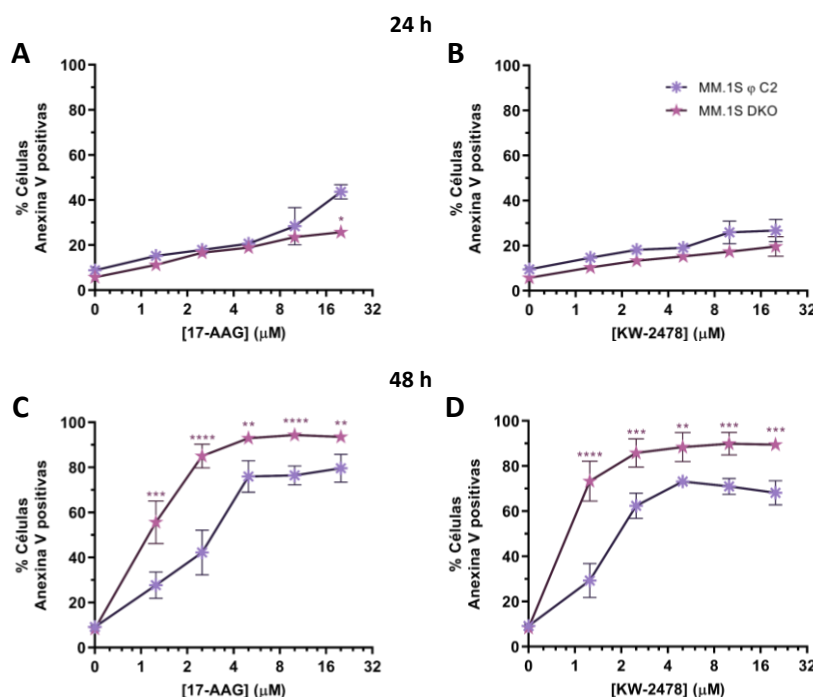


Figura 5.44 | Sensibilidad de células MM.1S deficientes en Bax y Bak a inhibidores de Hsp90. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células de cada línea celular en 500 μ l en placas de 48 pocillos y estas se trataron con concentraciones crecientes (0-20 μ M) de 17-AAG (A y C) y KW-2478 (B y D) durante 24 y 48 horas. Finalizados los tratamientos, se determinó la muerte desencadenada en cada línea por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-FITC/DY634 y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-6 experimentos independientes, y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* desapareado de dos colas, comparando para cada concentración y tiempo el efecto entre ambas líneas celulares. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

Si se comparan los resultados de la Figura 5.44 a 24 horas con los obtenidos para las células MM.1S *wild-type* (Fig. 5.43), queda patente que las líneas modificadas se encuentran menos sensibilizadas a la acción citotóxica de ambos inhibidores de Hsp90 que las células parentales. De hecho, los niveles máximos de apoptosis en las células MM.1S *wild-type* son de, aproximadamente, el 80 % en ambos casos, mientras que en las líneas modificadas no alcanzan el 50 % incluso cuadruplicando la dosis más alta de cada inhibidor. Por otro lado, la menor afectación de las células MM.1S ϕ C2 con ambos compuestos respecto a las células *wild-type* denota que los procesos de infección y/o posterior selección de los clones podrían haber provocado cambios en ellas que habrían ralentizado su respuesta a estos inhibidores.

Analizando más en detalle el efecto de los inhibidores en las células MM.1S modificadas, la Figura 5.44 desvela una sensibilidad más bien modesta de las células MM.1S DKO y su control de infección a ambos inhibidores de Hsp90 cuando los tratamientos duraban 24 horas, pero elevada cuando los compuestos se dejaban actuar durante 48 horas. 24 horas de exposición a los fármacos evidenciaba que 17-AAG era ligeramente más citotóxico a dosis altas en las células control que en las que no poseen Bax ni Bak (40-50 % de apoptosis frente al 20-30 %), mientras

que la apoptosis promovida por KW-2478 alcanzó valores máximos cercanos al 30 % en las células MM.1S ϕ C2 e inferiores al 20 % en las MM.1S DKO; sin embargo, el efecto citotóxico de los compuestos se disparaba cuando estos actuaban durante 48 horas. En este contexto, la muerte inducida incrementaba progresivamente al aumentar la concentración de los fármacos, pero al alcanzarse una dosis concreta de cada uno en cada línea celular se observa un “efecto plateau”. Por otro lado, resulta llamativo que tanto 17-AAG como KW-2478 inducían cotas de muerte máximas más elevadas en las células DKO que en las vector vacío (≥ 90 % en DKO frente a, aproximadamente, 70-80 % en la línea control), un efecto que podría estar relacionado con la modificación de la sensibilidad de las células MM.1S ϕ C2 a consecuencia del proceso de infección y selección de los clones. A diferencia de los resultados aquí mostrados, un estudio previo puso de manifiesto que la ausencia de Bax y/o Bak en distintos modelos celulares (MEFs y células tumorales de mesotelioma y cáncer de pulmón) confería resistencia frente a la inhibición farmacológica de Hsp90 (ganetespib, PU-H71, 17-AAG y radicicol) en comparación con las células *wild-type*, pero la sobreexpresión transitoria de Bax en MEFs Bax^{-/-}Bak^{-/-} restauraba la sensibilidad a ganetespib [568]. No obstante, es posible que las discrepancias entre nuestros resultados y los del citado estudio se deban a la utilización de modelos celulares diferentes. Por otro lado, otros trabajos han concluido que Bax es necesaria para la inducción de la apoptosis en células las células HCT-116 en respuesta a 17-AAG [923, 924].

Puesto que las células carentes de Bax y Bak son altamente sensibles a ambos inhibidores de Hsp90 tras 48 horas de tratamiento, quisimos averiguar si 17-AAG y KW-2478 activaban la ruta extrínseca de la apoptosis cuando Bax y Bak están ausentes, de manera que se evaluó el papel de la caspasa-8 en la muerte inducida por estos compuestos mediante su inhibidor específico, Z-IETD, en las células MM.1S modificadas.

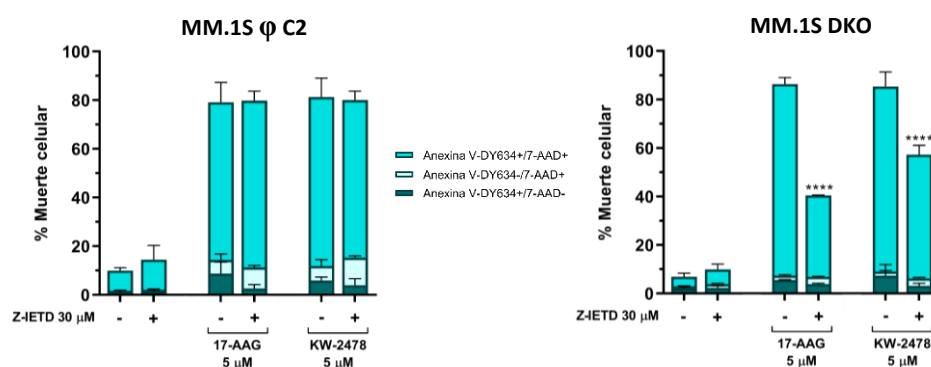


Figura 5.45 | Efecto de la inhibición de la caspasa-8 en células MM.1S deficientes en Bax y Bak expuestas a inhibidores de Hsp90. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células MM.1S ϕ C2 y DKO en 500 μ l en placas de 48 pocillos. A continuación, se pre-incubaron con Z-IETD a una concentración de 30 μ M durante una hora como mínimo y fueron tratadas con los inhibidores de Hsp90 a las dosis indicadas durante 48 horas, renovando Z-IETD a las 24 horas. Finalizados los tratamientos, se determinó la muerte desencadenada en cada línea por cada compuesto mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo. Los resultados son la media $\pm$ SD de n=2-3 experimentos independientes, y el análisis estadístico realizado ha sido el two-way ANOVA con el posterior análisis de Sidak, comparando el efecto

de la inhibición de la caspasa-8 respecto a la no inhibición en las células no tratadas y tratadas con cada inhibidor de Hsp90. ****p < 0,0001.

Tal y como se observa en la Figura 5.45, Z-IETD consiguió rebajar la toxicidad de los compuestos hasta, aproximadamente, el 40 % y 60 % en las células DKO, siendo más eficaz en la neutralización de 17-AAG, pero no tuvo ningún efecto sobre la muerte inducida por ambos compuestos en la línea control. Por otra parte, teniendo en cuenta el marcaje utilizado en este caso, se observa que en ambas líneas celulares predomina el doble marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD, asociado a la fase de apoptosis tardía, y que el porcentaje de células que se encuentra en la fase temprana de la apoptosis (Anexina V-DY634+/7-AAD-) es muy pequeño. Sin embargo, sí se aprecian diferencias en el marcaje exclusivo con 7-AAD, pues la población de células DKO necróticas es despreciable, pero en las células MM.1S ϕ C2 representa entre el 5 % y 10 % de las células muertas, correspondiendo este último porcentaje a las células tratadas con los inhibidores de Hsp90 y pre-incubadas con Z-IETD. Dado que las células MM.1S DKO, que carecen de las proteínas efectoras de la vía apoptótica intrínseca, se muestran parcialmente protegidas frente a 17-AAG y KW-2478, y las células MM.1S ϕ C2 no ven alterada su sensibilidad a estos compuestos en presencia del inhibidor específico de caspasa-8, se puede deducir que esta caspasa participa, al menos parcialmente, en la muerte inducida por ambos inhibidores de Hsp90 en ausencia de Bax y Bak, activando posiblemente la ruta extrínseca de la apoptosis, independiente de la mitocondria. Sin embargo, el hecho de que al menos el 40 % de las células DKO sucumban en presencia de ambos compuestos cuando la caspasa-8 está inactiva invita a pensar que los inhibidores de Hsp90 activan rutas moleculares adicionales que desembocan en la muerte de las células a través de otras vías distintas a las estudiadas.

Una posible ruta de muerte alternativa podría involucrar al retículo endoplásmico, el orgánulo responsable de la síntesis, modificación y adecuado plegamiento de proteínas unidas a orgánulos y que son secretadas [925]. Cuando la homeostasis de esta estructura celular se ve perturbada a causa de estreses como la depleción de Ca^{2+} o hipoxia y se incrementan los niveles de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo, las células activan una ruta de señalización adaptativa denominada vía UPR, controlada principalmente por tres sensores: PERK, IRE1 y ATF6 [925, 926]. En estas situaciones, esta respuesta celular pretende combatir el estrés generado en el retículo y restaurar la proteostasis atenuando para ello la síntesis proteica, eliminando las proteínas desplegadas y/o mal plegadas e incrementando la capacidad del orgánulo para plegar proteínas [926, 927]. No obstante, si la situación de estrés se mantiene y la vía UPR no es capaz de solventarla, las células pueden activar distintos tipos de muerte celular, incluida la apoptosis [926]. Hoy en día existe cierta controversia acerca de la implicación de la mitocondria en la apoptosis activada por la respuesta a estrés en el retículo, pues una corriente sostiene que dicho estrés provoca la liberación del citocromo c y defiende que células Bax/Bak DKO son

resistentes a estímulos inductores de estrés en el retículo, mientras que otra sugiere que la apoptosis inducida puede ser dependiente o independiente de la mitocondria [926, 928–932]. En el caso de los inhibidores de Hsp90 diversos estudios apuntan a que estos compuestos provocan estrés en el retículo endoplásmico en distintos tipos celulares tumorales y la apoptosis inducida es ejecutada a través de la vía mitocondrial [933, 934]. Además, en el caso del mieloma múltiple, cuyas células son altamente dependientes de la vía UPR y de las chaperonas debido a la elevada producción de inmunoglobulinas, radicicol y 17-AAG activarían las caspasas-3 y -8/-9, vinculadas a las rutas extrínseca e intrínseca de la apoptosis [935].

A comienzos del nuevo milenio se postuló que Hsp90 bloqueaba la vía apoptótica intrínseca mediante su unión directa a Apaf-1, lo que impide su oligomerización mediada por el citocromo c y, en consecuencia, la activación de las caspasas-9 y -3 [936]. Esto invitaba a pensar que la inhibición de esta chaperona pondría en marcha esta vía. Sin embargo, estudios posteriores con inhibidores de Hsp90 han mostrado respuestas muy diversas. *Taiyab et al.* detectaron que geldanamicina y 17-AAG desencadenaban la apoptosis mitocondrial inducida por estrés en el retículo endoplásmico en células de histiocitoma de rata [934], mientras que otros autores, por el contrario, han detectado solamente la activación de las caspasas-8 y -3 ante NVP-HSP990 en el mieloma múltiple y frente a 17-DR en el cáncer de mama [937, 938]. Finalmente, se ha sugerido la activación de las rutas extrínseca e intrínseca de la apoptosis al encontrar activadas las caspasas-8, -9 y -3 en respuesta a SNX-2112 y BIIB021 en células de ALL, mieloma múltiple y síndrome mielodisplásico [921, 939, 940]. En este sentido, otro estudio propuso que la muerte inducida por ganetespib está mediada por la vía intrínseca y que la caspasa-8 se activa como consecuencia de un bucle de amplificación mitocondrial [568]. No obstante, también se ha descrito que algunos inhibidores de estas chaperonas activan otros tipos de muerte celular programada, como DHQ3, que impulsa la necroptosis en células de cáncer de mama [938].

Retrocediendo a la vía apoptótica de los receptores mortales, algunos autores han intentado descifrar el mecanismo del que se valen los inhibidores de Hsp90 para activar dicha vía. En este sentido, *Yao et al.* detectaron actividad antitumoral de 17-AAG en células de cáncer colorrectal y la implicación de la caspasa-8 y FADD en la muerte inducida por este compuesto, y llegaron a proponer que este inhibidor activaba la ruta extrínseca de la apoptosis a través de la regulación positiva del receptor mortal DR5 mediada por el factor de transcripción CHOP [941]. Otro estudio también apuntó a la sobreexpresión de DR5 en presencia de SNX-2112 pero a través de la vía JNK-p53-autofagia y, además, este compuesto sinergizaba con TRAIL en células HeLa [942].

En resumen, y a falta de ensayos que ayuden a esclarecer el mecanismo de acción de 17-AAG y KW-2478 en el mieloma múltiple, los resultados aquí obtenidos ponen de manifiesto que la acción citotóxica de estos compuestos varía en función de la línea celular y que esta es debida a la activación de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca y a otros mecanismos de

muerte independientes de caspasa-8 y de Bax y Bak, como puede ser la vía UPR, que podría provocar la muerte celular por estrés en el retículo endoplásmico sin involucrar a las mitocondrias. Por ello, sería interesante evaluar el papel de otras caspasas y de moléculas clave en este y otros tipos de muerte celular en la muerte desencadenada por estos compuestos y extender los estudios a la línea parental, para determinar posibles variaciones e intentar comprender el mecanismo de acción de los inhibidores de Hsp90 en el mieloma múltiple.

5.4. En busca de estrategias sinérgicas en el mieloma múltiple

Uno de los talones de Aquiles en el mieloma múltiple es la falta de comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a esta neoplasia, aunque los avances de los últimos años en este campo han permitido el desarrollo de nuevos compuestos activos frente a ella [381, 943]. De hecho, la reciente irrupción en el ámbito clínico de los inhibidores del proteasoma, inhibidores de histona deacetilasas, fármacos inmunomoduladores y los anticuerpos monoclonales ha conseguido mejorar de forma notoria la supervivencia de los pacientes; sin embargo, pese a ello, a día de hoy el mieloma múltiple continua siendo una enfermedad incurable [302].

Ante este escenario, se deben continuar buscando nuevas aproximaciones terapéuticas hasta dar con las óptimas para superar esta enfermedad. En este sentido, los regímenes combinatorios de dos o más terapias convencionales y/o novedosas están adquiriendo protagonismo en el tratamiento antitumoral. En el caso del mieloma, dos potenciales candidatos a combinar entre sí o con otros agentes son los miméticos BH3 y los inhibidores de Aurora quinasa. De hecho, ambas familias de compuestos han demostrado actividad anti-mieloma en fase preclínica y, gracias a ello, algunos se encuentran siendo evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento de esta enfermedad en solitario y combinados con otras terapias, obteniéndose en algunos casos resultados prometedores [944–948].

Por lo tanto, teniendo en cuenta el enfoque terapéutico actual, en esta tesis se han explorado numerosas aproximaciones *in vitro* basadas en combinaciones de los distintos compuestos utilizados entre sí o con otros fármacos con distintos mecanismos de acción.

5.4.1. Combinación de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3

Dado que la combinación de los inhibidores de Hsp90 y los miméticos BH3 mostró sinergia en las células A549 (carcinoma de pulmón) (sección 4.5.2), se decidió evaluar esta estrategia en células de mieloma múltiple. Para estos ensayos se utilizaron dosis subtóxicas de 17-AAG, KW-2478 y de los cuatro miméticos BH3 habituales, las cuales se adaptaron a cada línea celular de estudio.

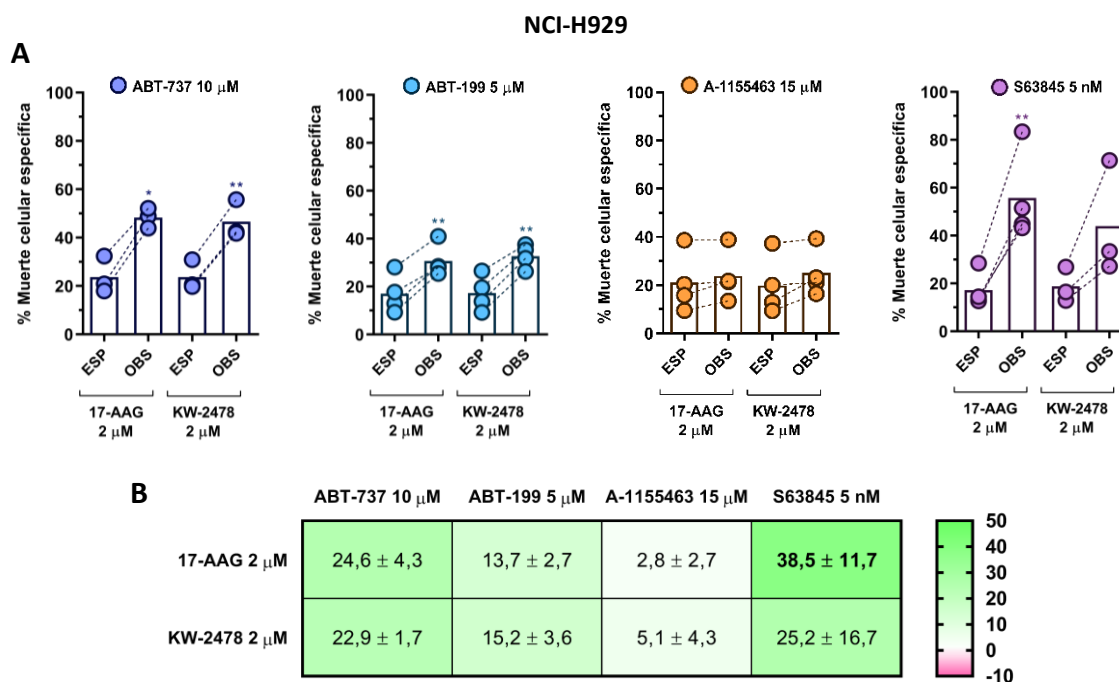


Figura 5.46 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, se añadieron los compuestos a las concentraciones indicadas y se dejaron actuar durante 24 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

En la primera línea celular estudiada, NCI-H929 (Fig. 5.46), los mejores resultados derivaron de la combinación de 17-AAG y S63845, pues la inhibición de Mcl-1 logró incrementar de manera sustancial la actividad citotóxica de este inhibidor de Hsp90, dando lugar a una potente sinergia; en cambio, si S63845 se combinaba con KW-2478, el efecto sinérgico observado era más modesto. Una sinergia similar fue detectada cuando ABT-737 se combinaba con ambos inhibidores de Hsp90, mientras que la adición de ABT-199 se tradujo en una pequeña sinergia al aumentar levemente el efecto citotóxico de los inhibidores. Finalmente, la incorporación de A-1155463 solamente consiguió inducir un efecto aditivo.

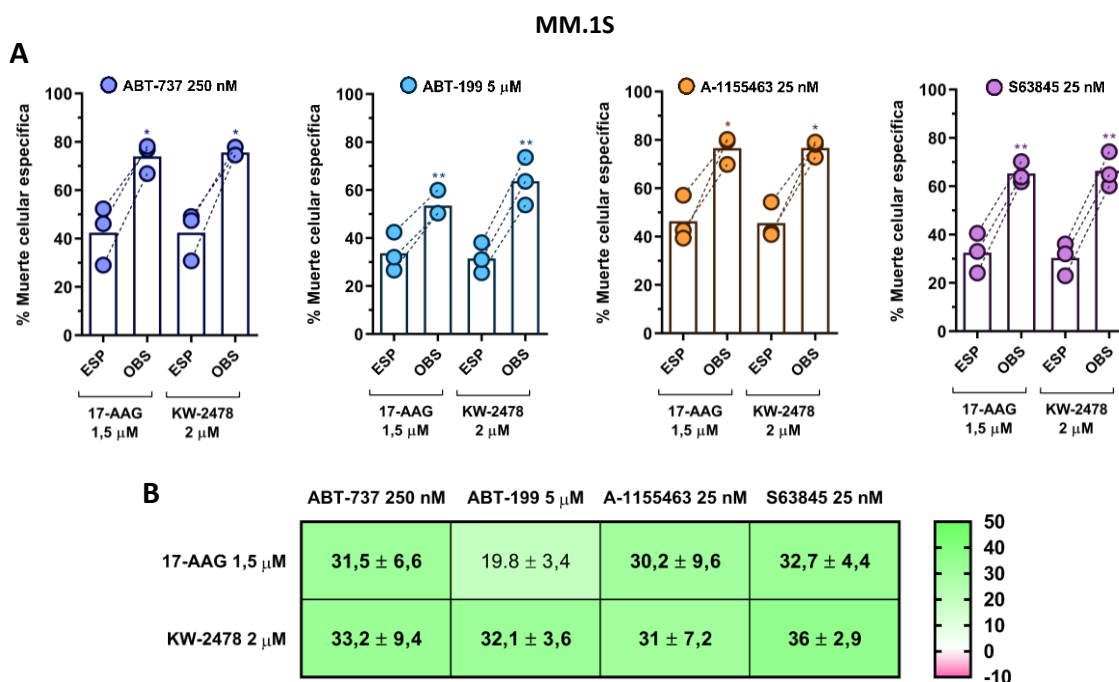


Figura 5.47 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células MM.1S. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, y a estas se les añadieron los compuestos a las concentraciones señaladas, dejándolos actuar durante 24 horas. A continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de tres experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

En las células MM.1S todas las combinaciones testadas dieron lugar a un efecto sinérgico, más o menos potente en función del mimético BH3 y el inhibidor de Hsp90 utilizados (Fig. 5.47). En concreto, la inclusión de ABT-737, A-1155463 y S63845 provocó un efecto sinérgico moderado, ya que todos ellos fueron capaces de potenciar la toxicidad de los inhibidores de Hsp90 de forma equiparable. ABT-199, por su parte, mostró una eficacia variable en función del inhibidor con el que se combinaba, pues en su presencia las células quedaron más sensibilizadas a KW-2478 que a 17-AAG, lo que implicó un efecto sinérgico similar al observado con los anteriores miméticos BH3 con el primer inhibidor y más leve con el segundo.

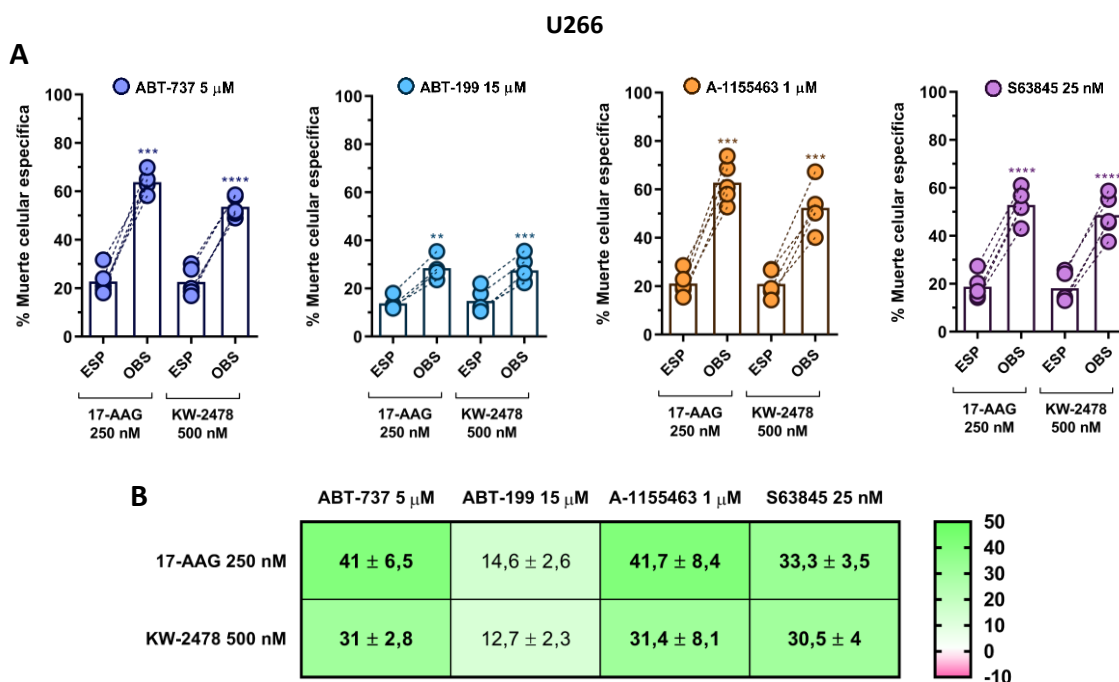


Figura 5.48 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células U266. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, se adicionaron los compuestos a las concentraciones señaladas y estos se incubaron durante 24 horas. Tras este tiempo, se determinó la muerte celular desencadenada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=4-5 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

En las células U266 todas las combinaciones ensayadas de los inhibidores de Hsp90 con los miméticos BH3 provocaron un efecto sinérgico (Fig. 5.48). Dicha sinergia fue discreta cuando ABT-199 era el mimético BH3 seleccionado, pero bastante robusta cuando 17-AAG se co-incubaba con ABT-737 y A-1155463. Sin embargo, el multi-inhibidor y el antagonista de Bcl-X_L eran ligeramente menos eficaces sensibilizando a la acción de KW-2478, al igual que S63845 cuando actuaba conjuntamente con ambos inhibidores de Hsp90.

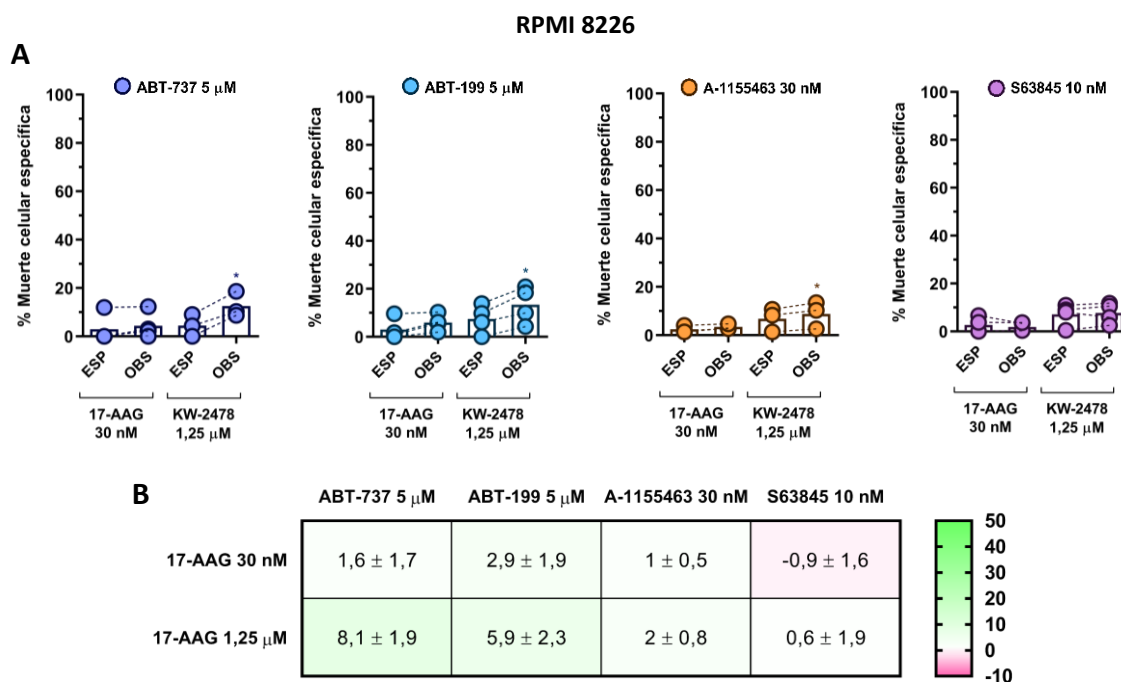


Figura 5.49 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células RPMI 8226. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, se añadieron los compuestos a las concentraciones indicadas y estos se dejaron actuar durante 24 horas. Finalizado el tratamiento, se determinó la muerte celular desatada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

Contrariamente a lo que se ha venido observando en las anteriores líneas celulares, la combinación de 17-AAG o KW-2478 con los miméticos BH3 en las células RPMI 8226 y OPM-2 resultó muy poco efectiva al inducirse un efecto aditivo en la mayoría de los casos y un pequeño efecto antagónico cuando S63845 se combinaba con 17-AAG en las células RPMI 8226 y con ambos inhibidores de Hsp90 en las células OPM-2 (Figs. 5.49 y 5.50).

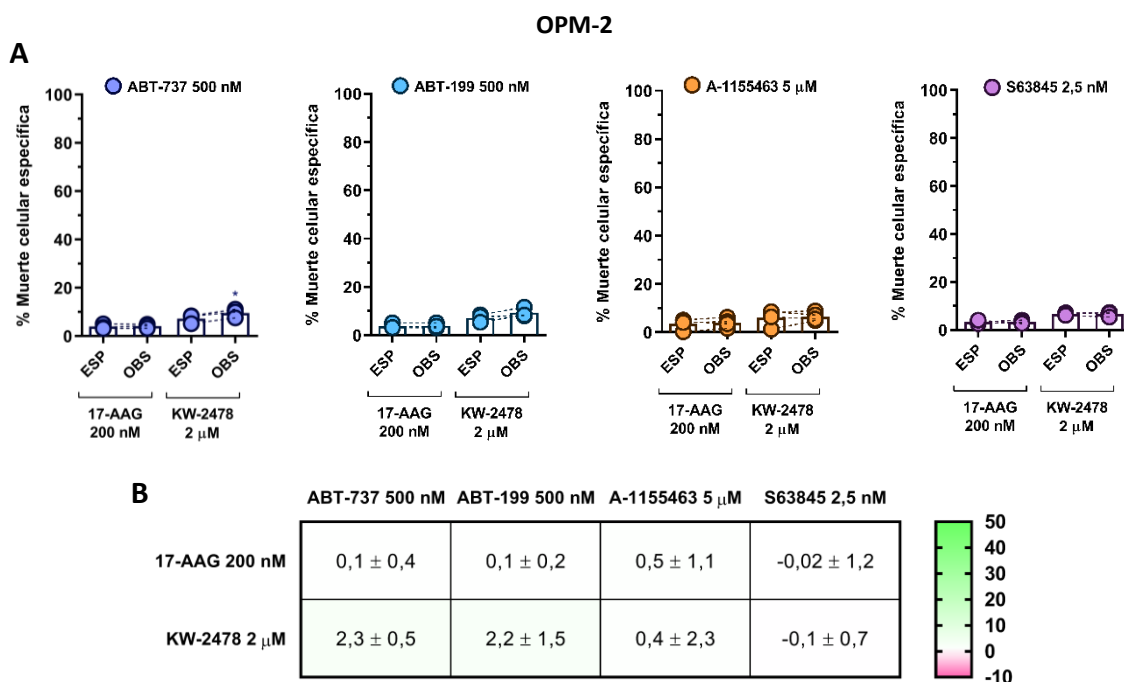


Figura 5.50 | Combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y miméticos BH3 en las células OPM-2. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, a las cuales se añadieron los compuestos a las concentraciones indicadas y estos se dejaron actuar durante 24 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

Si se valora el conjunto de los resultados, resulta llamativo que las combinaciones testadas se hayan revelado sinérgicas en algunas líneas celulares (NCI-H929, MM.1S y U266) y prácticamente inocuas en otras (RPMI 8226 y OPM-2). Además, atendiendo al bloque de células en las que los tratamientos se han mostrado eficaces, existen diferencias en la efectividad de las combinaciones dentro de una misma línea celular al cambiar de mimético BH3 e incluso de inhibidor de Hsp90. No obstante, la explicación a estas observaciones podría encontrarse en la dependencia de las células por las distintas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 para mantenerse con vida.

En este sentido, dado que Mcl-1 es la proteína que sustenta la supervivencia de las células NCI-H929, tal y como han reconocido otros autores [588], no resulta extraño que al inhibir su acción anti-apoptótica mediante S63845 se consiga el mayor rendimiento cuando se combina con los inhibidores de Hsp90, especialmente con 17-AAG (Fig. 5.46). No obstante, los resultados indican que el tándem Bcl-2/Bcl-X_L/Bcl-w y, en menor medida, Bcl-2 en solitario, también

favorecen la supervivencia de estas células cuando se exponen a los inhibidores de Hsp90, ya que su bloqueo potencia modestamente la actividad citotóxica de estos inhibidores. En el caso de las células MM.1S, el similar nivel de sinergia hallado al combinar todos los miméticos BH3 con los inhibidores de Hsp90 (Fig. 5.47) contrasta con el efecto esperado dada la alta dependencia de estas células por Bcl-X_L a nivel basal [605], lo que sugiere que los tres miembros anti-apoptóticos por separado (Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1) y el trío Bcl-2/Bcl-X_L/Bcl-w protegen en mayor o menor medida frente a la acción antitumoral de 17-AAG y KW-2478 en las células MM.1S. Por otro lado, las sinergias detectadas en las células U266 apuntan a que tanto Bcl-X_L y Mcl-1 por separado como Bcl-X_L en asociación con Bcl-2 y Bcl-w son importantes para la supervivencia de estas células, especialmente cuando se enfrentan a 17-AAG. Esto difiere de lo publicado por *Gong et al.* [588], ya que asociaron la supervivencia de estas células con el dúo Bcl-X_L/Mcl-1, pero no con cada una por separado. Además, estas células portan la translocación t(11;14), la cual se asocia en el mieloma múltiple con la sobreexpresión de Bcl-2 y bajos niveles de Mcl-1 [949]. Sin embargo, nuestros resultados indican que el nivel de expresión basal de Bcl-2 y su contribución a la supervivencia de estas células cuando se exponen a los inhibidores de Hsp90 son menores que en el caso de Bcl-X_L y Mcl-1 (Figs. 5.21 y 5.48). Finalmente, la nula eficacia de la combinación de los miméticos BH3 y los inhibidores de Hsp90 en las células RPMI 8226 y OPM-2 en las condiciones testadas contrasta con su dependencia a nivel basal según los resultados de *Gong et al.* [588], ya que ellos observaron que Mcl-1 era importante para la supervivencia de ambas líneas celulares y, en el caso de las células RPMI 8226, Bcl-X_L también era relevante, aunque en menor medida. No obstante, es posible que incrementando la dosis de los compuestos y/o suprimiendo Bcl-X_L y Mcl-1 de forma simultánea se consiga sensibilizarlas, ya que este dúo podría sustentar la supervivencia de estas células ante los inhibidores de Hsp90.

Por lo tanto, todo esto sugiere que los inhibidores de Hsp90 modifican la dependencia de las células de mieloma por las proteínas anti-apoptóticas, por ejemplo, alterando la expresión y/o la formación de complejos entre las proteínas anti- y las pro-apoptóticas, lo que puede traducirse en un aumento o disminución de la eficacia. Además, los resultados apuntan a que el efecto de 17-AAG y KW-2478 sobre dicha dependencia no es el mismo dentro de la misma línea celular, ya que, en ocasiones, la eficacia de la combinación de un determinado mimético BH3 con ambos inhibidores de Hsp90 no era la misma (por ejemplo, Fig. 5.46 S63845 o Fig. 5.47 ABT-199). Tal y como se discutió en la sección 4.5.2, son varios los estudios que han demostrado que los inhibidores de Hsp90 alteran la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 [540, 568, 569, 571], y en el caso de la línea celular de mieloma múltiple U266, se ha visto que los niveles de los tres principales miembros anti-apoptóticos decaían tras 48 horas de exposición a tanespimicina (17-AAG) [570].

A falta de estudios que se adentren en el desciframiento de las vías moleculares que subyacen al efecto inducido por estos compuestos, la inhibición simultánea de la chaperona Hsp90 y los miméticos BH3 se postula como una atractiva terapia antitumoral tanto para tumores sólidos como de origen hematológico.

5.4.2. Combinación de fármacos antimitóticos y miméticos BH3

Centrándonos ya en las combinaciones que tienen como eje central los fármacos antimitóticos, la primera aproximación que se evaluó fue la combinación concomitante de alisertib a dosis bajas con los miméticos BH3. Dado que en un trabajo previo del grupo se había evaluado el efecto de combinar simultáneamente dosis en el rango nanomolar de alisertib con concentraciones subletales de los nuevos inhibidores de Bcl-X_L y Mcl-1 en las células NCI-H929, MM.1S y U266 durante 24 y 48 horas [422], se quiso completar el estudio evaluando la combinación de alisertib en el rango nanomolar con ABT-737 y ABT-199 en las líneas celulares mencionadas, e incluyendo las líneas RPMI 8226 y OPM-2, en las que se testó la combinación de alisertib con los cuatro miméticos BH3 señalados.

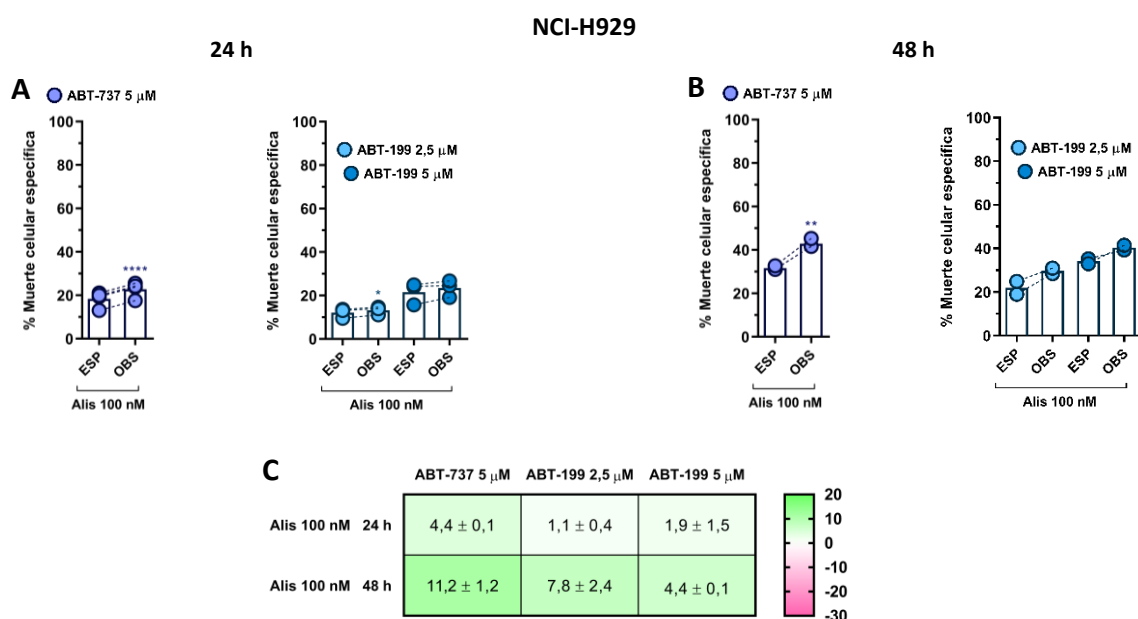


Figura 5.51 | Combinación simultánea de alisertib y miméticos BH3 en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos y los fármacos se añadieron a las dosis indicadas, dejándolos actuar durante 24 y 48 horas. A continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A y B)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib con ABT-737 y ABT-199 a las 24 y a las 48 horas. **(C)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación a 24 y 48 horas. Los resultados provienen de n=2-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; *****p* < 0,0001.

Comenzando el estudio por las células NCI-H929, la Figura 5.51 evidencia que los ABTs apenas aumentaron la toxicidad de alisertib a 24 horas cuando este se utilizaba en el rango nanomolar, lo que supuso un efecto aditivo. Esto mismo sucedió cuando actuaban conjuntamente alisertib a dosis bajas y ABT-199 durante 48 horas, mientras que si el mimético BH3 utilizado era ABT-737, la combinación resultaba mínimamente sinérgica.

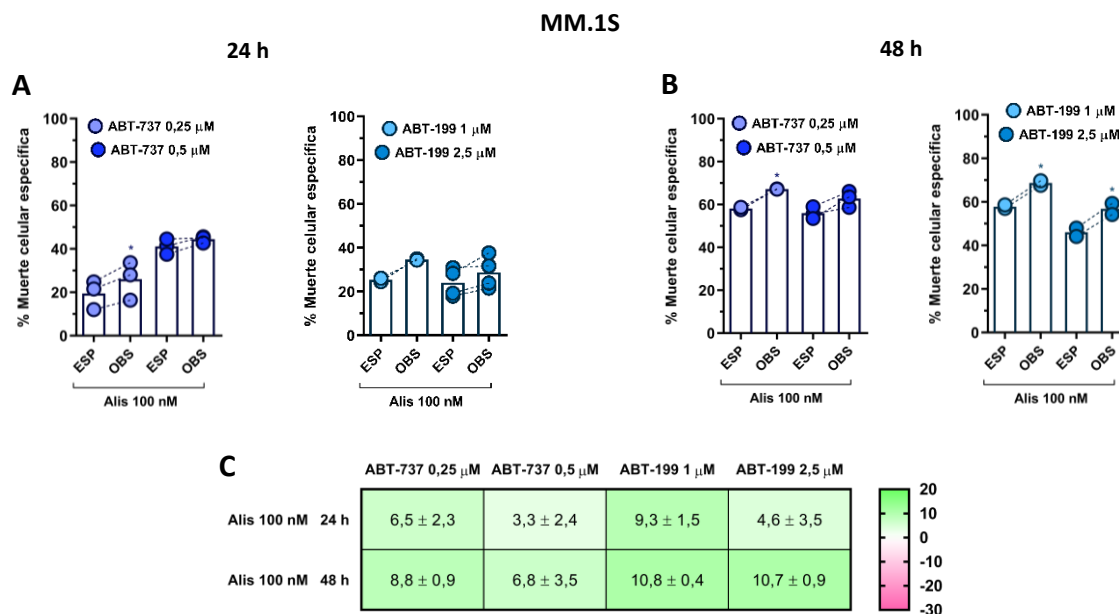


Figura 5.52 | Combinación simultánea de alisertib y miméticos BH3 en las células MM.1S. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, los compuestos se añadieron a las concentraciones indicadas y estos se incubaron durante 24 y 48 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A y B)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib con ABT-737 y ABT-199 a las 24 y a las 48 horas. **(C)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación a 24 y 48 horas. Los resultados provienen de n=2-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

En el caso de las células MM.1S, la Figura 5.52 revela que el potencial sensibilizador de ABT-737 y ABT-199 a dosis bajas de alisertib es bastante pobre a las 24 horas, haciendo que solamente se detecte un efecto aditivo con estas combinaciones. Si los tratamientos se extendían hasta las 48 horas, ABT-199 estimulaba sutilmente la acción citotóxica de alisertib a dosis bajas, pero la aditividad se mantenía en la combinación con ABT-737. En estas últimas combinaciones, es posible que el moderado potencial citotóxico de los compuestos en solitario haya condicionado los resultados, según refleja la muerte esperada (ESP) en las gráficas de la Figura 5.52B.

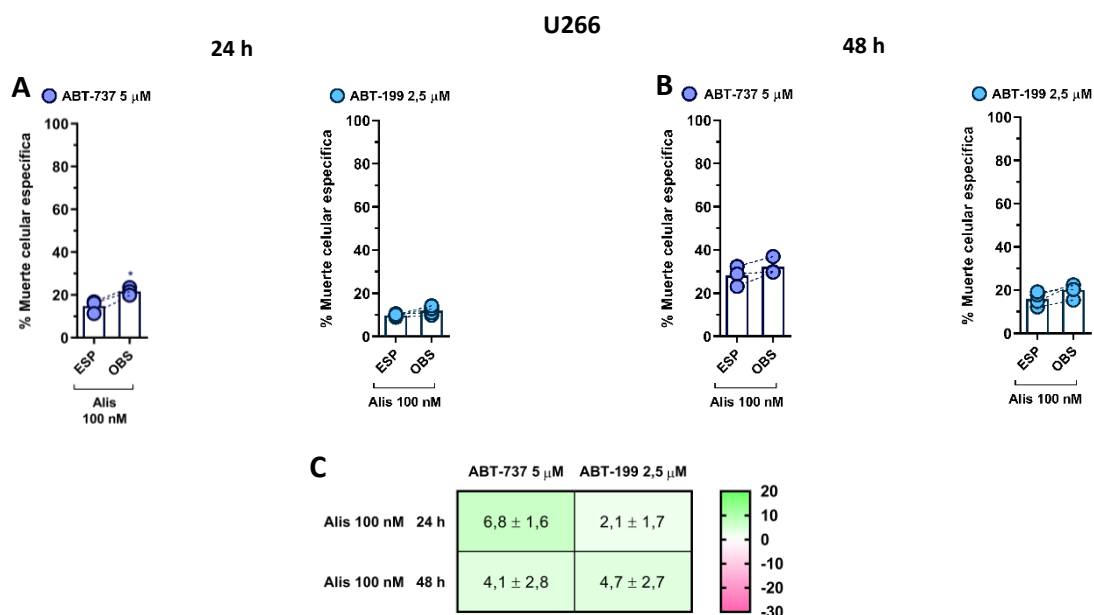


Figura 5.53 | Combinación simultánea de alisertib y miméticos BH3 en las células U266. $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 48 pocillos y expuestas a las concentraciones señaladas de los compuestos durante 24 y 48 horas. Finalmente, se determinó la muerte celular desatada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A y B)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib con ABT-737 y ABT-199 a las 24 y a las 48 horas. **(C)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación a 24 y 48 horas. Los resultados provienen de n=2-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$.

Siguiendo la tónica general de las líneas anteriores, ABT-737 y ABT-199 impulsaron levemente la mortalidad inducida por alisertib a 100 nM en las células U266 tanto a 24 como a 48 horas, lo que supuso solamente un efecto aditivo (Fig. 5.53).

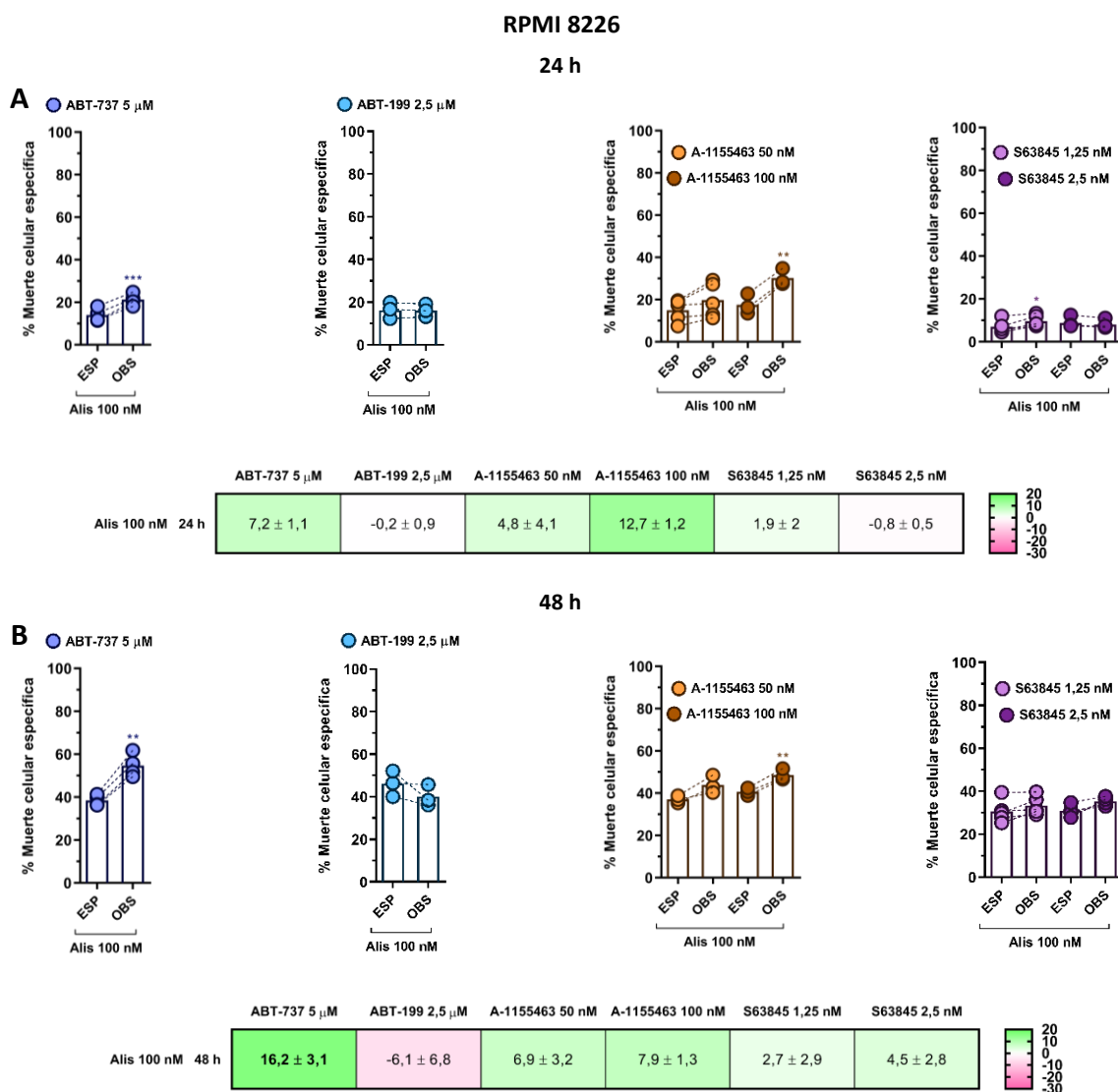


Figura 5.54 | Combinación simultánea de alisertib y miméticos BH3 en las células RPMI

8226. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, los fármacos se añadieron a las dosis señaladas y estos se incubaron durante 24 (A) o 48 horas (B). Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. Las gráficas comparan la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845, y la tabla recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación a 24 y 48 horas. Los resultados provienen de n=3-6 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Tras 24 horas de incubación, la Figura 5.54A muestra que la incorporación de ABT-199 y la dosis elevada de S63845 contrarrestaron mínimamente el efecto citotóxico de alisertib. En cambio, la combinación de alisertib con ABT-737 y la dosis menor de A-1155463 y S63845 indujeron un efecto aditivo, pero con A-1155463 a la dosis más alta se detectó una pequeña sinergia. Cuando los tratamientos se llevaron hasta las 48 horas (Fig. 5.54B), el antagonismo

derivado de la combinación de alisertib con ABT-199 se hizo más patente y, por el contrario, el observado con la dosis elevada de S63845 se transformó en un efecto aditivo. La aditividad se mantuvo con la dosis baja de los inhibidores de Bcl-X_L y Mcl-1, y en el caso de ABT-737, esta derivó en una modesta sinergia, mientras que el efecto sinérgico registrado con la dosis alta de A-1155463 se redujo a un efecto aditivo.

Finalmente, en las células OPM-2 la combinación a 24 horas de alisertib con S63845 y la dosis baja de ABT-737 desembocó en un efecto aditivo, mientras que la toxicidad del inhibidor de Aurora A en presencia de ABT-199, A-1155463 y la dosis alta de ABT-737 se redujo, produciéndose un efecto antagónico, el cual fue más intenso cuando se utilizaba el inhibidor de Bcl-X_L (Fig. 5.55A). Si los tratamientos se prolongan hasta las 48 horas, destacan la conservación del efecto antagónico observado con A-1155463 y la ligera sinergia que se produce cuando se utiliza ABT-737 a 500 nM (Fig. 5.55B).

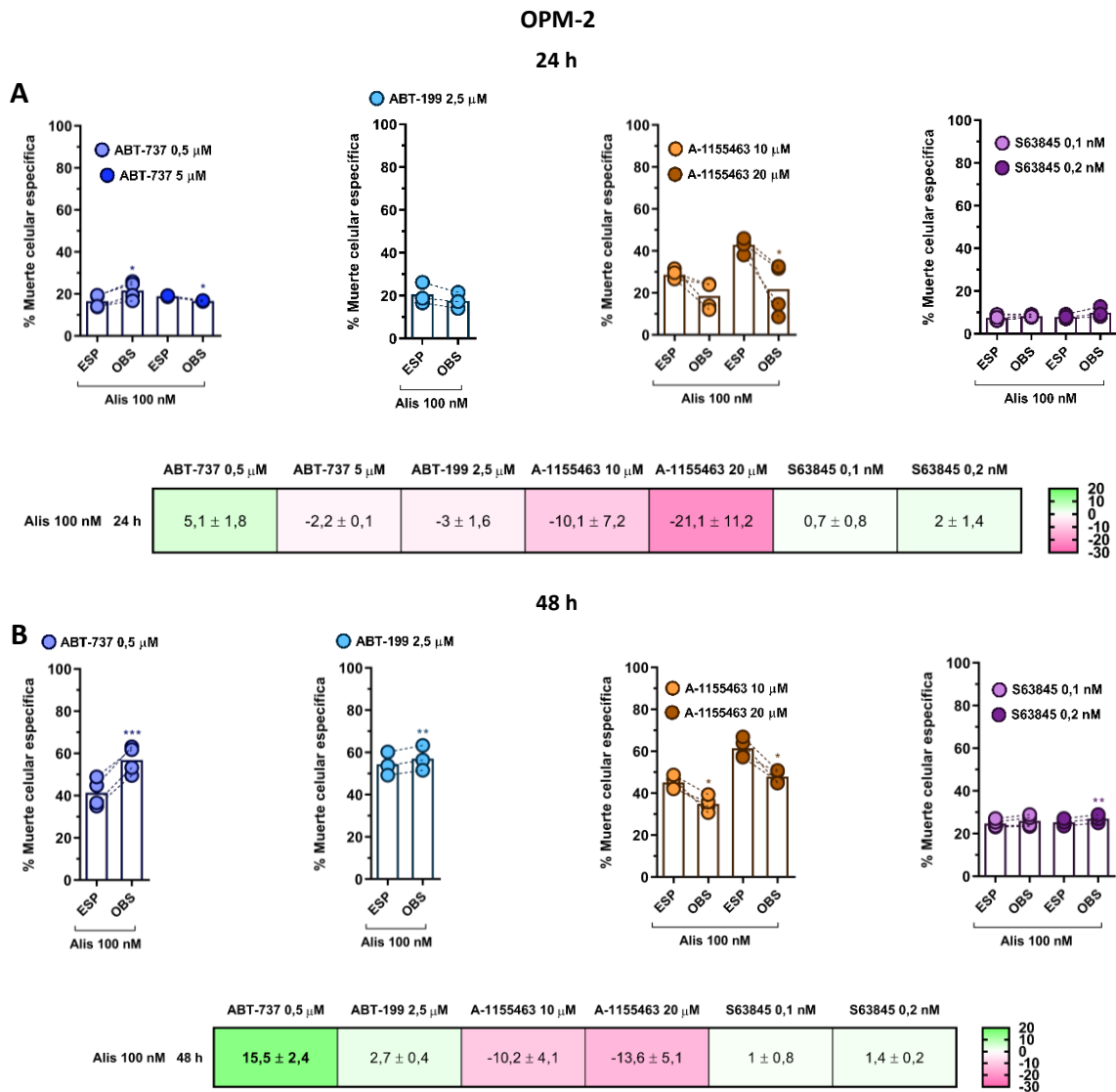


Figura 5.55 | Combinación simultánea de alisertib y miméticos BH3 en las células OPM-2. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, los fármacos se adicionaron a las dosis señaladas y estos se dejaron actuar durante 24 (A) o 48 horas (B). A

continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. Las gráficas comparan la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845, y la tabla recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación a 24 y 48 horas. Los resultados provienen de $n=2-4$ experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Todos estos resultados complementan a los obtenidos en el trabajo del grupo anteriormente citado [422] y, en conjunto, confirman que la combinación simultánea del inhibidor de Aurora A con miméticos BH3 en células de mieloma múltiple se traduce, en el mejor de los casos, en una ligera sinergia, lo que contrasta con el potente efecto sinérgico observado al combinar alisertib y ABT-737/A-1155463 en las células de cáncer de pulmón A549 (apartado 4.5.1). Por lo tanto, estos resultados evidencian la necesidad de averiguar las causas moleculares subyacentes a la distinta eficacia de estas combinaciones en función del tipo de cáncer.

A diferencia de lo que sucede con los tumores sólidos, el estudio de las combinaciones que impliquen a inhibidores de Aurora A y miméticos BH3 en neoplasias hematológicas se reduce a dos trabajos. Por un lado, se determinó que la combinación de alisertib y venetoclax era sinérgica *in vitro* en células de ALL con la fusión TCF3-HLF y esta estrategia era más efectiva inhibiendo la proliferación tumoral *in vivo* que cada agente por separado [950]. Por otro lado, el dúo alisertib/A-1331852 se postula prometedor en el tratamiento de la AML resistente a la inhibición de Bcl-X_L [951]. En el caso del mieloma múltiple, el presente estudio sería el primero en evaluar este tipo de combinaciones en esta enfermedad. Pese a que se cree que los miméticos BH3 podrían encaminar a las células que sufren una mitosis prolongada hacia un fatídico destino al neutralizar las proteínas anti-apoptóticas [156], lo cierto es que nuestros resultados en este sentido no han sido muy prometedores en el mieloma múltiple. Esta situación tal vez podría invertirse modificando algunas variables en estas combinaciones, como, por ejemplo, las dosis de los miméticos BH3 en aquellos casos en los que la muerte esperada ha sido demasiado baja o elevada, o inhibiendo simultáneamente Bcl-X_L y Mcl-1, ya que ambas proteínas, además de Bcl-2, constituyen un factor de resistencia terapéutica en el mieloma múltiple [952–954].

Por otro lado, los alentadores resultados obtenidos al combinar simultáneamente fármacos antimitóticos de distinta índole con miméticos BH3 en tumores sólidos (sección 4.5.1) nos llevó a querer averiguar si estos se repetían en células de mieloma múltiple. Puesto que las combinaciones recién evaluadas y las de un trabajo anterior [422] han demostrado una eficacia mínima de la combinación de alisertib a dosis bajas con los miméticos BH3, se decidió excluir a alisertib de este estudio, que se llevó a cabo en las células NCI-H929. Por el contrario, se incluyeron barasertib y los agentes anti-microtúbulos vincristina y docetaxel, ya que vincristina

fue ampliamente utilizada combinada con doxorrubicina y dexametasona en la década de 1990 en numerosos centros europeos como terapia de inducción en pacientes seleccionados para ser trasplantados [955].

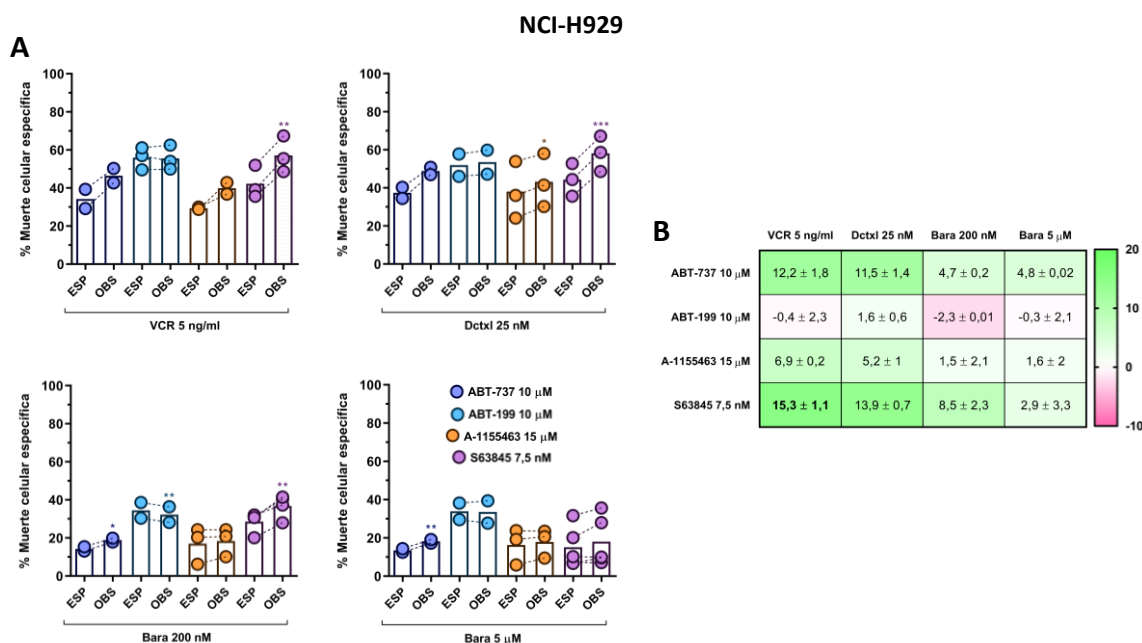


Figura 5.56 | Combinación simultánea de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos y los compuestos se añadieron a las concentraciones señaladas, dejándolos actuar durante 24 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los fármacos antimitóticos con los miméticos BH3. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=2-5 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

La Figura 5.56 expone respuestas heterogéneas de las células NCI-H929 en función de la combinación evaluada, produciéndose una pequeña sinergia solamente al combinar los agentes anti-microtúbulos con ABT-737 y S63845. No obstante, pese a que la combinación de fármacos antimitóticos y miméticos BH3 no ha resultado beneficiosa en esta línea celular, no se puede descartar que esta aproximación no lo pueda ser en otras líneas celulares de mieloma múltiple con diferentes atributos genéticos. Si se comparan los resultados obtenidos en el mieloma con los que se obtuvieron en tumores sólidos tanto en este trabajo (sección 4.5.1) como en uno anterior del grupo [418] es evidente que el bloqueo mitótico y el de los miembros anti-apoptóticos parece una estrategia prometedora solamente en tumores sólidos. No obstante, existen estudios que han demostrado que la combinación de fármacos antimitóticos de las familias aquí utilizadas y miméticos BH3 es activa frente a neoplasias hematológicas, principalmente leucemias. Por ejemplo, ABT-737 actúa sinérgicamente combinado con vincristina en modelos *in vitro* e *in vivo*

de ALL [956, 957]. Un efecto sinérgico se ha descrito también al combinar paclitaxel con ABT-737 o S1 (inhibidor de Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1) en una línea celular y en células primarias de CML [958] y cuando navitoclax y el inhibidor de Aurora B ZM447439 actúan sobre células de AML y en muestras de pacientes, mientras que esta combinación es inofensiva para células normales de la médula ósea [959]. En cualquier caso, las razones que subyacen a las diferencias que observamos en la eficacia de las combinaciones testadas en tumores sólidos y el mieloma múltiple deben ser dilucidadas en futuros estudios.

5.4.3. Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y miméticos BH3

Puesto que en líneas generales la combinación simultánea de alisertib a dosis bajas con los miméticos BH3 evaluada en el apartado anterior y en un estudio previo [422] no ha resultado suficientemente satisfactoria para el mieloma múltiple, se quiso averiguar si la adición secuencial de los fármacos mejoraba los resultados obtenidos con la estrategia anterior, ya que algunos autores han catalogado este esquema de administración del tratamiento como sinérgico a nivel preclínico en varios tipos de tumores [667, 960, 961].

Para ello, las células se incubaron durante 24 o 48 horas con dosis de los inhibidores de Aurora quinasa en el rango nano- o micromolar, y a continuación, se administraron los miméticos BH3 a concentraciones subletales, dejando actuar la combinación durante 24 horas adicionales. Concretamente, este estudio se inició en las células NCI-H929, las cuales fueron expuestas durante 24 y 48 horas al inhibidor de Aurora B barasertib a una dosis de 200 nM en solitario antes de la incorporación de los miméticos BH3, y la combinación se incubó durante otras 24 horas.

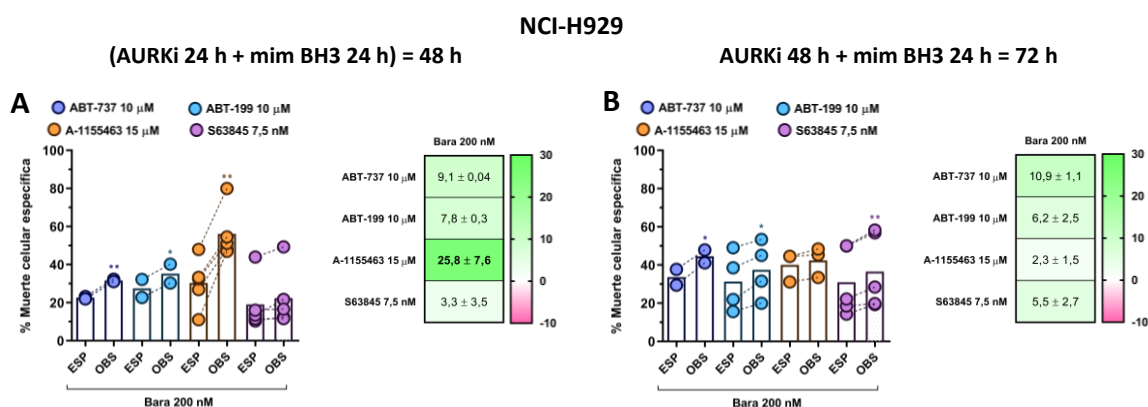


Figura 5.57 | Combinación secuencial de barasertib y miméticos BH3 en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les adicionó barasertib a la dosis indicada. Tras 24 (A) y 48 horas (B) de actuación del inhibidor se incorporaron los miméticos BH3 a las concentraciones señaladas, y las combinaciones se incubaron durante otras 24 horas. Finalmente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634/7-AAD y citometría de flujo, y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. Las gráficas comparan la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de barasertib con ABT-737, ABT-199, A-1155463 y S63845, y la tabla recoge la media de los valores

resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=2-5$ experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los resultados recogidos en la Figura 5.57 revelan que la adición de ABT-199 y S63845 tras 24 o 48 horas de tratamiento previo con barasertib condujo a un efecto aditivo. En cambio, la adición de A-1155463 después de 24 horas de actuación de barasertib en solitario condujo a un efecto sinérgico, lo que indicaría que, en esta situación, la subsistencia de estas células depende, al menos en parte, de Bcl- X_L , a pesar de su alta dependencia por Mcl-1 a nivel basal. No obstante, resulta llamativo que, si las células se incubaban con barasertib durante 48 horas, la sinergia observada con el antagonista de Bcl- X_L se tornaba en aditividad. Por su parte, el efecto aditivo observado con ABT-737 tras la exposición en solitario a barasertib durante 24 horas se transformó en una sinergia marginal al extender el pre-tratamiento con barasertib durante 48 horas. Por lo tanto, todo esto parece indicar que la dependencia por Bcl- X_L desaparecería tras 48 horas de tratamiento previo con barasertib y ninguna proteína anti-apoptótica le tomaría el relevo en solitario, lo que lleva a pensar que es posible que exista co-dependencia de varias de ellas. Este no sería el caso de Bcl-2, Bcl- X_L y Bcl-w porque ABT-737 no ha demostrado gran eficacia, pero podría serlo si se inhibieran simultáneamente los pares Bcl-2/Mcl-1 y Bcl- X_L /Mcl-1. No obstante, además de comprobar esta teoría, también sería interesante incrementar las dosis de algunos de los miméticos BH3 para intentar sensibilizar a las células y que la aditividad observada vire hacia un efecto sinérgico.

En vista de que esta estrategia tampoco se tradujo en una sinergia elevada y generalizada, se optó por pre-incubar las células de mieloma NCI-H929, MM.1S y U266 con dosis de alisertib y barasertib en el rango micromolar durante 48 horas y en ese momento, añadir los miméticos BH3, dejando actuar la combinación durante 24 horas adicionales.

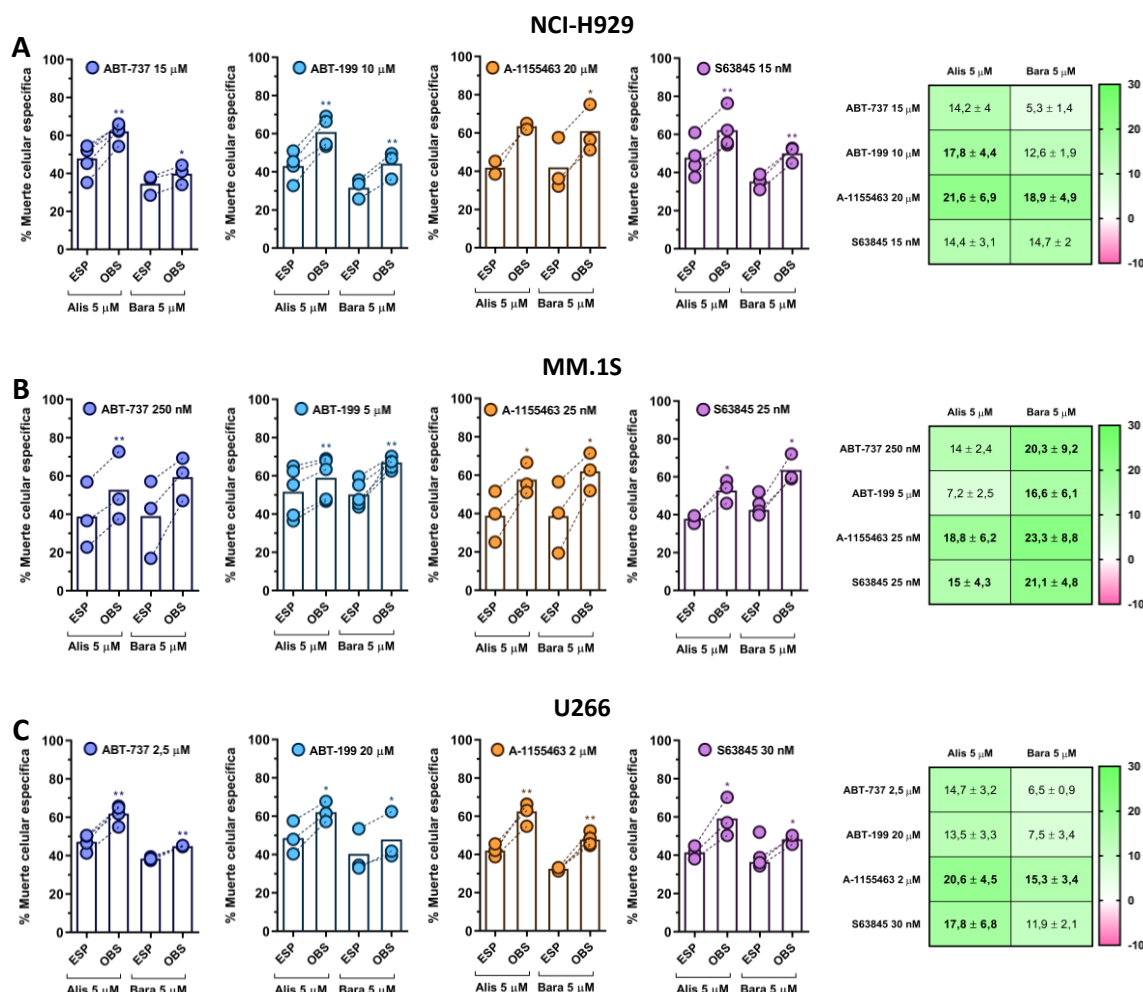


Figura 5.58 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y miméticos BH3 en las células NCI-H929 (A), MM.1S (B) y U266 (C). Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les añadieron alisertib y barasertib a las dosis señaladas. Después de 48 horas de incubación, se adicionaron los miméticos BH3 a las concentraciones indicadas, y las combinaciones se incubaron durante otras 24 horas. Finalmente, se determinó la muerte celular desencadenada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. Las gráficas comparan la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa con cada mimético BH3, y la tabla recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=2-5 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

La Figura 5.58 desvela una mayor eficacia de este enfoque, pues todas las combinaciones sensibilizaron en mayor o menor medida a las tres líneas celulares frente a dosis elevadas de los inhibidores de Aurora quinasa, lo que desembocó en la mayoría de los casos en un efecto sinérgico, aumentando la muerte observada respecto a la esperada en torno a un 10-25 %. En general, la combinación secuencial de los miméticos BH3 con alisertib resultó ligeramente más ventajosa que con barasertib en las células NCI-H929 y U266 (Figs. 5.58A y 5.58C), aunque la

combinación de S63845 con alisertib o barasertib en las células NCI-H929 indujo una sinergia similar. En cambio, en las células MM.1S (Fig. 5.58B) los miméticos BH3 favorecieron en mayor grado la actividad citotóxica de barasertib en comparación con la de alisertib. No obstante, la combinación más efectiva en todas las líneas celulares ha sido la que incluía al inhibidor de Bcl-X_L, aunque en las MM.1S la combinación de barasertib con S63845 y ABT-737 mostró una eficacia similar a la observada con A-1155463 y dicho inhibidor.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede deducir que tanto Bcl-X_L como Mcl-1 en solitario cumplen cierta función protectora en las tres líneas celulares cuando se inhiben las proteínas Aurora, y es posible que la inhibición dual de ambas sensibilice mucho más a alisertib y barasertib. Sin embargo, la implicación de Bcl-2 y de la terna Bcl-2/Bcl-X_L y Bcl-w depende de la línea celular y del inhibidor utilizado. Además, estos resultados discrepan del conocimiento que tenemos acerca de la dependencia de estas líneas celulares por las proteínas de la familia Bcl-2. En el caso de las células NCI-H929, los resultados obtenidos no reflejan una predilección por Mcl-1 y otorgan una mayor relevancia a Bcl-X_L cuando se enfrenten a los inhibidores de Aurora A y B. En las células MM.1S, su alta dependencia por Bcl-X_L contrasta con el similar nivel de sensibilización conseguido al inhibir Mcl-1 y Bcl-X_L mediante sus respectivos inhibidores específicos o mediante el multi-inhibidor en respuesta a alisertib y barasertib, lo que parece indicar que ambas proteínas contribuyen a la supervivencia de las células en este contexto, mientras que Bcl-2 lo haría en menor medida. De hecho, la elevada expresión de Mcl-1 en estas células tras el tratamiento con alisertib a 5 μ M durante 72 horas (apartado 5.2.4) podría estar asociada con la menor toxicidad mostrada por el compuesto en las condiciones citadas. Por tanto, resulta coherente que su inhibición mediante S63845 induzca un efecto sinérgico, aunque este es más bien modesto. No obstante, la sinergia podría ser mayor si se inhibieran simultáneamente Mcl-1 y Bcl-X_L. Finalmente, la dependencia de las células U266 tratadas con ambos inhibidores de la familia Aurora por Bcl-X_L y Mcl-1 queda reflejada en la sinergia observada al inhibir ambas proteínas de forma selectiva, pero Bcl-2 y el tándem Bcl-2/Bcl-X_L/Bcl-w también desempeñan una pequeña función protectora frente a alisertib en estas células. En definitiva, los resultados derivados de las combinaciones secuenciales apuntan a que la exposición prolongada a los inhibidores de Aurora quinasa modificarían la dependencia de las células por las proteínas de la familia Bcl-2 para subsistir, ya sea a través de alteraciones en sus niveles de expresión o en su red de conexiones.

Otra cuestión interesante es el distinto efecto inducido por ABT-737 y ABT-199 en función de la línea celular y la exposición a los inhibidores de Aurora A o B. Nosotros en el apartado 5.2.3 y otros autores en trabajos previos hemos señalado que el fenotipo observado en células tratadas con alisertib varía en función de la dosis utilizada de este compuesto [660–663]. En nuestro caso, advertimos que alisertib en el rango micromolar inducía un fenotipo equivalente al provocado por

barasertib (inhibición exclusiva de Aurora B), pero a nivel molecular los efectos asociados a cada compuesto diferían entre sí (apartado 5.2.3), lo que evidencia un mecanismo de acción distinto para cada compuesto. Esto probablemente explique el diferente efecto producido al combinar cada mimético BH3 con alisertib o barasertib en una misma línea celular (ABT-737 en las células NCI-H929, ABT-199 en las MM.1S y ambos en las U266). Por otro lado, las diferencias entre las líneas celulares respecto al efecto inducido por la misma combinación pueden ser debidas a factores intrínsecos a las células. En cualquier caso, son necesarias investigaciones más exhaustivas para comprender por qué unas son sinérgicas y otras, no.

Tomando en consideración los resultados de esta sección y la anterior, el tratamiento previo de las células durante 48 horas con los inhibidores de Aurora quinasa a concentraciones en el rango micromolar seguida de la co-incubación con los miméticos BH3 durante otras 24 horas ha demostrado mayor toxicidad que cuando ambos tipos de compuestos se administran conjuntamente o cuando las combinaciones también son secuenciales, pero barasertib se aplica a dosis en el rango nanomolar. Por lo tanto, a falta de estudios que lo esclarezcan, lo más factible es que las vías moleculares activadas en uno u otro escenario no sean las mismas.

Hasta donde hemos podido averiguar, la combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y miméticos BH3 en el mieloma múltiple y en cualquier otro tipo de cáncer no ha sido evaluada previamente. No obstante, sí existen estudios que han utilizado este enfoque con compuestos de cada familia combinados con otros agentes anti-neoplásicos, con los que se han obtenidos resultados satisfactorios. Por ejemplo, la administración de paclitaxel previa a navitoclax mostró mayor eficacia frente al cáncer de mama que el tratamiento conjunto tanto en ratones xenoinjertados como en organoides obtenidos a partir de uno de ellos [962]; en el caso de la leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras, la adición retardada de venetoclax, A-1331852 y especialmente S63845 a trametinib (inhibidor de MEK) por un lado, y la de venetoclax y S63845 a sunitinib (multi-inhibidor tirosín quinasa) por otro indujeron sinergia *in vitro* [963]; el mismo efecto se observó en células de rabdomiosarcoma cuando se combinaban secuencialmente doxorubicina y A-1331852/S63845 o vincristina y S63845, mientras que si el inhibidor de Mcl-1 se sustituía por A-1331852 en esta última combinación, se producía aditividad, y en un modelo *in vivo* la adición de vincristina seguida de S63845 fue más efectiva que cada compuesto por separado y redujo el crecimiento tumoral [960]. En cuanto a los inhibidores de Aurora quinasa, Zhou *et al.* encontraron sinérgica la incubación previa con alisertib seguida de paclitaxel o gemcitabina (antimetabolito) en células de cáncer de vejiga pero solo aditividad si se invertía el orden de tratamiento [667]. Ma *et al.* también observaron sinergia al combinar de manera secuencial barasertib y cisplatino o carboplatino en modelos celulares de cáncer de ovario resistentes a cisplatino [961]. En el caso de docetaxel y MK-5108 (inhibidor de Aurora A) en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, la combinación simultánea es más efectiva

que la secuencial, aunque la administración de MK-5108 tras docetaxel también mejoró la actividad antitumoral del taxano, pero esto no sucedió cuando los fármacos se añadían en el orden inverso [964]. Finalmente, si distintos agentes terapéuticos convencionales se combinan simultánea o secuencialmente con SNS-314 (pan-inhibidor de la familia Aurora) en modelos celulares de cáncer colorrectal, predomina el efecto aditivo, aunque en algunos casos la combinación con gemcitabina y, especialmente, vincristina y docetaxel resulta sinérgica; además, *in vivo* solo la adición de docetaxel después de SNS-314 demostró ser eficaz, a diferencia de la secuencia inversa y la combinación concomitante [965].

5.4.4. Combinación de alisertib y barasertib

Otra aproximación que se decidió estudiar en células de mieloma múltiple fue la combinación simultánea de dosis bajas y elevadas de alisertib y barasertib durante 24, 48 y 72 horas.

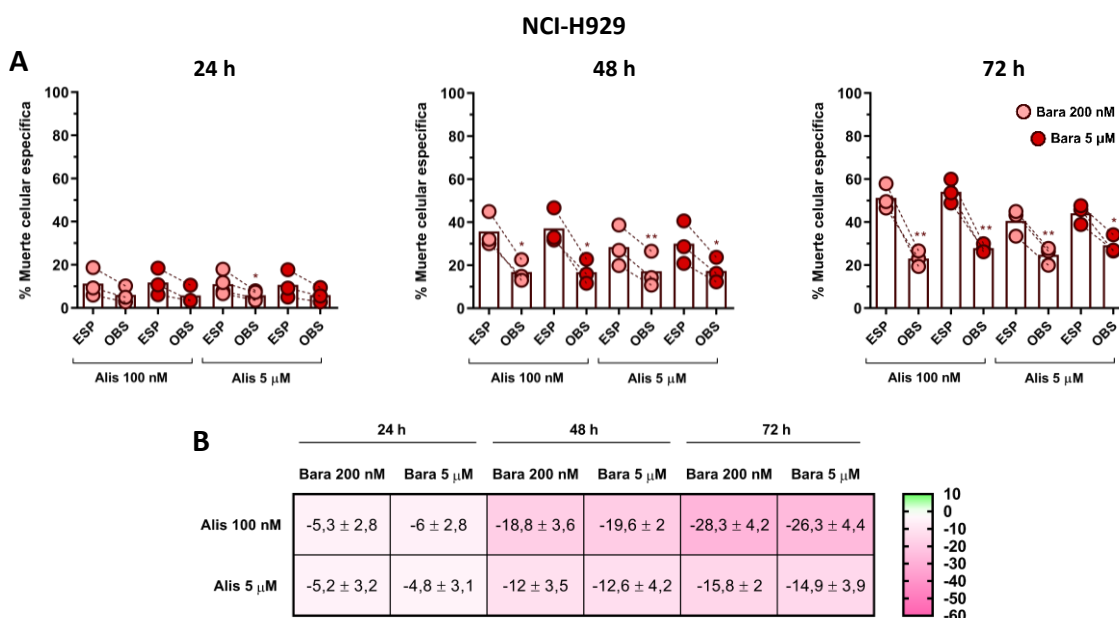


Figura 5.59 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, alisertib y barasertib se añadieron a las concentraciones indicadas y estos se dejaron actuar durante 24, 48 y 72 horas. A continuación, se determinó la muerte celular desencadenada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa a 24, 48 y 72 horas. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=3-4$ experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los resultados obtenidos en las células NCI-H929 revelan un efecto antagónico desde las 24 horas que se acrecienta con el paso del tiempo, y es mayor cuando barasertib se combina con alisertib a dosis bajas (Fig. 5.59).

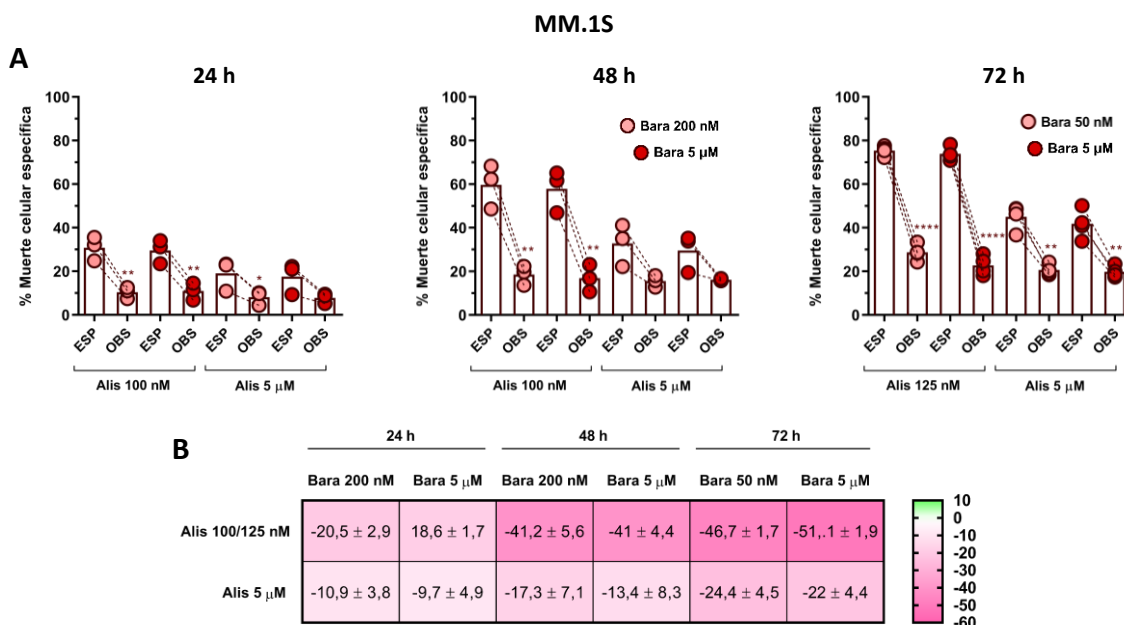


Figura 5.60 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa en las células MM.1S. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, se adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones señaladas y estos se incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa a 24, 48 y 72 horas. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001.

La Figura 5.60 evidencia que el antagonismo derivado de las combinaciones en las células MM.1S todavía fue mayor que el que se observó en las células NCI-H929 a todos los tiempos, manteniéndose la tendencia de una mayor disminución del poder citotóxico de alisertib a dosis bajas cuando este se combina con cualquier dosis de barasertib.

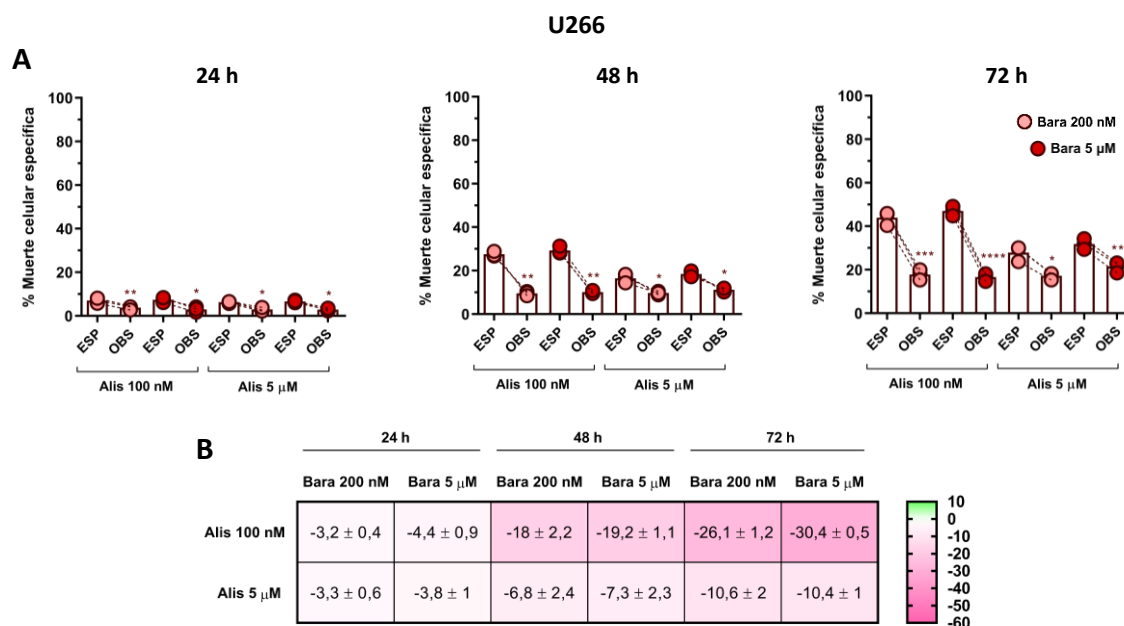


Figura 5.61 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa en las células U266. $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les adicionaron alisertib y barasertib a las dosis indicadas, los cuales se dejaron actuar durante 24, 48 y 72 horas. Tras los tratamientos, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa a 24, 48 y 72 horas. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de tres experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Como sucedía en las líneas celulares anteriores, la combinación de alisertib y barasertib en las células U266 derivó en un efecto antagónico ya visible a las 24 horas, el cual fue más notorio con el paso del tiempo y, especialmente, cuando barasertib se combinaba con la dosis baja de alisertib (Fig. 5.61). No obstante, la potencia de este antagonismo se asemeja más a la observada en las células NCI-H929 que en las MM.1S.

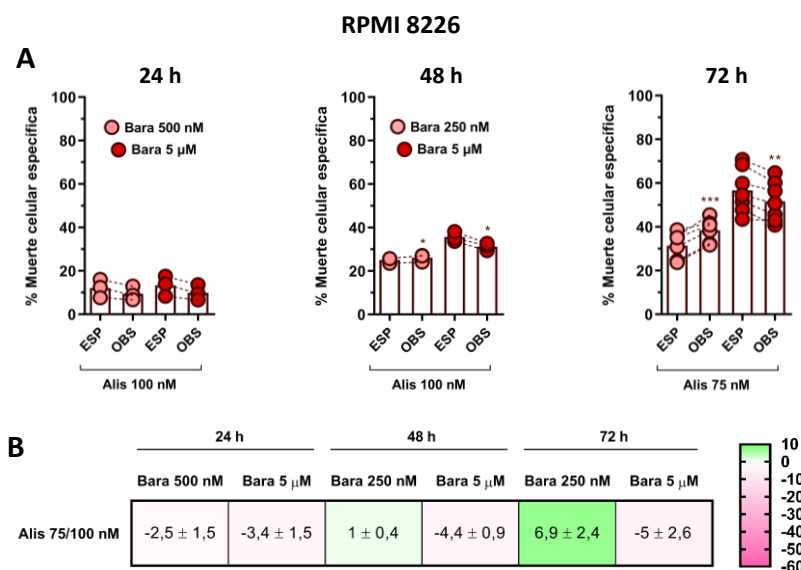


Figura 5.62 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa en las células RPMI 8226. Entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 24 pocillos y a estas se incorporaron alisertib y barasertib a las concentraciones señaladas, los cuales se dejaron actuar durante 24, 48 y 72 horas. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa a 24, 48 y 72 horas. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-7 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En el caso de las células RPMI 8226 y OPM-2, se optó por combinar dos dosis de barasertib, una en el rango nanomolar y otra en el micromolar, con una única dosis de alisertib, localizada en el rango nanomolar, ya que dosis bajas de alisertib resultan menos tóxicas para estas células tras incubaciones largas (sección 5.2.1). Según las Figuras 5.62 y 5.63, la mayoría de las combinaciones dieron lugar a un pequeño antagonismo en ambas líneas celulares, aunque a las 72 horas la co-incubación de alisertib con la dosis baja de barasertib indujo aditividad, y este efecto, aunque más pequeño, también se observó a las 48 horas en las células RPMI 8226.

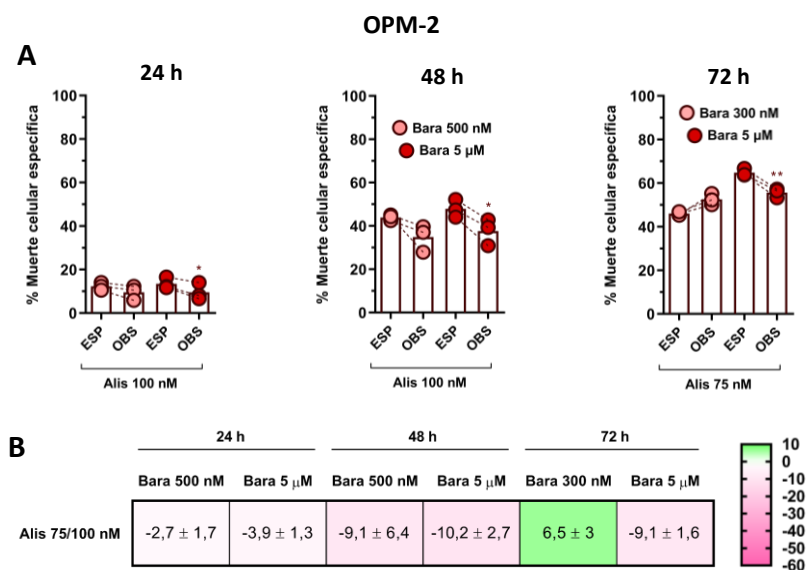


Figura 5.63 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa en las células OPM-2. Se sembraron entre $1 \cdot 10^5$ y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, a las que se añadieron alisertib y barasertib a las dosis indicadas y estos se incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Tras los tratamientos se determinó la muerte celular desatada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa a 24, 48 y 72 horas. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de tres experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

El antagonismo observado en las líneas celulares NCI-H929, MM.1S y U266, fortalecido por el paso del tiempo, puede ser consecuencia de la imposición del efecto inhibitorio de Aurora B respecto a Aurora A, pues en los ensayos dosis-respuesta realizados con alisertib y barasertib (apartado 5.2.1) se puso de relieve que la actividad citotóxica de barasertib era menor que la de alisertib en células de mieloma múltiple cuando los tratamientos se prolongaban en el tiempo. A la formulación de esta hipótesis también contribuyeron las observaciones realizadas al microscopio invertido una vez concluidos los tratamientos y antes de analizar los resultados por citometría de flujo, puesto que gracias a ellas se pudo distinguir un fenotipo más acorde con la inhibición de Aurora B que con la de Aurora A, basado en la prevalencia de células vivas gigantes potencialmente poliploides sobre células apoptóticas (datos no mostrados). No en vano, diversos trabajos focalizados en el estudio de pan-inhibidores de la familia Aurora respaldan esta teoría, a pesar de que estos son activos frente a todas las quinastas de la familia. Así, *Reiman et al.* observaron que el compuesto VE-465 inducía poliploidía y provocaba la muerte de células de mieloma de una forma similar a como lo hacía el inhibidor selectivo de Aurora B AZD1152 (barasertib) [966]. Asimismo, la endorreduplicación asociada a la acción de AT9283 en células de MCL, DLBCL y T-FL (linfoma folicular transformado) reflejaba un fenotipo afín a la

inactivación de Aurora B [967], al igual que sucedió en distintas células de tumores sólidos sometidas a VX-680 y PHA-739358 (danusertib) [530, 968, 969]. Un estudio basado en el silenciamiento de Aurora A y B mediante RNAs de interferencia propuso que al depletarse Aurora B se prescindiría de la función necesaria durante la mitosis de Aurora A, impidiendo el bloqueo mitótico y fomentando la poliploidía a través de la endorreduplicación del DNA y la supresión de la citoquinesis [970].

En el caso de las células RPMI 8226 y OPM-2, los resultados obtenidos no serían compatibles con este mecanismo de acción, pues la toxicidad registrada no dista en exceso de la esperada al combinar ambos inhibidores (Figs. 5.62 y 5.63) y al microscopio se apreció la coexistencia de células muertas y vivas gigantes con el paso del tiempo (datos no mostrados). Esto sugiere que en estas líneas celulares no existe un predominio claro del efecto inhibitorio de Aurora B sobre Aurora A o viceversa.

Se ha llegado a plantear que la contribución real de cada proteína Aurora en la respuesta final de las células debe determinarse de manera experimental en cada tipo de cáncer, pues la heterogeneidad de las células tumorales respecto al tipo y número de mutaciones genéticas y anomalías cromosómicas podría afectar a la respuesta de estas a la inactivación simultánea de dos proteínas Aurora [971]. En nuestro caso no hemos llegado a realizar estudios tan profundos, pero no se puede descartar que dicha heterogeneidad u otros factores intrínsecos al tipo celular sean los responsables de las diferencias observadas entre las líneas celulares de una misma enfermedad; en cualquier caso, son necesarios estudios más exhaustivos para confirmarlo.

5.4.5. Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib

Otra aproximación que se valoró para el mieloma múltiple fue la combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib, un inhibidor potente y selectivo de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9 que ha sido evaluado en ensayos clínicos para esta enfermedad [972–974]. Concretamente, diferentes dosis de dinaciclib se adicionaron a las células cuando estas llevaban 48 horas de tratamiento previo con alisertib o barasertib, y la combinación se dejó actuar durante 24 horas adicionales.

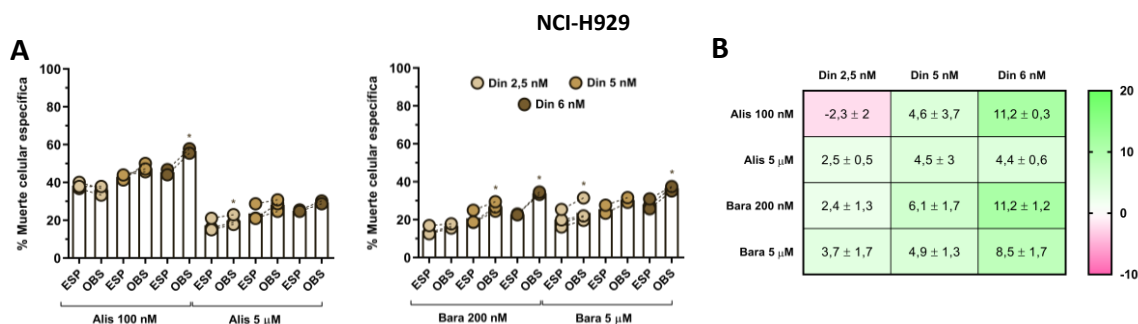


Figura 5.64 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, a las que se añadieron alisertib y barasertib a las dosis indicadas y estos se incubaron durante 48

horas, momento en el cual se adicionó dinaciclib a las concentraciones señadas, y las combinaciones se dejaron actuar durante otras 24 horas. Finalmente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con dinaciclib. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=2-4$ experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$.

La combinación de alisertib o barasertib con dinaciclib en las células NCI-H929 supuso un efecto aditivo en la mayoría de los casos (Fig. 5.64). Este efecto también prevalecía en las células MM.1S cuando dinaciclib se combinaba con barasertib, independientemente de la dosis utilizada, y con alisertib en el rango micromolar. Sin embargo, la combinación de dinaciclib a 3 nM y alisertib en el rango nanomolar dio lugar a un efecto antagónico, pero si la dosis de dinaciclib se incrementaba a 5 nM, la toxicidad de alisertib mejoraba y, por tanto, la combinación resultaba levemente sinérgica. (Fig. 5.65).

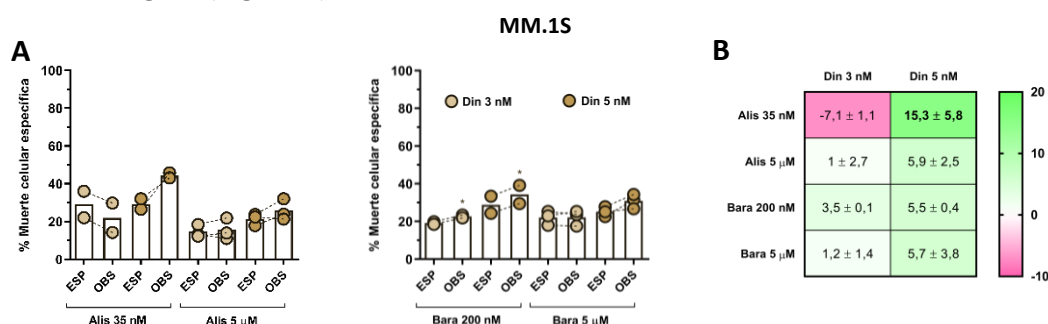


Figura 5.65 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en las células MM.1S. $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les añadieron alisertib y barasertib a las dosis señaladas. Tras 48 horas de incubación, se incorporó dinaciclib a las concentraciones indicadas y las combinaciones se incubaron durante 24 horas adicionales. Tras este tiempo se determinó la muerte celular desatada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con dinaciclib. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=2-3$ experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$.

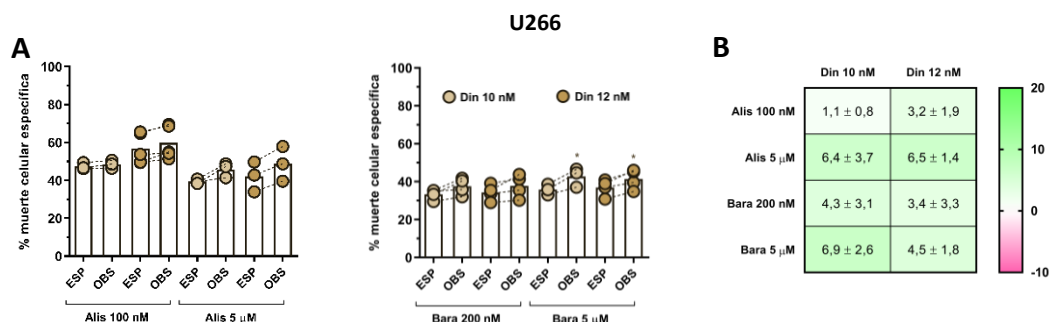


Figura 5.66 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en las células U266. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 48 pocillos, a las que se añadieron alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas, y estos se incubaron durante 48 horas, instante en el cual se incorporó dinaciclib a las dosis señaladas, y las combinaciones se dejaron actuar durante 24 horas adicionales. Seguidamente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con dinaciclib. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

Las Figuras 5.66 y 5.67 muestran que la incorporación de dinaciclib a las células U266 y RPMI 8226 tratadas previamente con alisertib y barasertib derivó en todos los casos en un efecto aditivo o ligeramente antagónico.

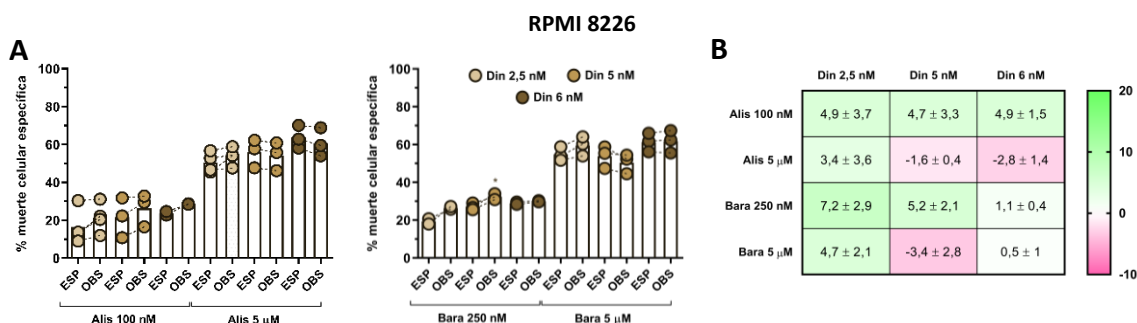


Figura 5.67 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en las células RPMI 8226. Se sembraron $7,5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, a las que se adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones señaladas, y estos se dejaron actuar durante 48 horas. Entonces se añadió dinaciclib a las dosis indicadas, y las combinaciones se incubaron durante otras 24 horas. Por último, se determinó la muerte celular desencadenada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con dinaciclib. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=2-4 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

Por último, en las células OPM-2 prevaleció un leve antagonismo cuando dinaciclib se combinaba con el inhibidor de Aurora A a ambas dosis y el de Aurora B a dosis bajas. Este efecto antagónico fue prácticamente inapreciable cuando dinaciclib a 5 nM fue incorporado a células pre-tratadas con barasertib en el rango micromolar, mientras que este efecto viró hacia un efecto aditivo si dinaciclib se usaba a 2,5 nM y 6 nM (Fig. 5.68).

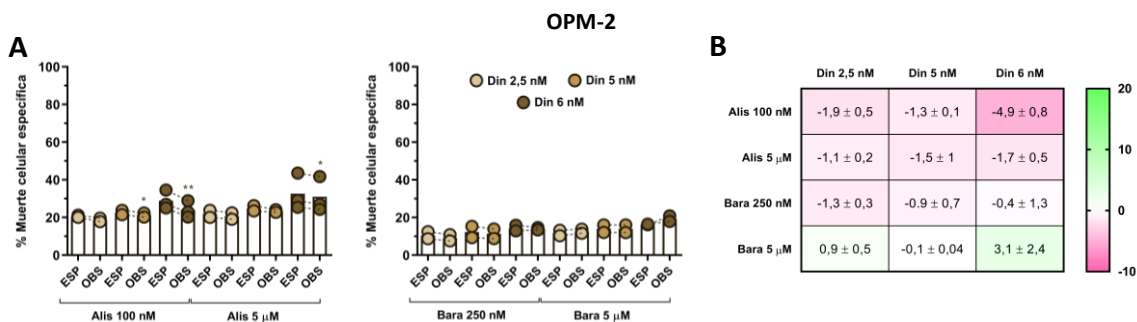


Figura 5.68 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en las células OPM-2. $1 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 µl en placas de 24 pocillos y a estas se les añadieron alisertib y barasertib a las dosis indicadas. Tras 48 horas de incubación, se incorporó dinaciclib a las concentraciones señaladas y las combinaciones se dejaron actuar durante 24 horas adicionales. A continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con dinaciclib. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=2-3 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05.

El potencial antitumoral de los inhibidores de Aurora quinasa y de dinaciclib como agentes únicos y combinados con otros agentes está siendo evaluado en diversos estudios preclínicos y en la fase clínica [197, 975, 976]. Hasta el momento no se conocen investigaciones que se hayan focalizado en el estudio del efecto combinatorio de ambos fármacos, cuyas dianas moleculares son distintas, pero sí existe un trabajo pionero en este campo, obra de *Uras et al.*, que sondeó la combinación de palbociclib (inhibidor de CDK4/6) e inhibidores de Aurora quinasa como posible terapia para el tratamiento de pacientes con AML, la cual resultó sinérgica en modelos celulares humanos y murinos que portaban mutaciones en los dominios juxtamembrana o tirosín quinasa de *FLT3* [977]. Además, se ha visto que la eficacia de un compuesto novedoso denominado JNJ-7706621, considerado un inhibidor dual de CDKs y proteínas Aurora, incrementa en células de sarcoma de Ewing al aumentar la dosis y el tiempo de exposición, e *in vivo* consigue frenar el crecimiento tumoral e inducir apoptosis [978]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la combinación de alisertib/barasertib con dinaciclib podría no ser una estrategia adecuada para atacar al mieloma múltiple si se busca obtener un efecto sinérgico. No obstante, esto no conlleva descartar la evaluación de esta aproximación en otros tipos de tumores, manteniendo los

inhibidores utilizados o sustituyéndolos por otros de sus mismas clases, ya que es posible que estas combinaciones funcionen en otros contextos.

Dinaciclib regula negativamente la transcripción y/o expresión de algunas proteínas, como ciclina B1, Aurora A, survivina o los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1) en modelos celulares y animales de osteosarcoma y cáncer de tiroides y de ovario [972, 979–984]. En el caso concreto de Mcl-1, la regulación negativa ocurre a nivel transcripcional y proteico dada la corta vida media del RNA mensajero y de la proteína, y varios estudios achacan estos efectos a la inhibición de CDK9, ya que esto implica la disfunción de la RNA polimerasa II [979, 981, 982]. Un trabajo reciente del grupo ha confirmado la disminución de los niveles de Mcl-1 a consecuencia de la acción de dinaciclib en todas de las líneas celulares utilizadas en el presente estudio [423], mientras que nuestros resultados indican que Mcl-1 incrementa su expresión tras el tratamiento con los inhibidores de Aurora quinasa (apartado 5.2.4). Dado que el mieloma es una neoplasia altamente dependiente de esta proteína anti-apoptótica [588], el mecanismo de acción aparentemente contradictorio que los fármacos empleados exhiben en las células de mieloma impediría que estas alcancen el umbral apoptótico, lo que explicaría el fracaso de la combinación de inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib en estas células. No obstante, esta teoría debería ser comprobada determinando el perfil de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 cuando las células se exponen a ambos tipos de fármacos.

5.4.6. Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat

Continuando con la búsqueda de combinaciones eficaces para el tratamiento del mieloma centrados en el uso de inhibidores de Aurora quinasa, se decidió combinar de manera secuencial estos fármacos con panobinostat, un potente pan-inhibidor oral de histona deacetilasas utilizado en la clínica hasta hace unos meses para el tratamiento del mieloma múltiple [339, 985]. Análogamente a dinaciclib, el esquema seguido para estas combinaciones implicó la exposición de las células a alisertib o barasertib en solitario durante 48 horas y, a continuación, la inclusión de panobinostat, incubando la combinación durante otras 24 horas.

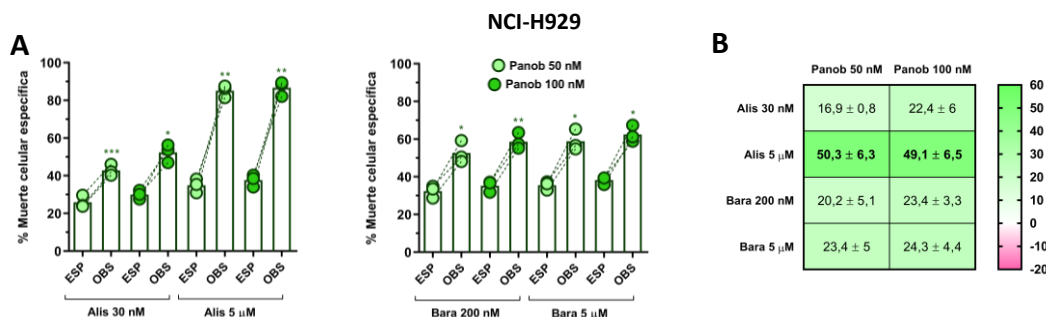


Figura 5.69 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat en las células NCI-H929. Se sembraron $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 µl en placas de 48 pocillos, a las que se añadieron alisertib y barasertib a las dosis señaladas, y estos se incubaron durante

48 horas. Seguidamente se incorporó panobinostat a las dosis indicadas, y las combinaciones se dejaron actuar durante 24 horas adicionales. Finalmente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con panobinostat. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de tres experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

Como se muestra en la Figura 5.69, la adición de panobinostat a las células NCI-H929 intensificó de forma extraordinaria la acción citotóxica de alisertib a 5 μ M, lo que se tradujo en un efecto sinérgico robusto, mientras que en el resto de situaciones, la inclusión de panobinostat derivó en una sinergia más modesta. Esto implica, por tanto, que la clave del éxito consistía en escoger el inhibidor de Aurora quinasas adecuado y la dosis del mismo.

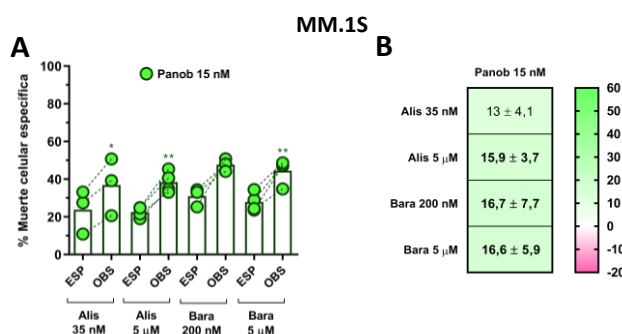


Figura 5.70 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasas y panobinostat en las células MM.1S. $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les añadieron alisertib y barasertib a las concentraciones señaladas. Después de 48 horas de tratamiento, se adicionó panobinostat a la dosis indicada y las combinaciones se dejaron actuar durante otras 24 horas. Entonces, se determinó la muerte celular desatada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con panobinostat. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de *n*=3-4 experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

La combinación secuencial de los inhibidores de Aurora A/B y el inhibidor de histona deacetilasas en las células MM.1S indujo un efecto sinérgico inferior al observado en las células NCI-H929 tratadas con las combinaciones menos efectivas (Fig. 5.70).

La efectividad de estas combinaciones decayó en las células U266, pues en este caso, la adición de panobinostat potenció mínimamente el efecto de los inhibidores de las proteínas Aurora, haciendo que se indujera una escasa sinergia con alisertib y barasertib a 5 μ M, y un efecto aditivo con ambos inhibidores en el rango nanomolar (Fig. 5.71).

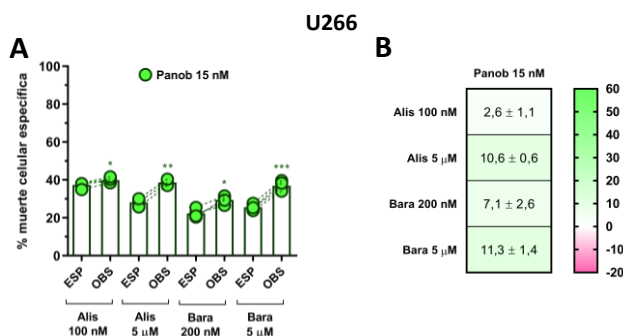


Figura 5.71 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat en las células U266. $1,5 \cdot 10^5$ células fueron sembradas en 500 μ l en placas de 48 pocillos y a estas se les adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas. Pasadas 48 horas, se añadió panobinostat a la dosis señalada y las combinaciones se dejaron actuar durante otras 24 horas. A continuación, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con panobinostat. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de n=3-4 experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t*-test apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

La Figura 5.72 exhibe una respuesta híbrida de las células RPMI 8226 a la combinación secuencial de los inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat, pues este último aumentó débilmente la toxicidad de alisertib a dosis bajas, lo que produjo un exiguo efecto sinérgico; sin embargo, al combinarse con barasertib a dosis bajas el efecto se redujo a aditividad, y con altas dosis de barasertib fue antagonístico. En el caso de alisertib en el rango micromolar, la incorporación de panobinostat a 15 nM ocasiona un ínfimo efecto aditivo, que se torna en antagonismo cuando la dosis de panobinostat se eleva a 25 nM.

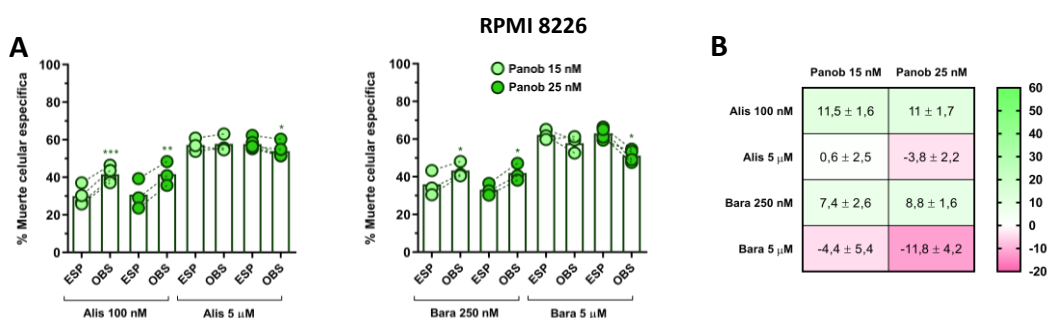


Figura 5.72 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat en las células RPMI 8226. Se sembraron $7,5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, a las que se adicionaron alisertib y barasertib a las concentraciones indicadas, y estos se incubaron durante 48 horas. A continuación, se añadió panobinostat a las dosis señaladas, y las combinaciones se dejaron actuar durante otras 24 horas. Por último, se determinó la muerte celular desencadenada por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con panobinostat. **(B)** Tabla resumen

que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=3-5$ experimentos independientes y el análisis estadístico realizado ha sido el *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por último, según la Figura 5.73, esta estrategia solamente alcanzó un efecto aditivo en las células OPM-2.

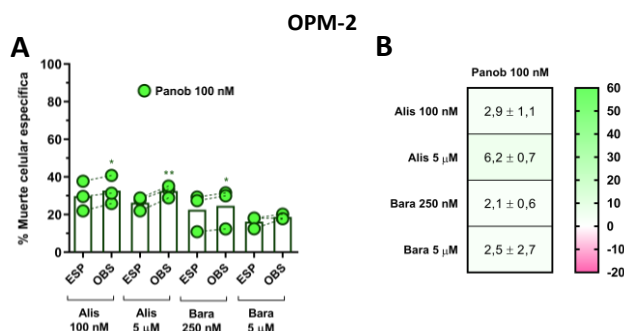


Figura 5.73 | Combinación secuencial de inhibidores de Aurora quinasa y panobinostat en las células OPM-2. Se sembraron $1 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 pocillos, a las que se añadieron alisertib y barasertib a las dosis indicadas, y estos se incubaron durante 48 horas. Seguidamente se incorporó panobinostat a la concentración señalada, y las combinaciones se dejaron actuar durante 24 horas adicionales. Finalmente, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. **(A)** Comparación de la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con panobinostat. **(B)** Tabla resumen que recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de tres experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La combinación de inhibidores de histona deacetilasas con otras terapias antitumorales ha generado grandes expectativas terapéuticas a nivel preclínico y clínico en multitud de tipos de cáncer, incluido el mieloma múltiple. Entre dichas terapias se incluyen inhibidores de tirosín quinasa y del proteasoma, radioterapia, agentes alquilantes, terapia hormonal, modificadores epigenéticos y la inmunoterapia [986, 987]. Durante la década del 2010 se sumaron a esta lista los inhibidores de Aurora quinasa. Desde entonces, son numerosos los estudios que confieren una mayor efectividad a la combinación de estos compuestos con los inhibidores de histona deacetilasa, especialmente vorinostat (pan-inhibidor), que a cada uno por separado. Por ejemplo, vorinostat y AMG 900 actúan de manera sinérgica en modelos celulares y animales de cáncer de próstata, reduciendo la capacidad proliferativa y la supervivencia clonogénica, fomentando la senescencia, un estado de poliploidía y la apoptosis *in vitro*, y ralentizando el crecimiento tumoral *in vivo* [784]. En células de meduloblastoma pediátrico, distintas pautas combinatorias de ambos compuestos anularon casi al completo su capacidad clonogénica y dieron lugar a efectos sinérgicos y antagónicos en cuanto a la proliferación celular, siendo más efectivo el tratamiento cuando vorinostat se adicionaba tras 48 horas de pre-tratamiento con AMG 900 y la combinación

se dejaba actuar durante otras 48 horas [988]. La acción citotóxica conjunta de vorinostat y alisertib/MK-0457 (tozasertib) resultó sinérgica en células de cáncer de mama triple negativo y con amplificación de Aurora A, y los investigadores apuntaron a un decaimiento de la fosforilación de Aurora A y B y de la histona H3 en el residuo Ser10 como responsables de este efecto. De hecho, vorinostat potenció la muerte inducida cuando se silenciaba Aurora A. Además, la combinación de vorinostat con tozasertib mejoró la actividad antitumoral en ratones xenoinjertados, posiblemente debido a la mayor depleción de survivina y Aurora A y B en este contexto [989]. Si vorinostat o pracinostat se combinaban con tozasertib en células de leucemia que expresaban BCR-ABL se conseguía disminuir la expresión de Aurora A y B y de survivina, mientras que PARP se activaba y la proliferación celular se inhibía de manera sinérgica, lo que sugería que este tratamiento podría superar la resistencia a imatinib en estas células [990]. Kretzner *et al.* evaluaron la combinación de vorinostat con tozasertib y MK-5108 y vieron que la adición del primero provocaba cambios a nivel transcripcional y postranscripcional que afectaban a c-Myc, p53 y las proteínas de la familia Bcl-2 entre otros, lo que sensibilizaba a la acción citotóxica de los inhibidores de Aurora quinasa [991]. Por otro lado, Zullo *et al.* observaron sinergia al combinar romidepsina con alisertib tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de linfoma de células T y atribuyeron este efecto al fallo de la citoquinesis [992].

Todos estos óptimos resultados han facilitado la entrada en ensayos clínicos de algunos de estos regímenes combinatorios. Si bien la tasa de respuesta general al dúo alisertib-romidepsina en un estudio de fase I fue solamente del 28 % en pacientes con linfomas agresivos de células B y T en recaída o refractarios, la observación de respuesta completa o parcial en cinco de siete pacientes con linfoma de Hodgkin clásico que habían sucumbido previamente a varias líneas de tratamiento resultó prometedora [993]. Algo muy similar se produjo en otro estudio de fase I al combinar alisertib con vorinostat en pacientes con distintos linfomas recidivantes/refractarios, pues la tasa de respuesta general fue menor del 20 % pero dos pacientes con DLBCL alcanzaron respuesta completa a largo plazo y otros dos con linfoma de Hodgkin clásico experimentaron respuesta parcial, lo que justifica la necesidad de ampliar las investigaciones con estos fármacos [994].

En el contexto del mieloma múltiple, panobinostat ha sido el único inhibidor de histona deacetilasas que ha llegado a usarse en el ámbito clínico. Su combinación con bortezomib y dexametasona para el tratamiento de pacientes con esta enfermedad que se habían sometido a al menos dos tratamientos previos, incluidos bortezomib y un fármaco inmunomodulador, fue aprobada por la FDA y la EMA en 2015 [985, 995], pero el organismo estadounidense lo retiró de su mercado en marzo de 2022 por la imposibilidad de completar los ensayos necesarios tras su comercialización, mientras que en Europa continúa en activo [339]. Hasta la fase clínica han escalado las combinaciones de este tipo de inhibidores con tratamientos habituales del mieloma,

tal es el caso de carfilzomib con panobinostat (fase I), bortezomib con ricolinostat (fase I/II) y la de este último con lenalidomida y dexametasona (fase Ib), mientras que otras todavía se encuentran siendo evaluadas a nivel preclínico, como es el caso de citarinostat con pomalidomida, MPT0G413 con bortezomib, y ricolinostat con carfilzomib o con bortezomib y dexametasona, ofreciendo todas ellas resultados prometedores por el momento [987].

Sin embargo, no existen datos acerca del efecto de combinar los inhibidores de histona deacetilasas con compuestos dirigidos contra las proteínas Aurora en el mieloma, pero sí hay estudios que indican que los inhibidores de histona deacetilasas fomentan la degradación de Aurora A y/o B a través del proteasoma en células de cáncer renal, gástrico y colorrectal, así como en queratinocitos humanos no transformados [996, 997]. Esto podría explicar el antagonismo que produce la combinación de los inhibidores de Aurora quinasa a dosis altas y panobinostat en las células RPMI 8226, pero no estaría relacionado con la sinergia observada en las células MM.1S y, especialmente, las NCI-H929. Por lo tanto, dada la pluralidad de nuestros resultados y la heterogeneidad del mieloma múltiple, sería interesante estudiar las características moleculares que hacen que la combinación sea sinérgica en determinados subtipos de mieloma y si estas combinaciones pueden resultar efectivas en algún grupo de pacientes.

5.4.7. Combinación de inhibidores de Aurora quinasa e inhibidores metabólicos

Para cerrar el capítulo de las combinaciones en el mieloma múltiple, la última aproximación estudiada involucró a los inhibidores de Aurora quinasa y los fármacos metabólicos DCA y metformina, que fueron añadidos a la vez a las células e incubados durante 72 horas, renovando los inhibidores metabólicos a las 48 horas. Estas combinaciones las planteamos en base a dos criterios. Por un lado, apostamos por que la generación de ROS en las mitocondrias es responsable, al menos en parte, de la muerte celular ocasionada por alisertib y barasertib, tal y como sugieren la masiva producción de ROS mitocondriales, el aumento de la tasa de ROS por mitocondria detectados cuando las células se trataban con estos inhibidores y la resistencia a la acción citotóxica de estos compuestos en células desprovistas de DNA mitocondrial (apartados 5.2.10.2 y 5.2.10.3); y por otro, nos basamos en el mecanismo de acción conocido de los inhibidores metabólicos, pues DCA fomentaría la fabricación de ROS mitocondriales al obligar a las células a utilizar la respiración mitocondrial para obtener energía, mientras que metformina inhibiría parcialmente dicha producción al inhibir el complejo I del sistema OXPHOS [885, 890]. Por ello, esperábamos encontrar sinergia al utilizar DCA y antagonismo si este se sustituía por metformina.

La elección de las dosis utilizadas de alisertib y barasertib en estos ensayos se realizó teniendo en cuenta la sensibilidad de cada línea celular a estos inhibidores (apartado 5.2.1).

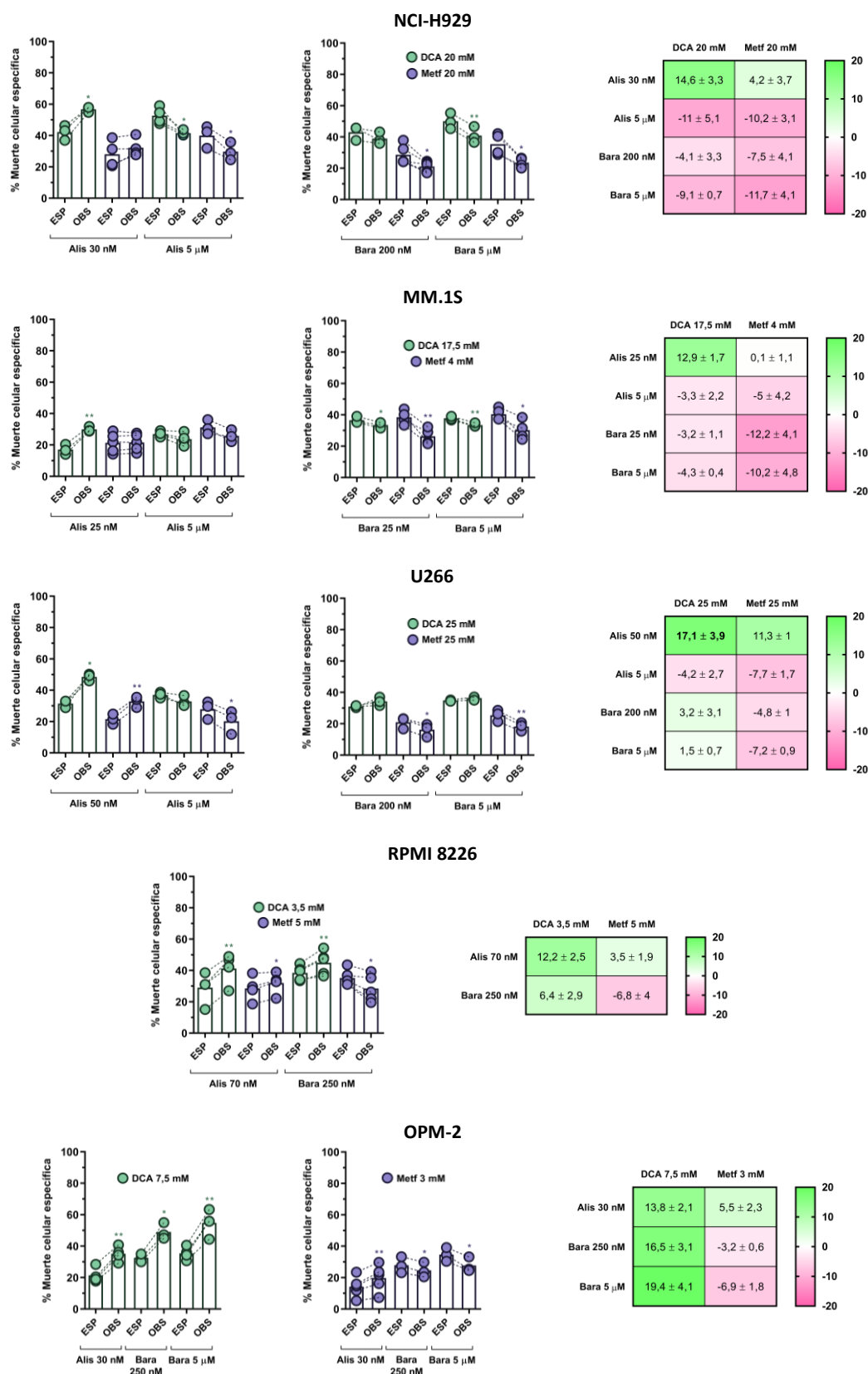


Figura 5.74 | Combinación simultánea de inhibidores de Aurora quinasa e inhibidores metabólicos en células de mieloma múltiple. Se sembraron entre $7,5 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ células en 500 μ l en placas de 24 o 48 pocillos, a las que se adicionaron los compuestos a las concentraciones señaladas, y estos se incubaron durante 72 horas, renovando DCA y metformina a las 48 horas. Concluidos los tratamientos, se determinó la muerte celular inducida por cada combinación mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD por

citometría de flujo y se utilizó el modelo independiente de Bliss para identificar las combinaciones potencialmente sinérgicas. Las gráficas comparan la muerte específica hipotética esperada frente a la observada experimentalmente [ESP vs OBS] derivadas de las combinaciones de alisertib y barasertib con DCA y metformina, y la tabla recoge la media de los valores resultantes de la diferencia [OBS-ESP] para cada combinación. Los resultados provienen de $n=3-5$ experimentos independientes y se ha realizado el análisis estadístico *t-test* apareado de dos colas, comparando la muerte esperada y observada para cada combinación. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los resultados obtenidos (Fig. 5.74) indican que solamente se produjo una pequeña sinergia al combinar DCA con la dosis de alisertib en el rango nanomolar en todas las líneas celulares, y en el caso de las OPM-2, también al combinarlo con barasertib, independientemente de la dosis utilizada del inhibidor de Aurora B. En cambio, en las células U266 y RPMI 8226 la combinación de DCA con barasertib desembocó en un efecto aditivo y, en el resto de situaciones, la inclusión de DCA resultó en un efecto antagónico. Por otra parte, con metformina se observó antagonismo cuando se combinaba con barasertib en todas las líneas celulares y con alisertib 5 μM y un efecto aditivo combinada con la dosis baja de alisertib en todas las líneas celulares, siendo despreciable en el caso de las células MM.1S, excepto en las células U266, donde el efecto se tornó levemente sinérgico.

Parte de estos resultados correlacionan con los datos expuestos en la sección 5.2.10.4 relativos a la producción de ROS mitocondriales en presencia de los inhibidores metabólicos y de Aurora quinasa. Por ejemplo, el antagonismo observado en las células U266 y en las NCI-H929, en este último caso solo cuando intervenía DCA, podría estar relacionado con el hecho de que DCA y metformina contrarrestan en estos casos la generación de ROS mitocondriales por parte de los inhibidores de Aurora quinasa. Además, el efecto antagónico de la combinación de metformina con barasertib en las células OPM-2 podría estar relacionado con el nulo efecto del inhibidor metabólico sobre la generación de ROS mitocondriales por parte de barasertib. No obstante, también se encontraron discrepancias entre ambos ensayos, ya que ni DCA ni metformina estimulaban la producción de ROS en las mitocondrias de las células NCI-H929, U266 y OPM-2 por parte de los inhibidores de Aurora quinasa en aquellos casos en los que su combinación resultaba sinérgica. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los ROS mitocondriales no están implicados en las pequeñas sinergias detectadas.

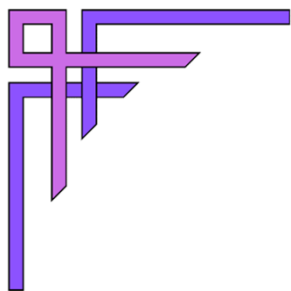
Del mismo modo que se ha realizado esta comparativa entre ensayos en las células NCI-H929, U266 y OPM-2, sería interesante llevarla a cabo en las líneas celulares restantes, las MM.1S y las RPMI 8226, para identificar posibles correlaciones y discrepancias entre ambos tipos de experimentos y ayudar a esclarecer el mecanismo de acción de los compuestos implicados. En el caso de las células evaluadas, los ensayos combinatorios y de medición de los niveles de ROS mitocondriales se realizaron en momentos distintos, lo que podría haber distorsionado nuestra interpretación de los resultados, ya que, como se ha señalado anteriormente,

el metabolismo de las células varía en función de la disponibilidad de los nutrientes y de otros factores asociados al cultivo celular. Por tanto, para poder llevar a cabo un análisis más fidedigno del momento metabólico en el que se encuentran las células, sería conveniente repetir ambos ensayos e incluir todas las líneas celulares.

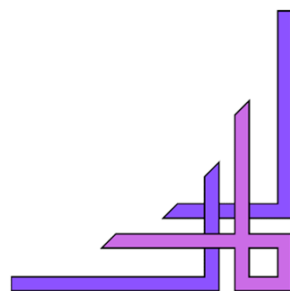
Si se acabaran confirmando los resultados aquí obtenidos, esto implicaría que existen dianas y mecanismos de acción asociados a los fármacos metabólicos diferentes a los establecidos. De hecho, la labor investigadora de los últimos años apunta en esta dirección, a pesar de que todavía queda mucho por explorar. Por ejemplo, las moléculas intermediarias activadas a consecuencia de DCA aún se desconocen, pero se han propuesto distintos mecanismos de acción alternativos para este compuesto, los cuales incluyen el incremento de la concentración de los intermediarios del ciclo de Krebs, toxicidad asociada a la síntesis *de novo* de coenzima A, regulación negativa de genes y la expresión proteica de transportadores ABC, modulación de la acidificación intracelular, antagonismo con el acetato, inhibición del co-transportador Na-K-2Cl, disminución de la expresión de genes relacionados con la autorrenovación y la afectación de las células madre tumorales [416]. Por su parte, metformina puede activar p53 e inhibir a mTOR en las células tumorales por la acción directa de AMPK, activada al inhibirse el complejo I del sistema de fosforilación oxidativa o por otros mecanismos, pero también puede bloquear a mTOR independientemente de AMPK a través de Rag GTPasas y REDD1. Además, afecta a la regulación de distintos factores de transcripción, incluidos MAPK, Wnt, Notch y FOXO3a, y más recientemente, se ha encontrado que estimula la actividad antitumoral de los linfocitos T y las células NK, y que puede atacar a las células tumorales a través de modificaciones epigenéticas [998].

Existen pocas referencias que mencionen la combinación de inhibidores de Aurora quinasa y fármacos metabólicos. Solo un trabajo firmado por *Zhang et al.* demostró que la inhibición del sistema OXPHOS con metformina potenciaba la actividad antitumoral de alisertib tanto en células de tumores sólidos como hematológicos y, además, esta combinación actuó sinérgicamente impidiendo el crecimiento del cáncer mama *in vivo*. En este caso, los autores determinaron que el éxito de esta combinación residía en el fallo mitótico provocado por la pérdida de la homeostasis energética, pues los inhibidores de quinasas mitóticas, entre ellos alisertib, reducían velozmente los niveles de ATP intracelulares de las células en mitosis, y la adición de metformina potenciaba el decaimiento de los niveles energéticos [855]. Por otro lado, el binomio agentes anti-microtúbulos/inhibidores metabólicos ha sido más estudiado como terapia antitumoral, y en general, se ha visto que DCA y metformina aumentan la sensibilidad a los taxanos y alcaloides de la vinca *in vitro* y en modelos animales [999–1007], aunque la adición de metformina a docetaxel en un estudio clínico de fase II para el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración no mejoró el tratamiento estándar (docetaxel) [1008].

Si nos centramos en el mieloma múltiple, los fármacos metabólicos han sido testados en combinación con quimioterápicos empleados actualmente en la clínica para el tratamiento de esta enfermedad o que todavía se encuentran en fase de estudio. Por ejemplo, la combinación de DCA con distintos agentes anti-mieloma (dexametasona, lenalidomida, la combinación de ambas y el triplete ciclofosfamida-bortezomib-dexametasona) no ofrecía un beneficio *in vitro* comparado con el uso de estos últimos en solitario, aunque tampoco menoscababa su eficacia [1009]. Dos estudios arrojaron resultados aparentemente contradictorios, pues en uno de ellos DCA sí que sensibilizó a las células de mieloma a la acción de bortezomib, y el tratamiento conjunto también alargó la supervivencia de ratones inmunocomprometidos a los que se les indujo esta enfermedad [843], mientras que en el otro solo se observó un efecto aditivo de la combinación, acompañado de la producción de ROS y la activación de la caspasa-3, pero esta estrategia no superó el nivel de toxicidad de DCA en solitario en células de mieloma resistentes a bortezomib [842]. Probablemente, las diferencias entre ambos estudios radiquen en que cada uno utilizó modelos distintos en sus ensayos. Un trabajo previo del grupo también demostró que las células de mieloma se sensibilizaban a la acción de ibrutinib (inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton) en presencia de DCA [420]. Por otro lado, metformina combinada con dexametasona, pero no con bortezomib se ha visto que induce un efecto sinérgico *in vitro* y despliega actividad frente al mieloma en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de ratón [1010].



DISCUSIÓN GENERAL



6. Discusión general

Con una incidencia cercana a los 20 millones de nuevos casos y un total de casi 10 millones de decesos en 2020, el cáncer constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial por detrás de las enfermedades cardiovasculares [240]. Considerado tradicionalmente como una única enfermedad, hoy en día el cáncer se entiende como un conjunto de más de un centenar de enfermedades distintas que pueden iniciarse en prácticamente cualquier órgano o tejido [370, 373]. Una clasificación sencilla del cáncer distingue entre tumores sólidos y cánceres sanguíneos [373]. Los tumores sólidos representan más del 90 % de todos los cánceres y en ellos se encuadran tres de los cánceres más frecuentes y letales a nivel global: los cánceres de pulmón, de páncreas y colorrectal, con los que se ha trabajado en esta tesis [240]. Por otro lado, dentro de los cánceres hematológicos se encuentra el último tipo de cáncer estudiado en este trabajo: el mieloma múltiple.

Nuestro conocimiento acerca de la biología del cáncer se ha ampliado considerablemente en las últimas décadas, lo que ha permitido introducir mejoras en los ámbitos preventivo, diagnóstico y terapéutico [1011]. El primer avance significativo en este último campo fue la sustitución en la segunda mitad del siglo XX de los remedios naturales y métodos quirúrgicos especialmente agresivos utilizados durante milenios por la denominada terapia antitumoral tradicional, que se basa en el uso individual o combinado de la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia [378, 1012]. Esta última, de hecho, ha resultado exitosa en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, pero conlleva importantes efectos adversos y toxicidades al actuar sobre células tumorales y sanas [379, 1011]. Por eso, son necesarios nuevos enfoques que superen estas limitaciones. Uno de los que ha ganado mayor protagonismo en los últimos años es la conocida como terapia dirigida, que consiste en el ataque específico a las células tumorales mediante fármacos que actúan de manera selectiva contra moléculas implicadas en el crecimiento, la progresión y la metástasis tumoral, lo que consigue mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento [379, 1013]. De hecho, esta estrategia terapéutica se ha mostrado prometedora para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, y su incorporación a las pautas de tratamiento del mieloma múltiple (por ejemplo, inhibidores del proteasoma o IMiDs) y los cánceres de pulmón (inhibidores de quinasas o de EGFR), de páncreas (inhibidores de PARP o de EGFR) y de colon (inhibidores de VEGFR) ha mejorado la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes [379, 1013, 1014]. No obstante, el desarrollo de resistencias a los tratamientos y la aparición de recaídas limitan considerablemente la eficacia de la terapia antitumoral actual [1014]. Esto unido a que se espera que la incidencia y letalidad del cáncer en general y los tumores mencionados en particular continúen al alza en los próximos años [1015], ha hecho que los esfuerzos se centren en la búsqueda de nuevas dianas específicas y estrategias terapéuticas más eficaces para ganar la batalla al cáncer.

Una de las señas de identidad de las células tumorales es su capacidad para evadir la apoptosis gracias a la desregulación de las proteínas de la familia Bcl-2, reguladoras por antonomasia de la vía apoptótica mitocondrial [407, 1016]. De hecho, la supervivencia de las células tumorales depende en muchos casos de la sobreexpresión de uno o varios miembros anti-apoptóticos, que bloquean a las proteínas pro-apoptóticas [401]. No obstante, esta resistencia puede ser revertida por los denominados miméticos BH3, que bloquean las defensas anti-apoptóticas y acercan a las células al umbral apoptótico [92]. Dado que numerosos estudios han corroborado su potencial terapéutico [112, 487, 1017–1019], en este trabajo se han evaluado cuatro compuestos de este tipo, tres en fase experimental (ABT-737, A-1155463 y S63845) y uno aprobado para su uso clínico (ABT-199 o venetoclax).

Los ensayos de dosis-respuesta realizados con estos compuestos en líneas celulares de tumores sólidos respaldan la teoría de que la supervivencia de este tipo de tumores se sustenta sobre las proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L y/o Mcl-1 [93]. De acuerdo con los resultados obtenidos, las células MIA PaCa-2 (cáncer de páncreas) dependerían exclusivamente de Mcl-1, mientras que Bcl-X_L se postula como la principal promotora de la supervivencia de las células A549 (cáncer de pulmón), y en el caso de las células HCT-116 (cáncer colorrectal) podría existir co-dependencia de las principales proteínas anti-apoptóticas. Por su parte, el mieloma múltiple es una enfermedad heterogénea en este aspecto [406], y varios trabajos han demostrado la sensibilidad de células de mieloma a distintos miméticos BH3 [588, 605, 944]. No obstante, nuestros resultados indican que, por lo general, dosis subletales de los miméticos BH3 no alteran en exceso los niveles de expresión de proteínas anti-apoptóticas y “solo-BH3” de la familia Bcl-2. A nivel individual de cada proteína, solo destaca la sobrerregulación de Mcl-1 en presencia de su antagonista, especialmente en la línea NCI-H929, probablemente debido a la estabilización de la proteína, como se ha descrito anteriormente en otro modelo celular [115], y la caída generalizada de PUMA con casi todos los tratamientos en casi todas las líneas celulares.

Pese al escaso impacto de los miméticos BH3 en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, existen evidencias de que estos compuestos modifican las interacciones que los miembros anti- y pro-apoptóticos establecen entre sí y de que el papel de las proteínas “solo-BH3” varía en función del modelo de estudio y del compuesto evaluados [479, 600, 603, 608, 613]. En el caso del mieloma, Bim se considera la principal proteína activadora de Bax y Bak [607]. Sin embargo, los resultados obtenidos con células silenciadas indican que esta proteína “solo-BH3” no es relevante para la acción citotóxica de ABT-199 y A-1155463 en la mayoría de los casos, pero sí que participa parcialmente en el mecanismo de muerte inducido por S63845 en las células MM.1S, U266 y RPMI 8226, y por A-1155463 solo en el caso de las células OPM-2, lo que sugiere que otras proteínas de su misma clase como PUMA o Bad intervienen en dicho mecanismo. No obstante, Bim parece desempeñar una función protectora en las células OPM-2

frente a S63845. Por otro lado, la supresión génica de Bax y Bak nos ha permitido confirmar que estos compuestos activan exclusivamente la vía apoptótica mitocondrial, coincidiendo con otros estudios [115, 588, 620], y reafirmar así su condición de auténticos miméticos BH3 [623]. Por último, hemos comprobado que la sobreexpresión de Bcl-X_L y Mcl-1 constituyen un factor de resistencia a la inhibición de estas proteínas anti-apoptóticas, así como a la de Bcl-2, tal y como han descrito otros autores [620, 624, 1020]. Para completar este estudio, sería interesante analizar en un futuro la implicación de otras proteínas “solo-BH3” en la muerte desencadenada por los miméticos BH3 aquí utilizados y determinar si la sobreexpresión de Bcl-2 es un factor de resistencia frente a la inhibición de Bcl-X_L y/o Mcl-1. Todo esto en conjunto pone de manifiesto que las diferencias observadas en la respuesta de las distintas líneas celulares de mieloma múltiple a los miméticos BH3 son un reflejo de la heterogeneidad de esta enfermedad. Por ello, resulta de vital importancia esclarecer los determinantes de la respuesta a los mismos para poder identificar los pacientes que podrían beneficiarse del tratamiento con estos compuestos en caso de que progresaran hasta la clínica.

A pesar de que la literatura recoge ejemplos en los que distintos miméticos BH3, incluidos los utilizados en este trabajo, inducen autofagia en células procedentes de tumores sólidos y hematológicos [511, 515, 651, 652], nuestros resultados indican que los miméticos BH3 son más eficaces activando la autofagia en células de tumores sólidos que en células de mieloma, pues mientras dosis subtóxicas de ABT-737, ABT-199 y, posiblemente, S63845 activan este proceso en las células A549, pudiendo llegar a culminar (S63845) o no (ABTs), en las células de mieloma ninguno de los miméticos BH3 testados induce autofagia, o en el caso de hacerlo, los niveles de activación serían muy bajos. Por tanto, sería interesante llevar a cabo futuras investigaciones que ayuden a comprender el mecanismo que subyace a la activación de la autofagia por parte de los miméticos BH3 y que expliquen las diferencias observadas en los distintos modelos celulares.

Finalmente, hemos visto que A-1155463 es citotóxico para las células U266 y apenas altera su ciclo celular, incrementando levemente las poblaciones celulares en las fases S y/o G2/M en función del tiempo de exposición al fármaco. Este resultado discrepa de lo publicado en otro estudio, donde se ha visto que la inhibición farmacológica de Bcl-X_L no induce muerte ni afecta a la progresión del ciclo celular en células de tumores sólidos [641], y contribuye a alimentar la controversia existente en cuanto a la capacidad de los miméticos BH3 de modificar el ciclo celular [633, 636, 1021].

Otro de los rasgos que definen a las células tumorales es su ilimitada capacidad proliferativa [1016], por lo que los fármacos antimitóticos representan una opción terapéutica prometedora. Si bien los primeros compuestos de este tipo, los agentes anti-microtúbulos, han demostrado ser eficaces en el tratamiento antitumoral, las importantes toxicidades asociadas y las resistencias

desarrolladas han impulsado el desarrollo de fármacos dirigidos específicamente contra otros componentes de la maquinaria mitótica [156]. Entre ellos se encuentran los inhibidores de la familia Aurora, proteínas clave en procesos mitóticos como la formación del huso mitótico, la adecuada segregación cromosómica y la citoquinesis, y que se encuentran sobreexpresadas en distintos tipos de cáncer [181, 1022]. De todos los desarrollados hasta la fecha, en esta tesis se han utilizado dos: alisertib (MLN8237) y barasertib (AZD1152), inhibidores selectivos de Aurora A y B, respectivamente, que han alcanzado la fase de ensayos clínicos [1023]. Si bien ambos compuestos han arrojado buenos resultados a nivel preclínico en tumores sólidos y sanguíneos, su evaluación en ensayos clínicos apunta a una eficacia antitumoral limitada [206, 395, 400, 1024]. No obstante, las investigaciones preclínicas y clínicas con ambos fármacos continúan, y este trabajo es un ejemplo de ello.

La presente tesis pone de manifiesto el potencial antitumoral de alisertib y barasertib a distintos niveles. Por un lado, ambos compuestos aumentan su actividad citotóxica con el paso del tiempo en células de mieloma, mostrándose más activo alisertib, por lo general. Además, el hecho de que alisertib a dosis en el rango nanomolar resulte más tóxico que a dosis en el rango micromolar en algunas líneas celulares (NCI-H929, MM.1S y U266) podría ser un indicador de que este inhibidor despliega distintos mecanismos de acción en dichas situaciones, inhibiendo a exclusivamente a Aurora A a dosis bajas y a Aurora A y B a dosis altas, y predominando el efecto asociado a la inhibición de Aurora B. De hecho, a pesar de que alisertib se conoce como un inhibidor específico de Aurora A, este mecanismo de inhibición diferencial de Aurora A y/o B en función de la dosis le ha sido atribuido anteriormente por otros autores [192, 660, 663].

Por otra parte, hemos demostrado que alisertib a dosis bajas y barasertib a dosis altas conducen a las células de mieloma a una detención del ciclo celular en la fase G2/M, un efecto que correlaciona con el potencial citostático que poseen ambos compuestos y que está ligado a la inhibición de las proteínas Aurora y de otras proteínas mitóticas [395, 668, 670, 675]. No obstante, los distintos perfiles del ciclo celular asociados a cada compuesto y la evaluación de la expresión de proteínas reguladoras de la mitosis indican que el mecanismo por el que ambos compuestos inducen la parada mitótica es diferente. La acumulación generalizada de ciclina B1, proteína encargada de regular la transición G2/M y la salida de la mitosis [697], tras el tratamiento con alisertib correlaciona con un arresto mitótico prolongado que retrasa la salida de la mitosis, mientras que niveles de expresión de esta proteína menores o equiparables a los de las células control tras la exposición a barasertib sugieren que este compuesto provoca una parada transitoria que las células sortean a través del deslizamiento mitótico. Sin embargo, en las células RPMI 8226 los niveles de expresión de ciclina B1 tras el tratamiento con ambos inhibidores son bajos, lo que lleva a pensar que, en estos casos, las células salen del arresto mitótico y entran en la fase G1 de la siguiente interfase.

Además, el análisis de la morfología nuclear revela que la exposición a dosis bajas de alisertib activa la catástrofe mitótica en células de mieloma a través de un mecanismo independiente de Bax y Bak. La catástrofe mitótica es un mecanismo oncosupresor que se activa en respuesta a la inhibición de proteínas reguladoras de la mitosis, incluidas las proteínas Aurora, y que se caracteriza por las alteraciones morfológicas que provoca a nivel nuclear, incluidas la macro-, micro- y multinucleación [8, 687, 688, 690, 692]. Una vez activado dicho mecanismo, las células pueden optar por varios caminos: la muerte durante la mitosis, llevar a cabo mitosis aberrantes que generan células aneuploides o escapar del bloqueo mitótico a través del deslizamiento mitótico y alcanzar la fase G1 de la siguiente interfase sin llevar a cabo la citokinesis [144]. En el segundo caso, se abre un nuevo abanico de posibles destinos celulares: la generación de células aneuploides, la muerte en la nueva interfase, la entrada en un estado de senescencia o la inducción de poliploidía a través de la endorreducción [144, 148]. Por lo general, la inhibición de Aurora A se asocia con aneuploidía, mientras que el bloqueo de Aurora B se relaciona más habitualmente con poliploidía [197, 1025]. No obstante, hay estudios que han reportado la inducción de poliploidía asociada a la inhibición de Aurora A, aunque no existe un consenso respecto a la implicación de p53 [667, 683, 684]. En relación con todo esto, nuestros resultados confirman la generación de células poliploides tras la acción de barasertib y, en menor medida, también de alisertib, a pesar de que los niveles de ciclina B1 aumentan en todas las líneas celulares en presencia de este último compuesto, con excepción de las células RPMI 8226. Existe cierta controversia acerca del papel de p53 en el destino final de las células tras la inhibición de Aurora A, ya que algunos autores defienden que su forma salvaje se asocia con la inducción de apoptosis y su ausencia o una forma mutada, con la inducción de poliploidía, mientras que otros han observado que el estado de p53 no influye en el destino final [667, 683]. En nuestro caso, puesto que la población de células poliploides y apoptóticas aumenta tanto en las células que tienen la forma salvaje de p53 (NCI-H929 y MM.1S) como en las que lo tienen p53 mutado (U266, RPMI 8226 y OPM-2) [685], deducimos que p53 no interviene en la elección del destino celular tras la acción de alisertib. Barasertib, además, también conduce a las células de mieloma a un estado senescente, un desenlace que también hemos identificado en células tumorales pancreáticas. Estos resultados se suman a los de otros estudios en los que la inhibición de Aurora B se asocia con la inducción de senescencia [418, 773, 776]. No obstante, la entrada en senescencia a causa de la inhibición de Aurora A también ha sido reportada [395, 772], y en este sentido, nosotros confirmamos que la senescencia también es un destino que las células de mieloma adoptan cuando se exponen a alisertib en el rango micromolar.

Si bien nuestros resultados corroboran la capacidad de alisertib y barasertib de inducir senescencia, no hemos llegado a determinar en qué momento se induce. Al igual que este trabajo, varios estudios detectan un estado senescente *in vitro* e *in vivo* transcurrido un tiempo desde la

exposición a los fármacos, como cisplatino, doxorubicina o paclitaxel [1026, 1027]. Sin embargo, también hay autores que han reportado que la entrada en senescencia se produce al finalizar el tratamiento, como se ha visto con alisertib en células tumorales pancreáticas, AKI603 (inhibidor de Aurora A) en células leucémicas o palbociclib en células de cáncer gástrico [777, 1028, 1029]. No obstante, esta capacidad puede depender del compuesto senogénico y del modelo celular empleados. En nuestro caso, podemos hipotetizar, en base a la expresión de ciclina B1 tras 72 horas de tratamiento con alisertib y barasertib a dosis altas, que el mecanismo de inducción de senescencia de ambos compuestos en las células de mieloma es distinto. Si bien los bajos niveles de esta proteína en todas las líneas celulares tratadas con barasertib serían compatibles con el deslizamiento mitótico y una posible entrada en senescencia a estos tiempos, su elevada expresión tras la acción de alisertib no correlacionaría con este destino celular, a excepción de en las células RPMI 8226. Por ello, pensamos que la retirada de alisertib favorecería la disminución de los niveles de ciclina B1 y, en consecuencia, se favorecería el deslizamiento mitótico y la posterior entrada en senescencia. Además, el fenotipo senescente también podría acentuarse con el paso del tiempo. No obstante, para comprobar nuestra teoría, sería necesario verificar si las células expresan marcadores de senescencia inmediatamente después de la exposición a los inhibidores de Aurora quinasa, si los niveles de ciclina B1 decaen pasado un tiempo desde la eliminación de alisertib y si los marcadores de senescencia se acentúan con el paso del tiempo. Como se ha mencionado previamente, la baja expresión de ciclina B1 tras 72 horas de actuación de alisertib y barasertib en las células RPMI 8226 se relacionaría con la salida de la parada mitótica y la entrada en la fase G1 de la siguiente interfase, pudiendo entonces las células bloquear de forma irreversible su capacidad proliferativa (senescencia) o sufrir endoreduplicación (poliploidía).

Llegados a este punto, es necesario resaltar que la apoptosis, la poliploidía y la senescencia se han identificado como posibles destinos finales en todas las líneas celulares de mieloma tras la exposición a alisertib y barasertib, aunque estos eventos se producen a distinto nivel en cada una de ellas. Ejemplo de ello es que alisertib a dosis bajas es altamente citotóxico en las células MM.1S tras 72 horas de actuación y la población de células poliploides a este tiempo es muy pequeña, pero en el caso de las células NCI-H929, este compuesto es menos tóxico y da lugar a un mayor porcentaje de células poliploides. Esto unido al hecho de que una misma línea celular puede experimentar diferentes destinos finales demuestra que existe heterogeneidad en la respuesta a estos compuestos entre líneas celulares y dentro de un mismo cultivo. De hecho, esta conclusión está respaldada por los resultados de un trabajo anterior, donde se detectaron ambos tipos de variabilidad en células de tumores sólidos (pulmón, colon y cuello uterino) expuestas de manera prolongada a fármacos antimitóticos [157].

El conjunto de nuestros resultados no nos permite discernir si la muerte inducida por alisertib y barasertib se produce durante la mitosis o tras su salida. En estas situaciones se ha propuesto la

activación de distintos mecanismos de muerte, entre los que destaca la vía apoptótica mitocondrial [751, 1030–1032]. De acuerdo con este tipo de muerte, hemos observado que exposiciones prolongadas a ambos inhibidores provocan la caída del potencial mitocondrial característica de la vía intrínseca de la apoptosis en todas las líneas celulares, un evento común en la inhibición de las proteínas Aurora [831, 833], y que la caída ocasionada por barasertib se previene parcialmente cuando se inhiben las caspasas en las células MM.1S. Asimismo, hemos demostrado en esta misma línea celular que el citocromo c se libera al citosol en respuesta a dosis altas y bajas de los dos compuestos y que este proceso es parcialmente dependiente de caspasas cuando es inducido por barasertib. Sin embargo, en el caso de alisertib, nuestros resultados sugieren que la salida del citocromo c podría ser independiente de caspasas, aunque esto debería confirmarse con concentraciones mayores de Z-VAD. Además, según nuestros resultados, en las células Bax/Bak DKO dosis bajas de alisertib también provocan la despolarización mitocondrial y podrían inducir la salida del citocromo c a través de un mecanismo poco dependiente de caspasas. Recientemente, se ha demostrado que Bok, el tercer miembro pro-apoptótico multidominio, puede inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial en ausencia de Bax y Bak [1033]; sin embargo, las bases de datos CCLE (<https://www.broadinstitute.org/ccle>) y *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) y algunos estudios coinciden en que la expresión de esta proteína es irrelevante en las células de mieloma [1033]. Por tanto, este dato y nuestros resultados respaldarían, aparentemente, los obtenidos en otros estudios, en los que se propone la existencia de mecanismos independientes de Bax y Bak que conllevan la pérdida del potencial mitocondrial y permiten la liberación del citocromo c [906, 908].

El estudio de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en células de mieloma tratadas con alisertib y barasertib revela pocos cambios, destacando solamente la sobreexpresión de Mcl-1 y/o Bcl-2 y el aumento o disminución de PUMA en función de la línea celular y/o tratamiento aplicado. Esto contrasta parcialmente con lo descrito, ya que el tratamiento con este tipo de inhibidores se ha relacionado con la degradación de Mcl-1 y la estabilización de Bim y PUMA [723, 726]. Por tanto, según nuestros resultados, los niveles de expresión de estas proteínas no son determinantes en la muerte inducida por estos compuestos, de manera que otros factores como modificaciones post-traduccionales o alteraciones en las interacciones que establecen estas proteínas entre sí podrían estar implicados en dicho proceso. Los resultados derivados del silenciamiento de proteínas pro-apoptóticas y la sobreexpresión de miembros anti-apoptóticos ponen de manifiesto que la implicación de las proteínas evaluadas en el mecanismo de acción de los fármacos antimitóticos depende de la línea celular y del compuesto evaluados. Por un lado, a partir del silenciamiento de Bim resolvemos que esta proteína no es determinante para la acción citotóxica de vincristina y docetaxel en células de mieloma, salvo, quizá, en las células MM.1S tratadas con vincristina, donde parece participar de manera parcial, pero sí está

involucrada en la toxicidad asociada a alisertib en las células U266. En el caso de las células OPM-2 también está implicada cuando los tratamientos se extienden hasta las 72 horas, pero en cambio, en estas células Bim parece ejercer una función protectora cuando se exponen durante 24 horas a dosis bajas del inhibidor. En cualquier caso, todo esto sugiere que otras proteínas “solo-BH3” median en el mecanismo de muerte inducido por los fármacos antimitóticos, como se ha propuesto en algún estudio previo [726, 748]. Por otra parte, teniendo en cuenta que Bok es irrelevante en el mieloma [1033] y los resultados derivados de la supresión de Bax y Bak, inferimos que el principal mecanismo asociado a la actividad citotóxica de alisertib a dosis altas y de barasertib es la vía intrínseca de la apoptosis, mientras que la muerte inducida por alisertib a dosis bajas activaría un mecanismo alternativo independiente de Bax y Bak. Asimismo, en el caso de vincristina y docetaxel deducimos que estos fármacos actúan a través de la ruta apoptótica mitocondrial y otras vías de muerte alternativas. Finalmente, determinamos que la sobreexpresión de Bcl-X_L y Mcl-1 no supone un factor de resistencia a vincristina, pero sí lo es la de Mcl-1 para docetaxel. Esto discrepa en parte de lo observado en otros estudios, donde la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas implica resistencia a taxanos y alcaloides de la vinca [734, 735, 737]. En el caso de alisertib, los resultados indican variaciones en este aspecto en función del tiempo de exposición y la dosis utilizada, pues la mayor expresión de Mcl-1 se asocia con resistencia a dosis muy bajas del compuesto a partir de las 48 horas de tratamiento, pero a las 72 horas es la sobreexpresión de Bcl-X_L la que mayor resistencia opone a la muerte inducida por alisertib. No obstante, es posible que las resistencias varíen en función de la línea celular, ya que estas observaciones se han realizado en las células RPMI 8226, pero el aumento de Mcl-1 en las células MM.1S tratadas con alisertib a dosis altas podría estar detrás de la baja toxicidad del compuesto a dicha dosis. En cualquier caso, para profundizar todavía más en el mecanismo de muerte activado por los fármacos antimitóticos son necesarias investigaciones futuras que evalúen la implicación de otras proteínas “solo-BH3” en dicho mecanismo y la sobreexpresión de Bcl-2 como factor de resistencia a estos compuestos.

Algunos estudios han propuesto que la muerte desencadenada por los inhibidores de Aurora quinasa es dependiente de caspasas, incluidas la -3, -8 y -9 [395, 789, 791]. Sin embargo, los resultados aquí obtenidos sugieren que la implicación de las caspasas en la muerte desatada por los inhibidores de Aurora quinasa depende de la línea celular, pues dicha muerte sería independiente de caspasas en las células NCI-H929, mientras que estas estarían implicadas en la toxicidad asociada a los compuestos en las células U266, RPMI 8226 y OPM-2. En cuanto a las células MM.1S y sus células derivadas, el efecto citotóxico de ambos inhibidores es muy poco o nada dependiente de las caspasas, pero su contribución sería mayor en las células Bax/Bak DKO tratadas con dosis bajas de alisertib. No obstante, la caspasa-3 no intervendría en el mecanismo de muerte activado por estos compuestos y la caspasa-8 tampoco actuaría en respuesta a dosis

bajas de alisertib, sino que otras caspasas estarían implicadas en estos casos. Una de ellas podría ser la caspasa-2, cuya activación se ha relacionado con el arresto mitótico y la inducción de muerte dependiente o independiente de Bax y Bak [807, 808]. Por otro lado, algunos autores han encontrado que RIPK1 está involucrado en la muerte inducida por los inhibidores de Aurora quinasa [794, 1034]; sin embargo, nosotros descartamos la participación de esta proteína en la acción citotóxica de los inhibidores en ninguna de las líneas, salvo quizá en las células U266, pero podría intervenir cuando las caspasas se inactivan en respuesta a barasertib a dosis bajas en las células OPM-2 y, de forma más discreta, en la respuesta a ambos inhibidores en las células U266, MM.1S *wild-type* y MM.1S DKO.

Otro evento que se ha relacionado con el mecanismo de acción de los fármacos antimitóticos es el incremento de los niveles de ROS totales, lo que puede acarrear consecuencias muy diversas, como puede ser la inducción de autofagia, poliploidía, senescencia o la muerte de las células, aunque todos estos efectos se previenen en presencia de agentes antioxidantes [526, 777, 812]. Los ensayos de toxicidad realizados con el antioxidante glutatión sugieren que los ROS totales pueden contribuir parcialmente a la muerte inducida por alisertib y barasertib en algunas líneas celulares. En cualquier caso, convendría determinar si estos inhibidores alteran el nivel de estrés oxidativo global de las células para dar mayor robustez a estos resultados.

Recientemente, se ha propuesto que un subconjunto de proteínas Aurora A se expresan durante la interfase, se localizan en las mitocondrias y pueden afectar a estos orgánulos a nivel morfológico y dinámico [194, 826]. En el caso de Aurora B también se ha descrito que su inhibición puede alterar la funcionalidad de las mitocondrias [812]. En este sentido, nuestros resultados sugieren que dosis altas de alisertib y barasertib provocan la hiperpolarización mitocondrial en las células RPMI 8226, quizá debido a su mayor dependencia por la glucólisis para sobrevivir, pero no en el resto de líneas celulares. Además, ambos compuestos estimulan la producción de ROS mitocondriales e incrementan la masa mitocondrial, incluso teniendo en cuenta el aumento del tamaño celular que provocan. Esto puede afectar a las células en múltiples sentidos, ya que el aumento de los niveles de ROS en las mitocondrias se ha visto relacionado con la inducción de distintos tipos de muerte y senescencia [166, 858, 860]. Asimismo, ensayos de toxicidad llevados a cabo en las células U937 (una leucemia monocítica) desprovistas de DNA mitocondrial nos lleva a suponer que los ROS mitocondriales generados son un importante agente causal de muerte ocasionada por alisertib y barasertib, un papel que se también se les ha adjudicado en otros contextos [879]. Finalmente, esperábamos que los inhibidores metabólicos DCA y metformina aumentaran y disminuyeran, respectivamente, la producción de ROS mitocondriales cuando se co-incubaban con alisertib y barasertib, dado que el primero obliga a las células a utilizar el sistema OXPHOS, lo que conlleva una mayor generación de estos subproductos, y el segundo inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, lo que bloquea su

generación [839, 880]. Sin embargo, observamos que estos compuestos provocan un aumento de la tasa de ROS por mitocondria por sí solos en las células NCI-H929 y U266, pero no en las células OPM-2, y cuando alisertib y barasertib están presentes, no se observó un patrón uniforme en el efecto de DCA y metformina.

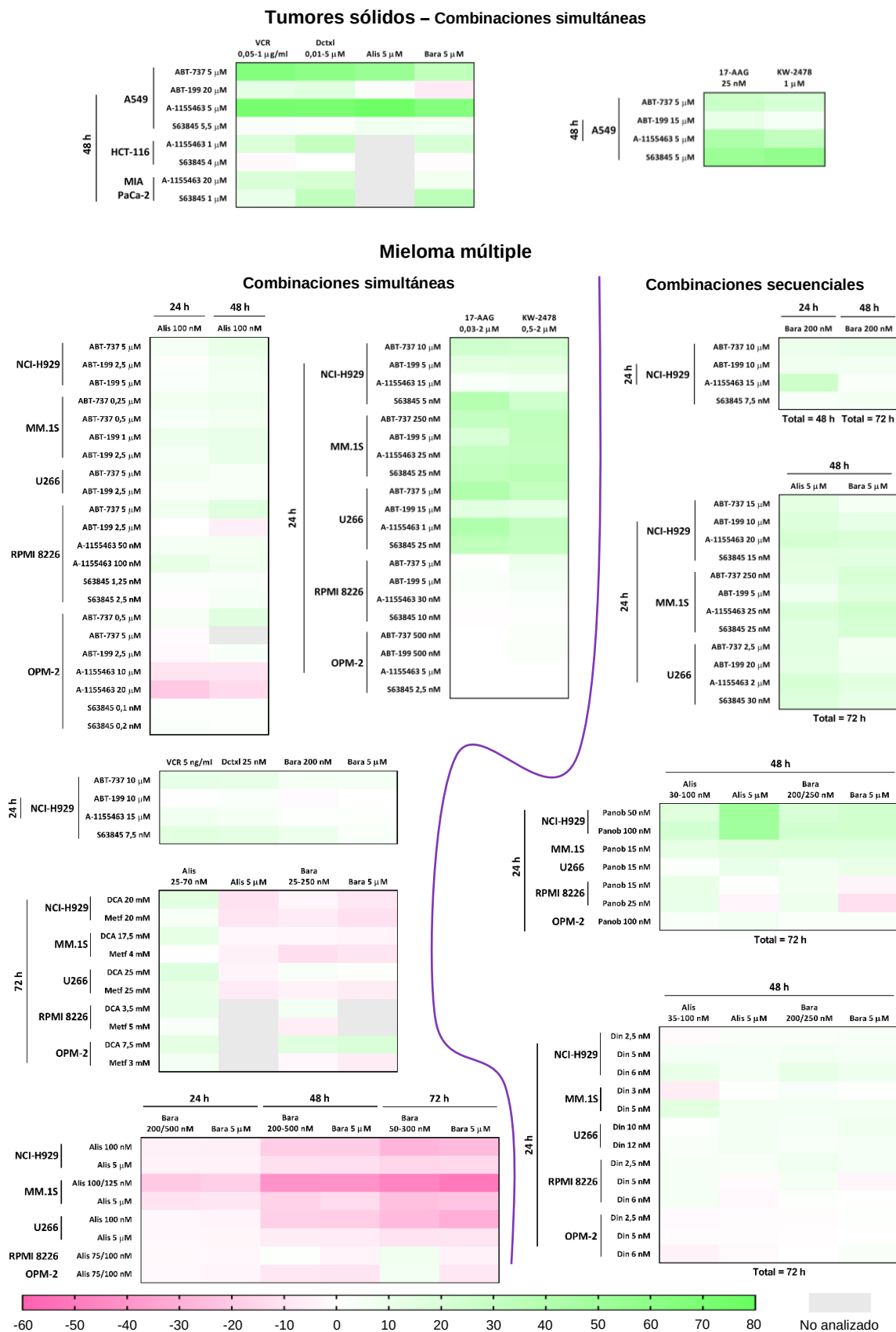
Por otro lado, diversos estudios han señalado la capacidad de los inhibidores de Aurora quinasa de inducir autofagia en células tumorales, incluidos alisertib y barasertib [500, 766]. En nuestro caso, observamos que alisertib y barasertib son capaces de activar el proceso autofágico en células de cáncer de pulmón, pero en las células de mieloma esta activación no se produce o lo hace de forma muy discreta. Estas observaciones impulsan, por tanto, a llevar a cabo estudios adicionales que eluciden los motivos por los que la autofagia se activa en unos tipos celulares y en otros, no.

Otra de las potenciales dianas para el tratamiento del cáncer son las proteínas de choque térmico, entre las que se incluye Hsp90, una chaperona que se encuentra sobreexpresada en muchos tipos de cáncer, incluido el de pulmón [408]. Además, en el caso del mieloma múltiple, las chaperonas son cruciales para mantener la homeostasis proteica debido al estrés proteotóxico al que están sometidas como consecuencia de la continua síntesis y secreción de inmunoglobulinas [584]. Por ello, en este trabajo se ha evaluado el potencial terapéutico de dos inhibidores de Hsp90, 17-AAG y KW-2478, en células de cáncer de pulmón y de mieloma y se ha profundizado en su mecanismo de acción. Observamos que ambos compuestos, especialmente 17-AAG, inducen arresto mitótico en las células A549 y concluimos que dicha parada es reversible, dado que estos compuestos no inducen senescencia y las células recuperan su capacidad proliferativa cuando estos se eliminan del medio de cultivo. Este resultado coincide con lo observado previamente en algunas células tumorales con inhibidores de este tipo [550]. Por otra parte, nuestros resultados reflejan un mayor poder citotóxico de estos compuestos en las células de mieloma múltiple que en las células de cáncer de pulmón. En las células de mieloma observamos que cada línea celular mostraba una sensibilidad similar a ambos inhibidores, mostrándose más afectadas las células MM.1S. Además, determinamos que la ausencia de Bax y Bak protege de la acción citotóxica de los compuestos tras 24 horas de actuación, pero a 48 horas las células MM.1S DKO siguen siendo sensibles. Esto contrasta con los resultados obtenidos en un estudio previo, donde se observó protección en distintos tipos celulares que no expresaban Bax y Bak frente a distintos inhibidores de Hsp90, incluido 17-AAG [568]. Además, tanto en el citado estudio como en otros se sugiere que Bax es necesaria para la acción citotóxica de 17-AAG [568, 923, 924]. No obstante, las diferencias en los resultados de este trabajo y el primero que se ha mencionado podrían radicar en el uso de distintos modelos celulares. Finalmente, a partir de los ensayos con el inhibidor de la caspasa-8 en las células DKO concluimos que 17-AAG y KW-2478 activan las rutas intrínseca y extrínseca de la apoptosis, así como otros mecanismos de

muerte independientes de caspasa-8 y de Bax/Bak. Una posibilidad es que estos compuestos activen la vía UPR, afectando al retículo endoplásmico, pero no a las mitocondrias.

A pesar del salto cualitativo que ha supuesto la terapia dirigida en el tratamiento del cáncer, este tipo de compuestos presentan limitaciones importantes al utilizarse como monoterapia, como una eficacia limitada, toxicidades asociadas y la aparición de resistencias [94, 361, 1035]. Por ello, buena parte de las investigaciones actuales se centran en la evaluación de estrategias terapéuticas basadas en la combinación de dos o más agentes antitumorales. En este sentido, el presente trabajo hace su particular contribución testando, tanto en células de tumores sólidos como de mieloma múltiple, nuevas combinaciones cuyo eje principal son los compuestos estudiados.

Por lo general, nuestros resultados revelan una clara heterogeneidad en la eficacia de las combinaciones ensayadas, pues esta está condicionada por múltiples factores, incluidos el tipo de fármaco, la línea celular, la duración del tratamiento y la pauta de administración de los fármacos (Fig. 6.1).



24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
	Din 2,5 nM				
OPM-2	Din 5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

Total = 72 h

24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
	Din 2,5 nM				
OPM-2	Din 5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

Total = 72 h

24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
	Din 2,5 nM				
OPM-2	Din 5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

Total = 72 h

24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
	Din 2,5 nM				
OPM-2	Din 5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

Total = 72 h

24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
	Din 2,5 nM				
OPM-2	Din 5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

Total = 72 h

24 h

		Alis 100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/500 nM	Bara 5 µM	Bara 50-300 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
MM.1S	Alis 100/125 nM						
	Alis 5 µM						
U266	Alis 100 nM						
	Alis 5 µM						
RPMI 8226	Alis 75/100 nM						
	Alis 75/100 nM						

24 h

		Alis 35-100 nM	Alis 5 µM	Bara 200/250 nM	Bara 5 µM
NCI-H929	Din 2,5 nM				
	Din 5 nM				
	Din 6 nM				
MM.1S	Din 3 nM				
	Din 5 nM				
	Din 10 nM				
U266	Din 12 nM				
	Din 2,5 nM				
	Din 6 nM				
RPMI 8226	Din 5 nM				
	Din 6 nM				

En cuanto a la combinación simultánea de miméticos BH3 y fármacos antimitóticos, incluidos alisertib y barasertib, esta estrategia resulta más efectiva en células de tumores sólidos. El efecto sinérgico más robusto se produce en las células A549 cuando se inhibe Bcl-X_L mediante A-1155463 y, en menor medida, ABT-737, como ya se ha visto en anteriores trabajos del grupo [418, 426], lo que correlaciona con nuestra propuesta de que la supervivencia de estas células depende de esta proteína anti-apoptótica. En el caso de las células MIA PaCa-2 también resulta coherente encontrar una mayor sinergia al utilizar S63845, ya que nuestros resultados sugieren una alta dependencia de estas células por Mcl-1. En cambio, la sinergia observada en las células HCT-116 con A-1155463 no parece estar relacionada con la dependencia observada en esta línea celular por las proteínas anti-apoptóticas a nivel basal. Respecto a las células de mieloma, en un principio cabía esperar detectar sinergia al neutralizar Mcl-1 en las células NCI-H929 y Bcl-X_L en las células MM.1S, dado que algunos estudios han apuntado a estas proteínas como principales sustentadoras de la supervivencia de estas células [588, 605], así como al inhibir Bcl-2 en las células U266, ya que estas células portan la translocación t(11;14), la cual se suele asociar con una sobreexpresión de esta proteína anti-apoptótica [949]. Sin embargo, los resultados revelan que no se produce un efecto sinérgico destacable al combinar los miméticos BH3 con alisertib a dosis en el rango nanomolar durante 24 y 48 horas en ninguna línea celular, e incluso, en algunos casos tiene lugar un efecto antagónico. Igualmente, la combinación de los miméticos BH3 con otros fármacos antimitóticos como vincristina, docetaxel y barasertib tampoco se muestra eficaz en las células NCI-H929. Por lo tanto, todo esto sugiere que la dependencia inicial por una(s) u otra(s) proteína(s) anti-apoptótica(s) no es un factor determinante en las células de mieloma para la eficacia de estas combinaciones, como ocurre en la línea HCT-116, aunque también es posible que los fármacos antimitóticos modifiquen dicha dependencia.

Si se cambia la pauta de administración de simultánea a secuencial, dejando actuar en solitario a los inhibidores de Aurora A y B a dosis altas durante 48 horas y adicionando entonces los miméticos BH3 para que el conjunto actúe durante 24 horas más, se detecta un ligero efecto sinérgico generalizado en las líneas celulares NCI-H929, MM.1S y U266, aunque, de nuevo, no existe una relación directa entre este efecto y las proteínas asociadas con la supervivencia de cada una de ellas. En cualquier caso, estos resultados indican que es necesaria la actuación de los inhibidores de Aurora quinasa en solitario a dosis elevadas previamente a la adición de los miméticos BH3, ya que de esto haría más dependientes a las células de las proteínas de la familia Bcl-2. Esto es posible ya que se ha publicado que la combinación secuencial de vincristina y S63845 ha resultado efectiva en modelos celulares y animales de rhabdomyosarcoma y que este tratamiento promueve la liberación de Bak del secuestro de Mcl-1, restaurando la apoptosis [960]. No obstante, en nuestro caso, se necesitan estudios adicionales en esta dirección que confirmen esta hipótesis.

Teniendo en cuenta la mayor dependencia de los tumores sólidos por Bcl-X_L y/o Mcl-1 [93], es coherente observar sinergia en las células tumorales de pulmón, de colon y de páncreas al inhibir específicamente estas proteínas. En cambio, los linfocitos son altamente dependientes de Bcl-2 [1036] y las neoplasias hematológicas como leucemias y linfomas sobreexpresan este miembro anti-apoptótico [1037–1039]. De hecho, por el momento, el uso clínico de venetoclax (inhibidor específico de Bcl-2) ha sido aprobado únicamente en determinadas leucemias [104, 105]. Sin embargo, el mieloma múltiple es una enfermedad heterogénea en lo que respecta su dependencia por las proteínas anti-apoptóticas, siendo especialmente relevante Mcl-1 [588, 605, 944]. Por ello, la escasa eficacia de las combinaciones testadas en las células de mieloma contrasta con lo esperado en un principio. Una posible explicación a la mayor eficiencia de las combinaciones en células de tumores sólidos, especialmente al inhibir Bcl-X_L en las células de cáncer de pulmón, puede ser que las células A549 son altamente dependientes de Bcl-X_L, mientras que en las células de mieloma podría existir co-dependencia por dos o más miembros anti-apoptóticos [588, 608], de manera que solo la inhibición simultánea de varias de ellas conseguiría sensibilizar a la acción citotóxica de los fármacos antimetabólicos.

Estudios recientes han propuesto la denominada “terapia *one-two punch*”, que consiste en inducir primero senescencia de forma específica en las células tumorales para generar un nuevo estado de vulnerabilidad, el cual es aprovechado después por agentes senolíticos, para atacar selectivamente a las células senescentes [666, 1040, 1041]. Varios estudios han reportado que los miméticos BH3 ABT-737, navitoclax e inhibidores selectivos de Bcl-X_L poseen actividad senolítica [113, 577, 1042]. En este sentido, este trabajo reafirma el potencial senolítico de los miméticos BH3 observado en un trabajo previo del grupo en las células A549 senescentes [418], a la vez que confirma la dependencia exclusiva de estas células por Bcl-X_L y que la muerte inducida es parcialmente dependiente de caspasas. En el caso de las células MIA PaCa-2, no pudimos evaluar el potencial senolítico de los miméticos BH3, pero sí comprobamos que estos disminuían la viabilidad de las células senescentes. Por otro lado, dado que hemos demostrado que el tratamiento con dosis altas de alisertib y barasertib induce la entrada en senescencia en las células de mieloma, es posible que los miméticos BH3 actúen como agentes senolíticos, aunque esta hipótesis debería ser confirmada.

En cuanto a la combinación simultánea de miméticos BH3 e inhibidores de Hsp90, en las células A549 resulta llamativo que se produzca una mayor sinergia al inhibir Mcl-1 que al bloquear Bcl-X_L mediante A-1155463 o ABT-737, ya que, como se ha mencionado anteriormente, sugerimos que estas células son altamente dependientes de Bcl-X_L. Este efecto podría deberse a que el tratamiento con los inhibidores de Hsp90 incrementa la dependencia de estas células por Mcl-1, lo que podría estar impidiendo que estos inhibidores induzcan senescencia en estas células, ya que Mcl-1 bloquea la entrada en senescencia inducida por la

quimioterapia a través de un bucle independiente del dominio de unión a BH3, el cual está formado por los residuos Lys194, Lys197, Pro198 y Gly203 [1043]. En el caso de las células de mieloma, el hecho de que la combinación simultánea de ambas familias de compuestos resulte moderadamente sinérgica en las células NCI-H929, MM.1S y U266, pero no se muestre efectiva en las células RPMI 8226 y OPM-2 sugiere que estos tratamientos activan mecanismos moleculares diferentes en función de la línea celular, un aspecto en el que se debe profundizar para comprender mejor los efectos observados. En el caso de las células NCI-H929 y MM.1S, teniendo en cuenta que son células altamente dependientes de Mcl-1 y Bcl-X_L a nivel basal, respectivamente [588, 605] y que la combinación de 17-AAG/KW-2478 con los miméticos BH3 induce sinergia en mayor o menor grado, es factible pensar que los inhibidores de Hsp90 alteran la dependencia de estas células por las proteínas de la familia Bcl-2. Por lo tanto, efectos sinérgicos más potentes podrían conseguirse realizando combinaciones triples que incluyan los inhibidores de Hsp90 y dos antagonistas selectivos de las proteínas anti-apoptóticas. Finalmente, las sinergias más importantes en las células U266 se producen con ABT-737, A-1155463 y S63845, especialmente cuando estos se combinan con 17-AAG. Esto indicaría, por tanto, que en este contexto estas células dependen de Bcl-X_L y Mcl-1, coincidiendo con su dependencia inicial [588], pero que el hecho de que porten la translocación t(11;14) no las hace más sensibles que otras líneas a ABT-199 cuando este se combina con inhibidores de Hsp90, como podría esperarse. Todo esto evidencia, de nuevo, el carácter heterogéneo del mieloma y la necesidad de identificar los factores que permitan predecir la eficacia de las combinaciones.

La combinación secuencial de los inhibidores de Aurora quinasa y el inhibidor de histona deacetilasas panobinostat resulta altamente sinérgica en las células NCI-H929 cuando alisertib se utiliza a dosis altas. Cabe la posibilidad de que el distinto mecanismo de acción de alisertib y barasertib haya influido en el efecto observado, ya que alisertib provoca un arresto mitótico prolongado, mientras que barasertib es más propenso a la inducción de deslizamiento mitótico. No obstante, esto no explicaría la menor eficacia de esta combinación en otras líneas celulares ni de la combinación con alisertib a dosis bajas. También es posible que la sinergia observada esté relacionada con el potencial senolítico de panobinostat demostrado recientemente, asociado a una disminución de Bcl-X_L y a un aumento de la acetilación de la histona H3 [1044]. En cualquier caso, con los datos obtenidos en esta tesis no podemos construir una hipótesis consistente que pueda explicar el motivo por el cual la combinación más efectiva es la de alisertib a dosis altas y panobinostat en las células NCI-H929 y por qué el efecto de la combinación de los inhibidores de Aurora quinasa con panobinostat es tan distinto en función de la línea celular. Por ello, son necesarios estudios adicionales que permitan dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos y de las combinaciones ensayadas. En este sentido, algunos autores han descubierto que varios inhibidores de histona deacetilasas, entre ellos LBH589 (panobinostat), provocan la

degradación de Aurora A y/o B en el proteasoma en células de tumores sólidos y en células humanas no transformadas [996, 997]. Además, un estudio ha reportado sinergia al combinar alisertib a dosis bajas y romidepsina en modelos celulares y animales de linfoma de células T y ha demostrado que la combinación induce apoptosis, poliploidía y provoca el fallo en la citoquinesis [992].

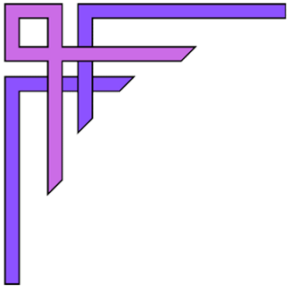
La inhibición de las proteínas Aurora y las CDKs se ha revelado sinérgica en modelos celulares de AML [977]. Sin embargo, en nuestro caso, la combinación secuencial de los inhibidores de Aurora A/B y dinaciclib no ha resultado efectiva en células de mieloma. Un trabajo previo del grupo ha demostrado que dinaciclib reduce la expresión de Mcl-1 en las cinco líneas de mieloma utilizadas en este trabajo (como consecuencia de la inhibición de CDK9) [423], mientras que nuestros resultados apuntan a una sobrerregulación de esta proteína cuando se inhiben las proteínas Aurora. Puesto que Mcl-1 se ha propuesto como una proteína importante para la supervivencia del mieloma, es posible que la actuación de ambos tipos de compuestos en sentidos opuestos sea una de las causas del fracaso de esta estrategia combinatoria, aunque convendría confirmar esta teoría en futuros estudios mediante la comprobación de sus niveles de expresión, así como los de otros miembros de la familia, y la evaluación de las interacciones que establecen entre ellas.

Por otro lado, la plasticidad metabólica de las células tumorales es una de sus grandes aliadas para adaptarse al entorno y aumentar su agresividad, ya que se asocia con el proceso metastático y la resistencia a los tratamientos [1045]. Por ello, en los últimos años se está trabajando en el desarrollo de moduladores metabólicos que podrían ayudar a superar las resistencias a los quimioterápicos [1045]. Entre ellos se encuentran DCA y metformina, dos inhibidores que bloquean las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa y el complejo I del sistema OXPHOS, respectivamente, y consiguen reprogramar el metabolismo hacia un mayor uso de la cadena respiratoria o de la glucólisis [839, 880]. No obstante, nuestros resultados reflejan que la combinación simultánea de estos inhibidores metabólicos con los inhibidores de Aurora quinasa no es muy beneficiosa, ya que tan solo se produce una pequeña sinergia al combinar alisertib a dosis bajas con DCA en todas las líneas celulares y con metformina en las células U266, así como barasertib con DCA en las células OPM-2. Comparando estos resultados con el efecto de los inhibidores metabólicos en la generación de ROS mitocondriales asociada a la acción de alisertib y barasertib, suponemos que otros factores distintos a los ROS mitocondriales están ligados a las pequeñas sinergias observadas, los cuales deberían ser descubiertos y analizados.

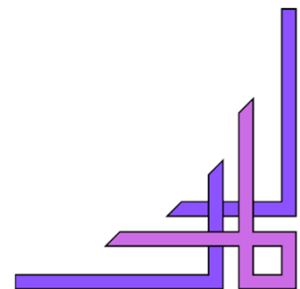
En conclusión, las estadísticas indican que, hoy en día, la erradicación del cáncer es todavía una utopía. Pese a que aún queda un largo camino por recorrer, los enormes esfuerzos realizados históricamente por la comunidad científica para comprender las bases moleculares y celulares del

cáncer, los mecanismos subyacentes a la progresión y diseminación tumorales y la farmacoresistencia han permitido introducir importantes mejoras en el ámbito terapéutico que han contribuido a mejorar de manera significativa la vida de los pacientes con cáncer. No obstante, todavía se necesitan estudios en múltiples direcciones que permitan identificar la mejor estrategia terapéutica para cada paciente. En este sentido, el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas o la mejora de las ya conocidas y la búsqueda de combinaciones más específicas y eficaces son aspectos de vital importancia.

Si bien en este trabajo se ha demostrado que los miméticos BH3, los fármacos antimitóticos y los inhibidores de Hsp90 despliegan actividad citotóxica en células tumorales de distinta naturaleza, también ha quedado patente que la eficacia de su combinación entre sí o con otros agentes anti-neoplásicos es variable en función del tipo celular, lo que puede estar relacionado con la plasticidad de las células malignas en su adicción por las diferentes proteínas anti-apoptóticas. De hecho, la combinación de miméticos BH3 y fármacos antimitóticos resulta más beneficiosa en el tratamiento de tumores sólidos que en el del mieloma múltiple, mientras que la de los miméticos BH3 y los inhibidores de Hsp90 puede ser efectiva en ambos tipos de tumores. Además, los buenos resultados obtenidos en las células A549 senescentes apuntan a los miméticos BH3 como una oportunidad terapéutica que permitiría combatir situaciones donde la senescencia es importante, como en enfermedades relacionadas con el envejecimiento y en el cáncer cuando la quimioterapia induce senescencia [579, 1040, 1046–1048]. No obstante, se requieren más estudios que evalúen la eficacia de estas combinaciones en otros tipos tumorales, así como ensayos *in vivo* y en pacientes que permitan conocer la efectividad real de cada terapia, ya que factores como el microentorno tumoral son cruciales en la respuesta de las células tumorales a los tratamientos. Por otro lado, determinadas combinaciones de los inhibidores de Aurora quinasa con otros agentes antitumorales ha resultado sinérgica en algunas líneas celulares, lo que apunta a su posible uso en algunos casos. Sin embargo, son necesarias investigaciones más exhaustivas que ayuden a identificar marcadores con los que poder predecir la respuesta a las distintas combinaciones, con el fin de encontrar la mejor opción terapéutica para cada tipo de cáncer.



CONCLUSIONES



7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

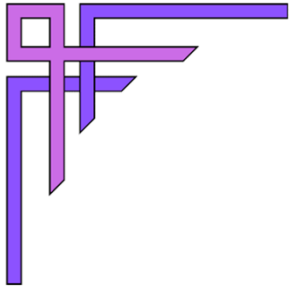
1. La supervivencia de las células A549 recae principalmente en Bcl-X_L, mientras que las células MIA PaCa-2 dependen de Mcl-1 para su supervivencia. Las células HCT-116, sin embargo, podrían experimentar co-dependencia por las tres principales proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1).
2. ABT-737, ABT-199 y, posiblemente, S63845 activan la autofagia en las células A549, aunque solo en el caso del inhibidor de Mcl-1 podría llegar a completarse. En las células de mieloma, por lo general, los miméticos BH3 a las dosis utilizadas no inducen autofagia, y en caso de hacerlo, la activación sería muy discreta. Finalmente, alisertib y barasertib activan la autofagia en las células A549, mientras que en las células de mieloma alisertib provoca un mínimo flujo autofágico únicamente en las células NCI-H929 y U266 y, solo a dosis altas en las células RPMI 8226.
3. Barasertib induce senescencia en las células MIA PaCa-2 y los miméticos BH3 ABT-737, A-1155463 y S63845 comprometen parcialmente la supervivencia de las células senescentes. En cambio, ABT-737 y A-1155463 despliegan una potente actividad senolítica en las células A549 senescentes a corto plazo, y ABT-737 conserva esta capacidad a largo plazo. Sin embargo, S63845 no posee este potencial. Además, el mecanismo de muerte desencadenado por A-1155463 como senolítico es altamente dependiente de caspasas.
4. En las células A549 los inhibidores de Hsp90 conducen a la parada del ciclo celular en la fase G2/M desde muy temprano, especialmente 17-AAG, aunque no inducen senescencia. Además, incrementan su actividad antitumoral en función del tiempo y de la dosis.
5. La combinación simultánea de fármacos antimetabólicos con miméticos BH3 da lugar a un potente efecto sinérgico con ABT-737 y, en particular, con A-1155463 en las células A549, y a una sinergia modesta al combinar vincristina/docetaxel con ABT-199. En las células HCT-116, la sinergia se observa con el inhibidor de Bcl-X_L, especialmente cuando se combina con docetaxel. Por último, en las células MIA PaCa-2 el efecto sinérgico es mayor al combinar docetaxel y barasertib con S63845 que vincristina y docetaxel con A-1155463.
6. La acción conjunta de los inhibidores de Hsp90 con ABT-737, A-1155463 y, en especial, con S63845 en las células A549 deriva en sinergia, mientras que en el caso de ABT-199 solo la combinación con 17-AAG es levemente sinérgica. Por el contrario, en el mieloma,

- la combinación simultánea de inhibidores de Hsp90 y determinados miméticos BH3 desencadena un efecto sinérgico en algunas líneas celulares.
7. La exposición a los distintos miméticos BH3 induce la pérdida de expresión de PUMA en casi todas las situaciones testadas, mientras que el tratamiento con S63845 provoca un incremento de la expresión de Mcl-1, el cual es más llamativo en las células NCI-H929.
 8. Bim participa en mayor o menor medida en la muerte inducida por los miméticos BH3 en el mieloma múltiple, aunque proteínas equivalentes a Bim suplirían su función apoptótica cuando esta está ausente.
 9. La sobreexpresión de Bcl-X_L confiere resistencia a ABT-199 y S63845, mientras que la sobreexpresión de Mcl-1 la proporciona frente a ABT-199 y A-1155463. Además, A-1155463 no protege frente a la elevada expresión de Bcl-X_L y S63845 protege de manera parcial frente a la abundancia de Mcl-1.
 10. Alisertib y barasertib poseen actividad anti-mieloma que se fortalece con el paso del tiempo. Ambos compuestos reducen el potencial proliferativo de las células y son citotóxicos, aunque es alisertib el que despliega, por lo general, una mayor actividad antitumoral a tiempos prolongados. Además, en las células NCI-H929, MM.1S y U266 alisertib es más efectivo a dosis bajas que a dosis altas.
 11. Alisertib a dosis en el rango nanomolar y barasertib en el rango micromolar conducen a la parada del ciclo celular en la fase G2/M desde muy temprano y exposiciones prolongadas fomentan la aparición de células poliploides, especialmente en las tratadas con barasertib. Además, el tratamiento con alisertib a dosis bajas activa la catástrofe mitótica, dando lugar a morfologías nucleares micro-, macro- y multinucleadas.
 12. Dosis altas de alisertib y barasertib conducen a una parte de las células de mieloma a un estado senescente.
 13. La expresión de proteínas reguladoras de la mitosis se ve alterada en función del tratamiento y la línea celular. Ciclina B1 se acumula en las células NCI-H929, MM.1S U266 y OPM-2 tras la actuación de alisertib durante largos periodos de tiempo, mientras que su expresión apenas varía tras la acción de barasertib. Solamente las células RPMI 8226 presentan una baja expresión de esta proteína como consecuencia de los tratamientos. Por otro lado, la expresión de las proteínas BUBR1 y MAD2 es heterogénea y varía en función del compuesto y dosis utilizados y de la línea celular evaluada.
 14. El tratamiento con alisertib y barasertib provoca un aumento de los niveles de Bcl-2 en las células RPMI 8226 y de Mcl-1 en todas las líneas celulares salvo en las U266.

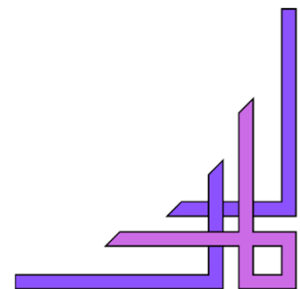
Asimismo, PUMA incrementa o disminuye su expresión en las células U266, RPMI 8226 y OPM-2 en función del compuesto y la dosis utilizados.

15. Bim no es relevante para la actividad citotóxica de estos compuestos en el mieloma múltiple, exceptuando alisertib en las células U266 y OPM-2, en este último caso solo ante exposiciones prolongadas. Por tanto, otras proteínas de su misma clase cubrirían su función pro-apoptótica.
16. La ausencia de Bax y Bak proporciona una protección elevada frente a la acción citotóxica de vincristina, barasertib y dosis altas de alisertib, y protege en menor medida frente a docetaxel. En cambio, en el caso de alisertib a dosis bajas se activarían mecanismos alternativos de muerte independientes de estas dos proteínas.
17. La sobreexpresión de Mcl-1 en las células RPMI protege parcialmente frente a docetaxel y dosis bajas de alisertib a medio plazo, mientras que una elevada expresión de Bcl-X_L protege de forma parcial a exposiciones prolongadas de alisertib. Sin embargo, la sobreexpresión de estas proteínas no proporciona resistencia a vincristina.
18. La implicación de las caspasas y de RIPK1 en la muerte inducida en el mieloma por los inhibidores de Aurora quinasa depende de la línea celular. No obstante, la caspasa-3 no media en dicho proceso en las células MM.1S y la vía extrínseca de la apoptosis no se activa cuando Bax y Bak no están presentes en las células MM.1S.
19. La participación de las especies reactivas de oxígeno totales en la acción citotóxica de alisertib y barasertib varía en función de la línea celular, el compuesto y la dosis utilizada.
20. Alisertib y barasertib provocan la despolarización de la membrana mitocondrial externa en todas las líneas celulares de mieloma, así como la salida del citocromo c en las células MM.1S. Además, el citocromo c también parece liberarse en ausencia de Bax y Bak en respuesta a dosis bajas de alisertib, por lo que la salida del citocromo c en este caso se produciría a través de un mecanismo independiente de Bax y Bak. Por otro lado, concentraciones elevadas de alisertib y barasertib inducen la hiperpolarización mitocondrial en las células RPMI 8226.
21. Las células de mieloma incrementan su masa mitocondrial y la producción de ROS mitocondriales en respuesta a alisertib y barasertib, así como la tasa de ROS por mitocondria. Además, los ROS mitocondriales podrían estar implicados en la citotoxicidad asociada a ambos inhibidores.
22. El efecto de DCA y metformina sobre la generación de ROS mitocondriales por parte de los inhibidores de Aurora A y B en las células de mieloma depende de la línea celular y el tratamiento aplicado. No obstante, el tratamiento simultáneo con DCA y alisertib en el

- rango nanomolar deriva en una pequeña sinergia en todas las líneas celulares de mieloma, al igual que barasertib con DCA en las células OPM-2 y alisertib a dosis bajas con metformina en las células U266.
23. Los inhibidores de Hsp90 17-AAG y KW-2478 activan las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis y otros mecanismos de muerte independientes de caspasa-8 y de Bax/Bak en células de mieloma.
 24. Distintas estrategias combinatorias que incluyen a los fármacos antimitóticos y los miméticos BH3 dan lugar principalmente a un efecto aditivo en las células de mieloma. La excepción se produce al combinar de manera secuencial los inhibidores de Aurora A y B en el rango micromolar y determinados miméticos BH3 en las células NCI-H929, MM.1S y U266, en las que se logra inducir una modesta sinergia.
 25. La acción concomitante de alisertib y barasertib induce un efecto antagónico en la mayor parte de las líneas celulares de mieloma.
 26. La combinación secuencial de los inhibidores de Aurora quinasa y dinaciclib no resulta efectiva en células de mieloma múltiple. En cambio, esta estrategia resulta ligeramente sinérgica en algunas líneas celulares si se utiliza panobinostat, y es especialmente robusta en las células NCI-H929 cuando alisertib se usa en el rango micromolar.



BIBLIOGRAFÍA



8. Bibliografia

1. Clarke, P. G. H., & Clarke, S. (2012). Nineteenth century research on cell death. *Experimental oncology*, 34(3), 139–145.
2. Reynolds, A. S. (2014). The deaths of a cell: How language and metaphor influence the science of cell death. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 48, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2014.06.003>
3. Zakeri, Z., & Lockshin, R. A. (2008). Cell Death: History and Future. In *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy. Advances in Experimental Medicine and Biology* (vol 615., pp. 1–11). Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_1
4. Manoharan, A., Kiefer, T., Leist, S., Schrader, K., Urban, C., Walter, D., ... Borner, C. (2006). Identification of a ‘genuine’ mammalian homolog of nematodal CED-4: is the hunt over or do we need better guns? *Cell Death & Differentiation*, 13(8), 1310–1317. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401948>
5. Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2007). Cell death in health and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(6), 1214–1224. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00150.x>
6. Green, D. R. (2022). A Matter of Life and Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(1), a041004. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041004>
7. Wimmer, K., Sachet, M., & Oehler, R. (2020). Circulating biomarkers of cell death. *Clinica Chimica Acta*, 500, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.003>
8. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... 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>
9. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ... Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
10. Schweichel, J.-U., & Merker, H.-J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253–266. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>
11. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
12. Nunes, T., Bernardazzi, C., & de Souza, H. S. (2014). Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. *BioMed Research International*, 2014, 218493. <https://doi.org/10.1155/2014/218493>
13. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>

14. Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
15. Agrawal, Dr. S. N. (2019). The Vital Phenomena of Apoptosis: A Review. *South Asian Research Journal of Medical Sciences*, 01(01), 15–19. <https://doi.org/10.36346/sarjms.2019.v01i01.004>
16. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
17. Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
18. D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
19. Coleman, J., Liu, R., Wang, K., & Kumar, A. (2016). Detecting Apoptosis, Autophagy, and Necrosis. In *Apoptosis Methods in Toxicology* (pp. 77–92). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3588-8_5
20. Eguchi, K. (2001). Apoptosis in autoimmune diseases. *Internal medicine*, 40(4), 275–284. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.40.275>
21. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... 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>
22. Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death & Differentiation*, 9(4), 367–393. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400950>
23. Zhang, H., Ofengeim, D., Shi, Y., Zhang, F., Hwang, J.-Y., Chen, J., & Zukin, R. S. (2016). 5 - Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-Induced Neuronal Death. In *Stroke* (Sixth Edit., pp. 60-79.e5). London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29544-4.00005-0>
24. Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., ... Kroemer, G. (2011). Programmed Necrosis: From Molecules to Health and Disease. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 289, pp. 1–35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386039-2.00001-8>
25. Cui, J., Zhao, S., Li, Y., Zhang, D., Wang, B., Xie, J., & Wang, J. (2021). Regulated cell death: discovery, features and implications for neurodegenerative diseases. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00799-8>
26. Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2019). Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*, 4(15), e128834. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834>

27. Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., & Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis*, 19(4), 555–566. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0967-2>
28. Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: The dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 367–376. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.143>
29. Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 2(2), 39–48. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.40>
30. Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
31. Liu, Y., Shoji-Kawata, S., Sumpter, R. M., J., Wei, Y., Ginet, V., Zhang, L., ... Levine, B. (2013). Autosis is a Na^+ , K^+ -ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20364–20371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319661110>
32. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... 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.2008.150>
33. Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2020). The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 398–414. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0232-1>
34. Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C., Haas, D. A., Benda, C., Hubel, P., ... Pichlmair, A. (2018). Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nature Immunology*, 19(2), 130–140. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0013-y>
35. Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Di Domizio, A., & Limonta, P. (2020). The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(2), 188338. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188338>
36. Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 85–100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
37. Chota, A., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. *Oncotarget*, 12(16), 1615–1626. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.28031>
38. Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
39. Dandoti, S. (2021). Mechanisms adopted by cancer cells to escape apoptosis—A review. *BIOCELL*, 45(4), 863–884. <https://doi.org/10.32604/biocell.2021.013993>

40. Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
41. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
42. Bedoui, S., Herold, M. J., & Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11), 678–695. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0270-8>
43. Solano-Gálvez, S., Abadi-Chiriti, J., Gutiérrez-Velez, L., Rodríguez-Puente, E., Konstat-Korzenny, E., Álvarez-Hernández, D.-A., ... Vázquez-López, R. (2018). Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease. *Medical Sciences*, 6(3), 54. <https://doi.org/10.3390/medsci6030054>
44. Cao, K., & Tait, S. W. G. (2018). Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both? In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 337, pp. 135–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.003>
45. Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nature Reviews. Immunology*, 3(5), 361–370. <https://doi.org/10.1038/nri1083>
46. Tuomela, K., Ambrose, A. R., & Davis, D. M. (2022). Escaping Death: How Cancer Cells and Infected Cells Resist Cell-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 13, 867098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867098>
47. Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., & Lenardo, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13884–13888. <https://doi.org/10.1073/pnas.241358198>
48. Singh, P., & Lim, B. (2022). Targeting Apoptosis in Cancer. *Current Oncology Reports*, 24(3), 273–284. <https://doi.org/10.1007/s11912-022-01199-y>
49. Jeng, P. S., Inoue-Yamauchi, A., Hsieh, J. J., & Cheng, E. H. (2018). BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis. *Current Opinion in Physiology*, 3(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.03.005>
50. Hoves, S., Trapani, J. A., & Voskoboinik, I. (2010). The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(2), 237–243. <https://doi.org/10.1189/jlb.0909608>
51. Martínez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5047–5056. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>
52. Cullen, S. P., Brunet, M., & Martin, S. J. (2010). Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death and Differentiation*, 17(4), 616–623. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.206>
53. Banjara, S., Suraweera, C. D., Hinds, M. G., & Kvansakul, M. (2020). The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.3390/biom10010128>
54. Dadsena, S., King, L. E., & García-Sáez, A. J. (2021). Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(12), 183716. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183716>

55. Kelly, P. N., & Strasser, A. (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death & Differentiation*, 18(9), 1414–1424. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.17>
56. Renault, T. T., Dejean, L. M., & Manon, S. (2017). A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.04.007>
57. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
58. Okamoto, T., Coultas, L., Metcalf, D., van Delft, M. F., Glaser, S. P., Takiguchi, M., ... Huang, D. C. S. (2014). Enhanced stability of Mcl1, a prosurvival Bcl2 relative, blunts stress-induced apoptosis, causes male sterility, and promotes tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 261–266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321259110>
59. Germain, M., & Duronio, V. (2007). The N Terminus of the Anti-apoptotic BCL-2 Homologue MCL-1 Regulates Its Localization and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32233–32242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706408200>
60. Gouill, S. Le, Podar, K., Harousseau, J.-L., & Anderson, K. C. (2004). Mcl-1 Regulation and Its Role in Multiple Myeloma. *Cell Cycle*, 3(10), 1259–1262. <https://doi.org/10.4161/cc.3.10.1196>
61. Delbridge, A. R. D., & Strasser, A. (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 22(7), 1071–1080. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>
62. Andreu-Fernández, V., Genoves, A., Lee, T.-H., Stellato, M., Lucantoni, F., Orzáez, M., ... Pérez-Payá, E. (2014). Peptides Derived from the Transmembrane Domain of Bcl-2 Proteins as Potential Mitochondrial Priming Tools. *ACS Chemical Biology*, 9(8), 1799–1811. <https://doi.org/10.1021/cb5002679>
63. Andreu-Fernández, V., Sancho, M., Genovés, A., Lucendo, E., Todt, F., Lauterwasser, J., ... Orzáez, M. (2017). Bax transmembrane domain interacts with prosurvival Bcl-2 proteins in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), 310–315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612322114>
64. Lucendo, E., Sancho, M., Lolicato, F., Javanainen, M., Kulig, W., Leiva, D., ... Orzáez, M. (2020). Mcl-1 and Bok transmembrane domains: Unexpected players in the modulation of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(45), 27980–27988. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008885117>
65. 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>
66. Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., & Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(4), 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.024>

67. Peña-Blanco, A., & García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*, 285(3), 416–431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>
68. Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J. E., & Kuwana, T. (2011). BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 491–501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167148>
69. Dai, H., Smith, A., Meng, X. W., Schneider, P. A., Pang, Y.-P., & Kaufmann, S. H. (2011). Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 39–48. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102027>
70. Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., & Marzo, I. (2013). Direct Interaction of Bax and Bak Proteins with Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins in Living Cells Revealed by Fluorescence Complementation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(7), 4935–4946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422204>
71. Wolf, P. (2017). BH3 Mimetics for the Treatment of Prostate Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 557. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00557>
72. 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(4), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
73. Chen, H.-C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H.-C., Huang, Y., Ren, D., ... Cheng, E. H. (2015). An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nature Cell Biology*, 17(10), 1270–1281. <https://doi.org/10.1038/ncb3236>
74. Kodama, Y., & Hu, C.-D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 53(5), 285–298. <https://doi.org/10.2144/000113943>
75. Gonzalo, Ó., Benedi, A., Vela, L., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2023). Study of the Bcl-2 Interactome by BiFC Reveals Differences in the Activation Mechanism of Bax and Bak. *Cells*, 12(5), 800. <https://doi.org/10.3390/cells12050800>
76. Shi, Y. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3), 459–470. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00482-3)
77. Yuan, J. (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)
78. Bell, R. A. V, & Megeeney, L. A. (2017). Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1359–1368. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.37>
79. Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., & Tschachler, E. (2002). Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(2), 722–726. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00289-9)
80. Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., ... Nicholson, D. W. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by

- human caspase-12 polymorphisms. *Nature*, 429(6987), 75–79. <https://doi.org/10.1038/nature02451>
81. McArthur, K., & Kile, B. T. (2018). Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*, 28(6), 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.003>
 82. 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)
 83. Lavrik, I. N., & Krammer, P. H. (2009). Life and Death Decisions in the CD95 System: Main Proand Anti-Apoptotic Modulators. *Acta Naturae*, 1(1), 80–83. <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-1-80-83>
 84. Lavrik, I. N., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2665–2672. <https://doi.org/10.1172/JCI26252>
 85. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
 86. Gene: Caspase 16, pseudogene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2004). Retrieved December 15, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/197350>
 87. Fang, Y., & Peng, K. (2021). Regulation of innate immune responses by cell death-associated caspases during virus infection. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.16051>
 88. Brown-Suedel, A. N., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Caspase-2 Substrates: To Apoptosis, Cell Cycle Control, and Beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 610022. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.610022>
 89. Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The Apoptosis Paradox in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1328. <https://doi.org/10.3390/ijms23031328>
 90. Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews. Cancer*, 16(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
 91. Sharma, A., Boise, L. H., & Shanmugam, M. (2019). Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11081144>
 92. Montero, J., & Letai, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.183>
 93. Kehr, S., & Vogler, M. (2021). It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(5), 118987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118987>
 94. Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., & Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(4), 273–284. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.253>

95. 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>
96. Cory, S., & Adams, J. M. (2005). Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell*, 8(1), 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.012>
97. Opydo-Chanek, M., Gonzalo, O., & Marzo, I. (2017). Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochemical Pharmacology*, 136, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.006>
98. Molica, S. (2020). Venetoclax: a real game changer in treatment of chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Hematologic Oncology*, 9(4), 1JH31. <https://doi.org/10.2217/ijh-2020-0010>
99. Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., ... Rosenberg, S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042), 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>
100. Marzo, I., & Naval, J. (2008). Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 76(8), 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.06.009>
101. Xu, Y., & Ye, H. (2022). Progress in understanding the mechanisms of resistance to BCL-2 inhibitors. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00283-0>
102. Townsend, P. A., Kozhevnikova, M. V., Cexus, O. N. F., Zamyatnin, A. A., & Soond, S. M. (2021). BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 355. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02157-5>
103. Koff, J., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 2942–2955. <https://doi.org/10.3390/ijms16022942>
104. Lew, T. E., & Seymour, J. F. (2022). Clinical experiences with venetoclax and other pro-apoptotic agents in lymphoid malignancies: lessons from monotherapy and chemotherapy combination. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01295-3>
105. Sochacka-Ćwikła, A., Mączyński, M., & Regiec, A. (2022). FDA-Approved Drugs for Hematological Malignancies-The last decade review. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers14010087>
106. Klener, P., Sovilj, D., Renesova, N., & Andera, L. (2021). BH3 Mimetics in Hematologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10157. <https://doi.org/10.3390/ijms221810157>
107. Diepstraten, S. T., Anderson, M. A., Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2022). The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. *Nature Reviews Cancer*, 22(1), 45–64. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00407-4>

108. Tao, Z., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A. M., Park, C. H., ... 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>
109. Tsuji, K., Kida, Y., Koshikawa, N., Yamamoto, S., Shinozaki, Y., Watanabe, T., ... Takenaga, K. (2022). Suppression of non-small-cell lung cancer A549 tumor growth by an mtDNA mutation-targeting pyrrole-imidazole polyamide-triphenylphosphonium and a senolytic drug. *Cancer science*, 113(4), 1321–1337. <https://doi.org/10.1111/cas.15290>
110. Ramesh, P., Di Franco, S., Atencia Taboada, L., Zhang, L., Nicotra, A., Stassi, G., & Medema, J. P. (2022). BCL-XL inhibition induces an FGFR4-mediated rescue response in colorectal cancer. *Cell Reports*, 38(7), 110374. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110374>
111. Kerkhofs, M., Vervloessem, T., Stopa, K. B., Smith, V. M., Vogler, M., & Bultynck, G. (2020). DLBCL Cells with Acquired Resistance to Venetoclax Are Not Sensitized to BIRD-2 But Can Be Resensitized to Venetoclax through Bcl-XL Inhibition. *Biomolecules*, 10(7), 1081. <https://doi.org/10.3390/biom10071081>
112. Kehr, S., Haydn, T., Bierbrauer, A., Irmer, B., Vogler, M., & Fulda, S. (2020). Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis. *Cancer Letters*, 482, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.041>
113. Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., ... Kirkland, J. L. (2017). New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X_L inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*, 9(3), 955–963. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>
114. Tao, Z.-F., Wang, X., Chen, J., Ingram, J. P., Jin, S., Judge, R. A., ... Souers, A. J. (2021). Structure-Based Design of A-1293102, a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(6), 1011–1016. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00162>
115. Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., ... 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>
116. Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
117. Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology*, 20(5), 521–527. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0092-5>
118. Andrade-Tomaz, M., de Souza, I., Rocha, C. R. R., & Gomes, L. R. (2020). The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Cell Cycle Control and Its Implications in Cancer. *Cells*, 9(9), 2140. <https://doi.org/10.3390/cells9092140>
119. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

120. Zheng, K., He, Z., Kitazato, K., & Wang, Y. (2019). Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. *Theranostics*, 9(1), 104–125. <https://doi.org/10.7150/thno.30308>
121. Yim, W. W.-Y., & Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0141-7>
122. Cong, Y., Dinesh Kumar, N., Mauthe, M., Verlhac, P., & Reggiori, F. (2020). Manipulation of selective macroautophagy by pathogens at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(10), jcs240440. <https://doi.org/10.1242/jcs.240440>
123. Krause, G. J., & Cuervo, A. M. (2021). Assessment of mammalian endosomal microautophagy. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 164, pp. 167–185). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.10.009>
124. DeVorkin, L., Choutka, C., & Gorski, S. M. (2014). The Interplay between Autophagy and Apoptosis. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and Aging* (pp. 369–383). Amsterdam: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405529-2.00024-X>
125. Das, S., Shukla, N., Singh, S. S., Kushwaha, S., & Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis*, 26(9), 512–533. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01687-9>
126. Li, M., Gao, P., & Zhang, J. (2016). Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Potential and Emerging Therapeutic Targets for Cardiac Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 332. <https://doi.org/10.3390/ijms17030332>
127. Su, M., Mei, Y., & Sinha, S. (2013). Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *Journal of Oncology*, 2013, 102735. <https://doi.org/10.1155/2013/102735>
128. Zhao, Y., Zhu, Q., Bu, X., Zhou, Y., Bai, D., Guo, Q., ... Lu, N. (2020). Triggering apoptosis by oroxylin A through caspase-8 activation and p62/SQSTM1 proteolysis. *Redox Biology*, 29, 101392. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101392>
129. Nurse, P., Masui, Y., & Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Nature Medicine*, 4(10), 1103–1106. <https://doi.org/10.1038/2594>
130. Dubrovsky, J. G., & Ivanov, V. B. (2003). Celebrating 50 years of the cell cycle. *Nature*, 426(6968), 759. <https://doi.org/10.1038/426759a>
131. Harper, J. V., & Brooks, G. (2005). The Mammalian Cell Cycle: An Overview. In *Methods in Molecular Biology* (vol. 296., pp. 113–153). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-857-9:113>
132. Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
133. Leal-Esteban, L. C., & Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165715. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165715>
134. Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*, 226(2), 352–364. <https://doi.org/10.1002/path.3022>

135. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
136. Gómez-Conde, E., Ángel Vargas Mejía, M., Alicia Díaz y Orea, M., David Gómez-Cortes, L., & Guerrero-González, T. (2019). The Mitosis of *Entamoeba histolytica* Trophozoites. In *Parasitology and Microbiology Research*. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88734>
137. Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93–115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
138. Ferry, I., Kuzan-Fischer, C. M., Ernoult, E., & Rutka, J. T. (2018). Targeting Cell Cycle Proteins in Brain Cancer. In *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy* (pp. 271–290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00019-X>
139. Chaudhury, I., & Koepp, D. (2016). Recovery from the DNA Replication Checkpoint. *Genes*, 7(11), 94. <https://doi.org/10.3390/genes7110094>
140. Jossen, R., & Bermejo, R. (2013). The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Frontiers in Genetics*, 4, 26. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00026>
141. Barnum, K. J., & O’Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In *Methods in Molecular Biology* (vol. 1170., pp. 29–40). New York, NY: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
142. Mc Gee, M. M. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of Inflammation*, 2015, 146282. <https://doi.org/10.1155/2015/146282>
143. Hayward, D., Alfonso-Pérez, T., & Gruneberg, U. (2019). Orchestration of the spindle assembly checkpoint by CDK1-cyclin B1. *FEBS Letters*, 593(20), 2889–2907. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13591>
144. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(6), 385–392. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>
145. De Souza, R., Costa Ayub, L., & Yip, K. (2018). Mitotic Catastrophe. In J. Radosevich (Ed.), *Apoptosis and Beyond* (First., pp. 475–510). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119432463.ch23>
146. Glücksmann, A., & Spear, F. G. (1939). The Effect of Gamma Radiation on Cells *in Vivo* Part II. *The British Journal of Radiology*, 12(140), 486–498. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-12-140-486>
147. Spear, F. G., & Glücksmann, A. (1941). The Effect of Gamma Radiation on Cells *in Vivo*. (Part III: Spaced Radiation). *The British Journal of Radiology*, 14(158), 65–76. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-14-158-65>
148. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death & Differentiation*, 15(7), 1153–1162. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47>

149. Gray, L. H. (1952). Actions of Radiations on Living Cells, 1946 and After The Second Douglas Lea Memorial Lecture. *The British Journal of Radiology*, 25(293), 235–244. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-25-293-235>
150. Sazonova, E. V., Petrichuk, S. V., Kopeina, G. S., & Zhivotovsky, B. (2021). A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate. *Biology Direct*, 16(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13062-021-00313-7>
151. Nichat, P., Mishra, N., Richa, B., & Kaur, H. (2016). Mitotic Catastrophe – Role in Programming of Cell Death. *International Journal of Oral and Craniofacial Science*, 2(1), 003–005. <https://doi.org/10.17352/2455-4634.000011>
152. Egorshina, A. Yu., Zamaraev, A. V., Kaminskyy, V. O., Radygina, T. V., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2022). Necroptosis as a Novel Facet of Mitotic Catastrophe. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23073733>
153. Nakayama, Y., & Inoue, T. (2016). Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21050663>
154. Salmela, A.-L., & Kallio, M. J. (2013). Mitosis as an anti-cancer drug target. *Chromosoma*, 122(5), 431–449. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0419-8>
155. Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., & Earnshaw, W. C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrm3474>
156. Serrano-del Valle, A., Reina-Ortiz, C., Benedi, A., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2021). Future prospects for mitosis-targeted antitumor therapies. *Biochemical Pharmacology*, 190, 114655. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114655>
157. Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*, 14(2), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.002>
158. Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science*, 122(15), 2579–2585. <https://doi.org/10.1242/jcs.039719>
159. Lens, S. M. A., & Medema, R. H. (2019). Cytokinesis defects and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 32–45. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0084-6>
160. Demirci, D., Dayanc, B., Mazi, F. A., & Senturk, S. (2021). The Jekyll and Hyde of Cellular Senescence in Cancer. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells10020208>
161. Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
162. Ghosh-Choudhary, S. K., Liu, J., & Finkel, T. (2021). The role of mitochondria in cellular senescence. *The FASEB Journal*, 35(12), e21991. <https://doi.org/10.1096/fj.202101462R>
163. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

164. Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
165. Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 485. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
166. Martini, H., & Passos, J. F. (2022). Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *The FEBS Journal*, 290(5), 1186–1202. <https://doi.org/10.1111/febs.16361>
167. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
168. Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
169. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nature Protocols*, 4(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
170. Yuan, L., Alexander, P. B., & Wang, X.-F. (2020). Cellular senescence: from anti-cancer weapon to anti-aging target. *Science China Life Sciences*, 63(3), 332–342. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1629-6>
171. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
172. Herranz, N., & Gil, J. (2016). Mitochondria and senescence: new actors for an old play. *The EMBO Journal*, 35(7), 701–702. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694025>
173. Gallage, S., & Gil, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Meets Senescence. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.005>
174. Robbins, P. D., Jurk, D., Khosla, S., Kirkland, J. L., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., ... Niedernhofer, L. J. (2021). Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61(1), 779–803. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-050120-105018>
175. Kang, C. (2019). Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Molecules and Cells*, 42(12), 821–827. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0298>
176. Van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E., & Joubert, A. M. (2015). Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(6), 1101–1112. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2903-8>
177. Marzo, I., & Naval, J. (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*, 86(6), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.010>

178. Paier, C. R. K., Maranhão, S. S., Carneiro, T. R., Lima, L. M., Rocha, D. D., da Silva Santos, R., ... Pessoa, C. (2018). Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. *Clinics*, 73(suppl 1), e813s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e813s>
179. Manchado, E., Guillaumot, M., & Malumbres, M. (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death and Differentiation*, 19(3), 369–377. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.197>
180. Penna, L. S., Henriques, J. A. P., & Bonatto, D. (2017). Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.007>
181. Olziersky, A.-M., & Labidi-Galy, S. I. (2017). Clinical Development of Anti-mitotic Drugs in Cancer. In *Cell Division Machinery and Disease* (vol. 1002., pp. 125–152). Cham: Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57127-0_6
182. Rowinsky, E. K., & Donehower, R. C. (1991). The clinical pharmacology and use of antimicrotubule agents in cancer chemotherapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 52(1), 35–84. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90086-2](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90086-2)
183. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., & Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), 890–903. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.02.011>
184. Henriques, A. C., Ribeiro, D., Pedrosa, J., Sarmiento, B., Silva, P. M. A., & Bousbaa, H. (2019). Mitosis inhibitors in anticancer therapy: When blocking the exit becomes a solution. *Cancer Letters*, 440–441, 64–81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.005>
185. Tischer, J., & Gergely, F. (2019). Anti-mitotic therapies in cancer. *Journal of Cell Biology*, 218(1), 10–11. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808077>
186. Ahmed, A., Shamsi, A., Mohammad, T., Hasan, G. M., Islam, A., & Hassan, Md. I. (2021). Aurora B kinase: a potential drug target for cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(8), 2187–2198. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03669-5>
187. D’Assoro, A. B., Haddad, T., & Galanis, E. (2016). Aurora-A Kinase as a Promising Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 5, 295. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00295>
188. Pradhan, T., Gupta, O., Singh, G., & Monga, V. (2021). Aurora kinase inhibitors as potential anticancer agents: Recent advances. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221, 113495. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113495>
189. Gavrilidis, P., Giakoustidis, A., & Giakoustidis, D. (2015). Aurora Kinases and Potential Medical Applications of Aurora Kinase Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(10), 742–751. <https://doi.org/10.14740/jocmr2295w>
190. Kitzen, J. J. E. M., de Jonge, M. J. A., & Verweij, J. (2010). Aurora kinase inhibitors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 73(2), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.03.009>
191. Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P. N., & Rogister, B. (2018). The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Division*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>

192. Yan, M., Wang, C., He, B., Yang, M., Tong, M., Long, Z., ... Liu, Q. (2016). Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Medicinal Research Reviews*, 36(6), 1036–1079. <https://doi.org/10.1002/med.21399>
193. Varshney, N., Rani, A., Kashyap, D., Tiwari, D., & Jha, H. C. (2022). Aurora kinase: An emerging potential target in therapeutics. In *Protein Kinase Inhibitors* (pp. 261–322). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91287-7.00028-4>
194. Bertolin, G., Bulteau, A.-L., Alves-Guerra, M.-C., Burel, A., Lavault, M.-T., Gavard, O., ... Tramier, M. (2018). Aurora kinase A localises to mitochondria to control organelle dynamics and energy production. *eLife*, 7, e38111. <https://doi.org/10.7554/eLife.38111>
195. Cicenas, J. (2016). The Aurora kinase inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(9), 1995–2012. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2136-1>
196. Borah, N. A., & Reddy, M. M. (2021). Aurora Kinase B Inhibition: A Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Molecules*, 26(7), 1981. <https://doi.org/10.3390/molecules26071981>
197. Bavetsias, V., & Linardopoulos, S. (2015). Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology*, 5, 278. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00278>
198. Chieffi, P. (2018). Aurora B: A new promising therapeutic target in cancer. *Intractable & Rare Diseases Research*, 7(2), 141–144. <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01018>
199. Liu, Z., Wang, F., Zhou, Z.-W., Xia, H.-C., Wang, X.-Y., Yang, Y.-X., ... Zhou, S.-F. (2017). Alisertib induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR- and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells. *American Journal of Translational Research*, 9(3), 845–873. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386317>
200. Melichar, B., Adenis, A., Lockhart, A. C., Bennouna, J., Dees, E. C., Kayaleh, O., ... Schusterbauer, C. (2015). Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm ph. *The Lancet Oncology*, 16(4), 395–405. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70051-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70051-3)
201. Du, R., Huang, C., Liu, K., Li, X., & Dong, Z. (2021). Targeting AURKA in Cancer: molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy. *Molecular Cancer*, 20(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01305-3>
202. Liewer, S., & Huddleston, A. (2018). Alisertib: a review of pharmacokinetics, efficacy and toxicity in patients with hematologic malignancies and solid tumors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(1), 105–112. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1417382>
203. Sessa, F., & Villa, F. (2014). Structure of Aurora B-INCENP in complex with barasertib reveals a potential transinhibitory mechanism. *Acta Crystallographica Section F*, 70(Pt 3), 294–298. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14002118>
204. Schwartz, G. K., Carvajal, R. D., Midgley, R., Rodig, S. J., Stockman, P. K., Ataman, O., ... Shapiro, G. I. (2013). Phase I study of barasertib (AZD1152), a selective inhibitor of

- Aurora B kinase, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 31(2), 370–380. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9825-7>
205. Yamauchi, T., Uzui, K., Shigemi, H., Negoro, E., Yoshida, A., & Ueda, T. (2013). Aurora B inhibitor barasertib and cytarabine exert a greater-than-additive cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Science*, 104(7), 926–933. <https://doi.org/10.1111/cas.12164>
206. Wilkinson, R. W., Odedra, R., Heaton, S. P., Wedge, S. R., Keen, N. J., Crafter, C., ... Green, S. (2007). AZD1152, a Selective Inhibitor of Aurora B Kinase, Inhibits Human Tumor Xenograft Growth by Inducing Apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 13(12), 3682–3688. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2979>
207. Floc'h, N., Ashton, S., Taylor, P., Trueman, D., Harris, E., Odedra, R., ... Barry, S. T. (2017). Optimizing Therapeutic Effect of Aurora B Inhibition in Acute Myeloid Leukemia with AZD2811 Nanoparticles. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(6), 1031–1040. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0580>
208. Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., ... Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
209. Ríos-Tamayo, R., Rodríguez, D. S., Chang-Chan, Y., & Pérez, M. S. (2018). Epidemiology of Multiple Myeloma. In *Update on Multiple Myeloma*. London, United Kingdom: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75396>
210. Al-Farsi, K. (2013). Multiple Myeloma: An Update. *Oman Medical Journal*, 28(1), 3–11. <https://doi.org/10.5001/omj.2013.02>
211. 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), 407. <https://doi.org/10.3390/cancers12020407>
212. Kyle, R. A., & Steensma, D. P. (2011). History of Multiple Myeloma. In *Multiple myeloma* (vol. 183., pp. 3–23). Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85772-3_1
213. Capasso, L. L. (2005). Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer*, 113(1), 2–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.20610>
214. Solly, S. (1844). Remarks on the Pathology of Mollities Ossium; With Cases. *Medico-chirurgical Transactions*, 27(1), 435–461. <https://doi.org/10.1177/095952874402700129>
215. Macintyre, W. (1850). Case of Mollities and Fragilitas Ossium, Accompanied with Urine Strongly Charged with Animal Matter. *Medico-chirurgical transactions*, 33(1), 211–232. <https://doi.org/10.1177/095952875003300113>
216. Steensma, D. P., & Kyle, R. A. (2018). History of Multiple Myeloma. In *Neoplastic Diseases of the Blood* (pp. 511–524). Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64263-5_24
217. Jones, H. B. (1848). III. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 138, 55–62. <https://doi.org/10.1098/rstl.1848.0003>

218. Abadie, J. M. (2009). Henry Bence Jones: The Father of Clinical Chemistry? *Laboratory Medicine*, 40(3), 181–182. <https://doi.org/10.1309/LMA7XI9FGWDJZ4OY>
219. Kyle, R. A. (2000). Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *British Journal of Haematology*, 111(4), 1035–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2000.02318.x>
220. Martínez, A., Marín, V. G., Junquera, S. R. y C., Martínez-Murillo, R., & Freire, M. (2005). The contributions of Santiago Ramón y Cajal to cancer research — 100 years on. *Nature Reviews Cancer*, 5(11), 904–909. <https://doi.org/10.1038/nrc1741>
221. Lautzenhiser, S. J., Walker, M. C., & Goring, R. L. (2003). Unusual IgM-secreting multiple myeloma in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(5), 645–648. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.645>
222. de Abreu, C. B., Nogueira, R. B., de Oliveira, L. E. D., Paiva, F. D., Junior, A. C. C. L., & Seixas, J. N. (2016). Multiple Myeloma in a Dog. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 5. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.84398>
223. Martinsson, K., Jönsson, L., & Johansson, H.-E. (1973). Multiple Myeloma of IgA Type in a Dog. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 20(10), 826–835. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1973.tb01060.x>
224. Yamada, O., Tamura, K., Yagihara, H., Isotani, M., Azakami, M., Sawada, S., ... Bonkobara, M. (2007). Light-Chain Multiple Myeloma in a Cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(4), 443–447. <https://doi.org/10.1177/104063870701900421>
225. Sheafor, S. E., Gamblin, R. M., & Couto, C. G. (1996). Hypercalcemia in two cats with multiple myeloma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 32(6), 503–508. <https://doi.org/10.5326/15473317-32-6-503>
226. Cornelius, C., Goodbary, R., & Kennedy, P. (1959). Plasma Cell Myelomatosis in a Horse. *Cornell Vet*, 49, 478–493.
227. Puisterla, N., Magdesian, K. G., Stacy, B. A., Vernau, W., & De Cock, H. E. V. (2004). Immunoglobulin A monoclonal gammopathy in two horses with multiple myeloma. *Veterinary Record*, 155(1), 19–23. <https://doi.org/10.1136/vr.155.1.19>
228. Edwards, D. F., Parker, J. W., Wilkinson, J. E., & Helman, R. G. (1993). Plasma Cell Myeloma in the Horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(3), 169–176. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1993.tb03182.x>
229. Pascal, R. (1961). Plasma cell myeloma in the brain of a rabbit. *Cornell Vet*, 51, 528.
230. Rintisch, U., Münzer, B., Klopffleisch, R., & Lahrmann, K.-H. (2010). Multiple myeloma in a Yucatan Pig. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123(1–2), 70–73. Retrieved from <https://eurekamag.com/research/035/351/035351601.php>
231. Watanabe, Y., Kohnosu, Y., Sekine, T., Hachisu, K., & Al, E. (1995). A case of multiple myeloma with metastases to visceral organs in a miniature pig. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 48(11), 852–855.
232. Methiyapun, S., Myers, R. K., & Pohlenz, J. F. L. (1985). Spontaneous Plasma Cell Myeloma in a Ferret (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Pathology*, 22(5), 517–519. <https://doi.org/10.1177/030098588502200516>

233. Kameyama, M., Ishikawa, Y., Shibahara, T., & Kadota, K. (2003). Plasma Cell Myeloma Producing IgG, IgM, and IgA Immunoglobulins in a Cow. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(2), 166–169. <https://doi.org/10.1177/104063870301500212>
234. Port, C. D., Maschgan, E. R., Pond, J., & Scarpelli, D. G. (1981). Multiple neoplasia in a jaguar (*Panthera onca*). *Journal of Comparative Pathology*, 91(1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(81\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0021-9975(81)90051-7)
235. Käppeli, U., Eulenberger, U., Nitzl, D., Bley, C. R., Steffen, F., Sydler, T., ... Steinmetz, H. W. (2009). Clinical Challenge. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(2), 398–401. <https://doi.org/10.1638/2008-0120.1>
236. Lee, A. M., Guppy, N., Bainbridge, J., & Jahns, H. (2017). Multiple myeloma in an Amur tiger (*Panthera tigris altaica*). *Open Veterinary Journal*, 7(4), 300–305. <https://doi.org/10.4314/ovj.v7i4.2>
237. Tordiffe, A. S. W., Cassel, N., Lane, E. P., & Reyers, F. (2013). Multiple myeloma in a captive lion (*Panthera leo*). *Journal of the South African Veterinary Association*, 84(1). <https://doi.org/10.4102/jsava.v84i1.949>
238. Mauel, S., Fritsch, G., Ochs, A., Koch, M., Kershaw, O., & Gruber, A. D. (2009). Paraplegia in a Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) due to multiple myeloma. *Journal of Medical Primatology*, 38(5), 335–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2009.00360.x>
239. van de Donk, N. W. C. J., Pawlyn, C., & Yong, K. L. (2021). Multiple myeloma. *The Lancet*, 397(10272), 410–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
240. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., ... Bray, F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Retrieved October 28, 2021, from <https://gco.iarc.fr/today>
241. Cancer Stat Facts. (2021). National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results Program [Internet]. Retrieved October 28, 2021, from <https://seer.cancer.gov/statfacts>
242. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
243. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). (2023). Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2023. Retrieved September 10, 2023, from <https://redecan.org/es>
244. Cowan, A. J., Allen, C., Barac, A., Basaleem, H., Bensenor, I., Curado, M. P., ... Fitzmaurice, C. (2018). Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncology*, 4(9), 1221–1227. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2128>
245. Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., ... San Miguel, J. F. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
246. Minnie, S. A., & Hill, G. R. (2020). Immunotherapy of multiple myeloma. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1565–1575. <https://doi.org/10.1172/JCI129205>

247. Padala, S. A., Barsouk, A., Barsouk, A., Rawla, P., Vakiti, A., Kolhe, R., ... Ajebo, G. H. (2021). Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma. *Medical Sciences*. <https://doi.org/10.3390/medsci9010003>
248. Rajkumar, S. V. (2020). Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 95(5), 548–567. <https://doi.org/10.1002/ajh.25791>
249. Hameed, A., Brady, J. J., Dowling, P., Clynes, M., & O’Gorman, P. (2014). Bone Disease in Multiple Myeloma: Pathophysiology and Management. *Cancer Growth and Metastasis*, 7, 33–42. <https://doi.org/10.4137/CGM.S16817>
250. Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., & Dimopoulos, M. A. (2018). Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41408-017-0037-4>
251. Bao, L., Wang, Y., Lu, M., Chu, B., Shi, L., Gao, S., ... Xiang, Q. (2020). Hypercalcemia caused by humoral effects and bone damage indicate poor outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Cancer Medicine*, 9(23), 8962–8969. <https://doi.org/10.1002/cam4.3594>
252. Oyajobi, B. O. (2007). Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Research & Therapy*, 9(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/ar2168>
253. Dimopoulos, M. A., Kastiris, E., Rosinol, L., Bladé, J., & Ludwig, H. (2008). Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22(8), 1485–1493. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.131>
254. Park, S., Han, B., Kim, K., Kim, S. J., Jang, J. H., Kim, W. S., & Jung, C. W. (2014). Renal Insufficiency in Newly-diagnosed Multiple Myeloma: Analysis According to International Myeloma Working Group Consensus Statement. *Anticancer Research*, 34(8), 4299–4306. Retrieved from <http://ar.iiarjournals.org/content/34/8/4299.abstract>
255. Bouchnita, A., Eymard, N., Moyo, T. K., Koury, M. J., & Volpert, V. (2016). Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis. *American Journal of Hematology*, 91(4), 371–378. <https://doi.org/10.1002/ajh.24291>
256. Liu, L., Yu, Z., Cheng, H., Mao, X., Sui, W., Deng, S., ... Hao, M. (2020). Multiple myeloma hinders erythropoiesis and causes anaemia owing to high levels of CCL3 in the bone marrow microenvironment. *Scientific Reports*, 10(1), 20508. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77450-y>
257. Nair, B., Waheed, S., Szymonifka, J., Shaughnessy Jr, J. D., Crowley, J., & Barlogie, B. (2009). Immunoglobulin isotypes in multiple myeloma: laboratory correlates and prognostic implications in total therapy protocols. *British Journal of Haematology*, 145(1), 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07547.x>
258. Jákó, J. M., Gesztes, T., & Kaszás, I. (1997). IgE Lambda Monoclonal Gammopathy and Amyloidosis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 112(4), 415–421. <https://doi.org/10.1159/000237490>
259. Roy, S., Khaddar, S., Agrawal, A., Rathnakumar, G., Nayak, L., & Kapoor, A. (2021). Biclinal Multiple Myeloma- A Case Series. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-739216/v1>

260. Marinac, C. R., Ghobrial, I. M., Birmann, B. M., Soiffer, J., & Rebbeck, T. R. (2020). Dissecting racial disparities in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 10(2), 19. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-0284-7>
261. Mateos, M.-V., Ludwig, H., Bazarbachi, A., Beksac, M., Bladé, J., Boccadoro, M., ... Sonneveld, P. (2019). Insights on Multiple Myeloma Treatment Strategies. *HemaSphere*, 3(1), e163. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000163>
262. Hultcrantz, M., Yellapantula, V., & Rustad, E. H. (2020). Genomic profiling of multiple myeloma: New insights and modern technologies. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 33(1), 101153. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2020.101153>
263. Cardona-Benavides, I. J., de Ramón, C., & Gutiérrez, N. C. (2021). Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells*, 10(2), 336. <https://doi.org/10.3390/cells10020336>
264. Neuse, C. J., Lomas, O. C., Schliemann, C., Shen, Y. J., Manier, S., Bustoros, M., & Ghobrial, I. M. (2020). Genome instability in multiple myeloma. *Leukemia*, 34(11), 2887–2897. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0921-y>
265. 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>
266. Pratt, G. (2002). Molecular aspects of multiple myeloma. *Molecular Pathology*, 55(5), 273–283. <https://doi.org/10.1136/mp.55.5.273>
267. Bergsagel, P. L., & Kuehl, W. M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 20(40), 5611–5622. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204641>
268. Lombardi, L., Poretti, G., Mattioli, M., Fabris, S., Agnelli, L., Biciato, S., ... Neri, A. (2007). Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: Insights into the biology of the disease. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(3), 226–238. <https://doi.org/10.1002/gcc.20404>
269. Vikova, V., Jourdan, M., Robert, N., Requirand, G., Boireau, S., Bruyer, A., ... Moreaux, J. (2019). Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance. *Theranostics*, 9(2), 540–553. <https://doi.org/10.7150/thno.28374>
270. Walker, B. A., Boyle, E. M., Wardell, C. P., Murison, A., Begum, D. B., Dahir, N. M., ... Morgan, G. J. (2015). Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(33), 3911–3920. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1503>
271. Da Silva-De Abreu, A., Menoni-Blanco, B., & Cueva-Nieves, D. (2010). Mieloma Múltiple: Alteraciones génicas y cromosómicas no translocacionales y sus implicaciones pronósticas. *Acta Científica Estudiantil*, 8(1), 9–14.
272. Hassan, H., & Szalat, R. (2021). Genetic Predictors of Mortality in Patients with Multiple Myeloma. *The Application of Clinical Genetics*, 14, 241–254. <https://doi.org/10.2147/TACG.S262866>

273. Smith, D., & Yong, K. (2016). Advances in understanding prognosis in myeloma. *British Journal of Haematology*, 175(3), 367–380. <https://doi.org/10.1111/bjh.14304>
274. Mikulasova, A., Ashby, C., Tytarenko, R. G., Qu, P., Rosenthal, A., Dent, J. A., ... Walker, B. A. (2020). Microhomology-mediated end joining drives complex rearrangements and overexpression of MYC and PVT1 in multiple myeloma. *Haematologica*, 105(4), 1055–1066. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.217927>
275. Hatzivassiliou, G., Miller, I., Takizawa, J., Palanisamy, N., Rao, P. H., Iida, S., ... Dalla-Favera, R. (2001). IRTA1 and IRTA2, Novel Immunoglobulin Superfamily Receptors Expressed in B Cells and Involved in Chromosome 1q21 Abnormalities in B Cell Malignancy. *Immunity*, 14(3), 277–289. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00109-1)
276. Iida, S., Rao, P. H., Butler, M., Corradini, P., Boccadoro, M., Klein, B., ... Dalla-Favera, R. (1997). Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nature Genetics*, 17(2), 226–230. <https://doi.org/10.1038/ng1097-226>
277. Kumar, S. K., & Rajkumar, S. V. (2018). The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7), 409–421. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0018-y>
278. Hoang, P. H., Dobbins, S. E., Cornish, A. J., Chubb, D., Law, P. J., Kaiser, M., & Houlston, R. S. (2018). Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms. *Leukemia*, 32(11), 2459–2470. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0103-3>
279. Alzrigat, M., Párraga, A. A., & Jernberg-Wiklund, H. (2018). Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 51, 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.09.007>
280. Burroughs García, J., Eufemiese, R. A., Storti, P., Sammarelli, G., Craviotto, L., Todaro, G., ... Giuliani, N. (2021). Role of 1q21 in Multiple Myeloma: From Pathogenesis to Possible Therapeutic Targets. *Cells*, 10(6), 1360. <https://doi.org/10.3390/cells10061360>
281. Jurczynszyn, A., & Suska, A. (2020). Multiple Myeloma. In *Encyclopedia of Biomedical Gerontology* (pp. 461–478). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11412-6>
282. Maura, F., Bolli, N., Angelopoulos, N., Dawson, K. J., Leongamornlert, D., Martincorena, I., ... Campbell, P. J. (2019). Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nature Communications*, 10(1), 3835. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11680-1>
283. Walker, B. A., Mavrommatis, K., Wardell, C. P., Ashby, T. C., Bauer, M., Davies, F. E., ... Morgan, G. J. (2018). Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*, 132(6), 587–597. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-840132>
284. Landgren, O., & Waxman, A. J. (2010). Multiple Myeloma Precursor Disease. *JAMA*, 304(21), 2397–2404. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1713>
285. Goel, U., Usmani, S., & Kumar, S. (2022). Current approaches to management of newly diagnosed multiple myeloma. *American Journal of Hematology*, 97(S1), S3–S25. <https://doi.org/10.1002/ajh.26512>

286. Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23(1), 3–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>
287. Cheng, Q., Cai, L., Zhang, Y., Chen, L., Hu, Y., & Sun, C. (2021). Circulating Plasma Cells as a Biomarker to Predict Newly Diagnosed Multiple Myeloma Prognosis: Developing Nomogram Prognostic Models. *Frontiers in Oncology*, 11, 639528. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.639528>
288. Hanbali, A., Hassanein, M., Rasheed, W., Aljurf, M., & Alsharif, F. (2017). The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. *Advances in Hematology*, 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/4812637>
289. Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K. C., ... Orłowski, R. (2016). Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*, 127(24), 2955–2962. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-631200>
290. mSMART 3.0: Classification of Active MM. (2022). *Mayo Clinic*. Retrieved June 27, 2022, from <https://www.msmart.org/mm-treatment-guidelines>
291. Vande Broek, I., Vanderkerken, K., Van Camp, B., & Van Riet, I. (2008). Extravasation and homing mechanisms in multiple myeloma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(4), 325–334. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9108-4>
292. Bianchi, G., & Anderson, K. C. (2014). Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(6), 422–444. <https://doi.org/10.3322/caac.21252>
293. García-Ortiz, A., Rodríguez-García, Y., Encinas, J., Maroto-Martín, E., Castellano, E., Teixidó, J., & Martínez-López, J. (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers13020217>
294. Bianchi, G., & Munshi, N. C. (2015). Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*, 125(20), 3049–3058. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-568881>
295. Allegra, A., Innao, V., Gerace, D., Allegra, A. G., Vaddinelli, D., Bianco, O., & Musolino, C. (2018). The adipose organ and multiple myeloma: Impact of adipokines on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *European Journal of Internal Medicine*, 53, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.05.033>
296. Lungu, O., Toscani, D., Burroughs-Garcia, J., & Giuliani, N. (2023). The Metabolic Features of Osteoblasts: Implications for Multiple Myeloma (MM) Bone Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4893. <https://doi.org/10.3390/ijms24054893>
297. Raffaghello, L., Vacca, A., Pistoia, V., & Ribatti, D. (2015). Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. *Oncotarget*, 6(5), 2589–2603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2661>
298. Slany, A., Haudek-Prinz, V., Meshcheryakova, A., Bileck, A., Lamm, W., Zielinski, C., ... Drach, J. (2014). Extracellular Matrix Remodeling by Bone Marrow Fibroblast-like Cells Correlates with Disease Progression in Multiple Myeloma. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 844–854. <https://doi.org/10.1021/pr400881p>

299. Díaz-Tejedor, A., Lorenzo-Mohamed, M., Puig, N., García-Sanz, R., Mateos, M.-V., Garayoa, M., & Paíno, T. (2021). Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression. *Cancers*, 13(6), 1353. <https://doi.org/10.3390/cancers13061353>
300. Wang, J., De Veirman, K., Faict, S., Frassanito, M. A., Ribatti, D., Vacca, A., & Menu, E. (2016). Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *The Journal of Pathology*, 239(2), 162–173. <https://doi.org/10.1002/path.4712>
301. Wang, J., De Veirman, K., De Beule, N., Maes, K., De Bruyne, E., Van Valckenborgh, E., ... Menu, E. (2015). The bone marrow microenvironment enhances multiple myeloma progression by exosome-mediated activation of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 6(41), 43992–44004. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6083>
302. Harding, T., Baughn, L., Kumar, S., & Van Ness, B. (2019). The future of myeloma precision medicine: integrating the compendium of known drug resistance mechanisms with emerging tumor profiling technologies. *Leukemia*, 33(4), 863–883. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0362-z>
303. Poczta, A., Rogalska, A., & Marczak, A. (2021). Treatment of Multiple Myeloma and the Role of Melphalan in the Era of Modern Therapies—Current Research and Clinical Approaches. *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm10091841>
304. Schjesvold, F., & Oriol, A. (2021). Current and Novel Alkylators in Multiple Myeloma. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers13102465>
305. ClinicalTrials.gov. (2022). *U.S. National Library of Medicine*. Retrieved January 2, 2022, from <https://clinicaltrials.gov/>
306. Levact. (2022). *European Medicines Agency*. Retrieved January 2, 2022, from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/levact>
307. ClinicalTrials.gov. (2022). *U.S. National Library of Medicine*. Retrieved January 3, 2022, from <https://clinicaltrials.gov/>
308. Bobin, A., Gruchet, C., Guidez, S., Gardeney, H., Nsiala Makunza, L., Vonfeld, M., ... Leleu, X. (2021). Novel Non-Immunologic Agents for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A Review Article. *Cancers*, 13(20), 5210. <https://doi.org/10.3390/cancers13205210>
309. Yasir, M., Goyal, A., Bansal, P., & Sonthalia, S. (2021). Corticosteroid Adverse Effects. In *StatPearls*. Allama Iqbal Medical College/JHL, Lahore: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/30285357>
310. Faiman, B., Bilotti, E., Mangan, P. A., Rogers, K., & Board, I. N. L. (2008). Steroid-associated side effects in patients with multiple myeloma: consensus statement of the IMF Nurse Leadership Board. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 12(3 Suppl), 53–63. <https://doi.org/10.1188/08.CJON.S1.53-62>
311. Papich, M. G. (2021). Prednisolone, Prednisolone Acetate. In *Papich Handbook of Veterinary Drugs* (5th ed., pp. 767–769). St. Louis (MO): W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-70957-6.00446-5>

312. Schijvens, A. M., ter Heine, R., de Wildt, S. N., & Schreuder, M. F. (2019). Pharmacology and pharmacogenetics of prednisone and prednisolone in patients with nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*, 34(3), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3929-z>
313. Burwick, N., & Sharma, S. (2019). Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. *Annals of Hematology*, 98(1), 19–28. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3465-8>
314. Arcamone, F., Animati, F., Capranico, G., Lombardi, P., Pratesi, G., Manzini, S., ... Zunino, F. (1997). New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacology & Therapeutics*, 76(1–3), 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00096-X)
315. Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
316. Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
317. Carvalho, C., Santos, X. R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, J. P., Santos, S. M., & Moreira, I. P. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>
318. Sanchez, E., Li, M., Wang, C., Nichols, C. M., Li, J., Chen, H., & Berenson, J. R. (2012). Anti-Myeloma Effects of the Novel Anthracycline Derivative INNO-206. *Clinical Cancer Research*, 18(14), 3856–3867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3130>
319. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
320. Bladé, J., Sonneveld, P., Miguel, J. F. S., Sutherland, H. J., Hajek, R., Nagler, A., ... Orłowski, R. Z. (2011). Efficacy and Safety of Pegylated Liposomal Doxorubicin in Combination With Bortezomib for Multiple Myeloma: Effects of Adverse Prognostic Factors on Outcome. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 11(1), 44–49. <https://doi.org/10.3816/CLML.2011.n.005>
321. Ning, Y.-M., He, K., Dagher, R., Sridhara, R., Farrel, A. T., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). Liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for relapsed or refractory multiple myeloma. *Oncology*, 21(12), 1503–1508.
322. Abe, Y., & Ishida, T. (2019). Immunomodulatory drugs in the treatment of multiple myeloma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 49(8), 695–702. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz083>
323. Sedlarikova, L., Kubiczekova, L., Sevcikova, S., & Hajek, R. (2012). Mechanism of immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Leukemia Research*, 36(10), 1218–1224. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.05.010>

324. DERUDAS, D., CAPRARO, F., MARTINELLI, G., & CERCHIONE, C. (2021). Old and new generation immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Panminerva Medica*, 62(4), 207–219. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.20.04125-7>
325. Holstein, S. A., & McCarthy, P. L. (2017). Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience. *Drugs*, 77(5), 505–520. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0689-1>
326. Naymagon, L., & Abdul-Hay, M. (2016). Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0282-1>
327. Raedler, L. A. (2016). Pomalyst (Pomalidomide) Received a New Indication for Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *American Health & Drug Benefits*, 9(Spec Feature), 111–114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27668057>
328. Nass, J., & Efferth, T. (2018). Drug targets and resistance mechanisms in multiple myeloma. *Cancer Drug Resistance*, 1(2), 87–117. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.04>
329. Shirley, M. (2016). Ixazomib: First Global Approval. *Drugs*, 76(3), 405–411. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0548-5>
330. Robak, P., & Robak, T. (2019). Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later. *Drugs in R&D*, 19(2), 73–92. <https://doi.org/10.1007/s40268-019-0269-9>
331. Okazuka, K., & Ishida, T. (2018). Proteasome inhibitors for multiple myeloma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 48(9), 785–793. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy108>
332. Serrano-Del Valle, A., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2019). Immunogenic Cell Death and Immunotherapy of Multiple Myeloma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 50. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00050>
333. Hassell, K. N. (2019). Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Epigenetics. *Diseases*. <https://doi.org/10.3390/diseases7040057>
334. Chen, H. P., Zhao, Y. T., & Zhao, T. C. (2015). Histone Deacetylases and Mechanisms of Regulation of Gene Expression. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 20(1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2015012997>
335. Verza, F. A., Das, U., Fachin, A. L., Dimmock, J. R., & Marins, M. (2020). Roles of Histone Deacetylases and Inhibitors in Anticancer Therapy. *Cancers*, 12(6), 1664. <https://doi.org/10.3390/cancers12061664>
336. Cea, M., Cagnetta, A., Gobbi, M., Patrone, F., Richardson, P. G., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2013). New Insights into the Treatment of Multiple Myeloma with Histone Deacetylase Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 19(4), 734–744. <https://doi.org/10.2174/1381612811306040734>
337. Hull, E. E., Montgomery, M. R., & Leyva, K. J. (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *BioMed Research International*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/8797206>

338. Farydak. (2022). *European Medicines Agency*. Retrieved June 25, 2022, from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/farydak>
339. Pan, D., Mouhieddine, T. H., Upadhyay, R., Casasanta, N., Lee, A., Zubizarreta, N., ... Richter, J. (2023). Outcomes with panobinostat in heavily pretreated multiple myeloma patients. *Seminars in Oncology*, 50(1–2), 40–48. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2023.03.006>
340. Harada, T., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2016). Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: from bench to bedside. *International Journal of Hematology*, 104(3), 300–309. <https://doi.org/10.1007/s12185-016-2008-0>
341. Chen, D., Yang, X., Liu, M., Zhang, Z., & Xing, E. (2021). Roles of miRNA dysregulation in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cancer Gene Therapy*, 28(12), 1256–1268. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00291-4>
342. Kumar, S., Mahmood, S. T., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Hayman, S. R., Buadi, F. K., ... Gertz, M. A. (2008). Impact of early relapse after auto-SCT for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 42(6), 413–420. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.180>
343. Bygrave, C., Pawlyn, C., Davies, F., Craig, Z., Cairns, D., Hockaday, A., ... Kaiser, M. (2021). Early relapse after high-dose melphalan autologous stem cell transplant predicts inferior survival and is associated with high disease burden and genetically high-risk disease in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 193(3), 551–555. <https://doi.org/10.1111/bjh.16793>
344. Hoyos, V., & Borrello, I. (2016). The immunotherapy era of myeloma: monoclonal antibodies, vaccines, and adoptive T-cell therapies. *Blood*, 128(13), 1679–1687. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-636357>
345. Sperling, A. S., & Anderson, K. C. (2021). Facts and Hopes in Multiple Myeloma Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 27(16), 4468–4477. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3600>
346. 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>
347. FDA. (2022). *U.S. Food & Drug Administration*. Retrieved March 4, 2022, from <https://www.fda.gov/>
348. Malaer, J. D., & Mathew, P. A. (2017). CS1 (SLAMF7, CD319) is an effective immunotherapeutic target for multiple myeloma. *American Journal of Cancer Research*, 7(8), 1637–1641. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861320>
349. Verkleij, C. P. M., Bruins, W. S. C., Zweegman, S., & van de Donk, N. W. C. J. (2021). Immunotherapy with Antibodies in Multiple Myeloma: Monoclonals, Bispecifics, and Immunoconjugates. *Hemato*. <https://doi.org/10.3390/hemato2010007>
350. Moreno, L., Perez, C., Zabaleta, A., Manrique, I., Alignani, D., Ajona, D., ... Paiva, B. (2019). The Mechanism of Action of the Anti-CD38 Monoclonal Antibody Isatuximab in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 25(10), 3176–3187. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1597>

351. Rasche, L., Wäsch, R., Munder, M., Goldschmidt, H., & Raab, M. S. (2021). Novel immunotherapies in multiple myeloma – chances and challenges. *Haematologica*, 106(10), 2555–2565. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.266858>
352. Vallet, S., Pecherstorfer, M., & Podar, K. (2017). Adoptive cell therapy in multiple Myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(12), 1511–1522. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1375095>
353. Davis, J., McGann, M., Shockley, A., & Hashmi, H. (2022). Idecabtagene vicleucel versus ciltacabtagene autoleucel: a Sophie's choice for patients with relapsed refractory multiple myeloma. *Expert Review of Hematology*, 15(6), 473–475. <https://doi.org/10.1080/17474086.2022.2081147>
354. Teoh, P. J., & Chng, W. J. (2021). CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 84. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00469-5>
355. Caserta, S., Innao, V., Musolino, C., & Allegra, A. (2020). Immune checkpoint inhibitors in multiple myeloma: A review of the literature. *Pathology - Research and Practice*, 216(10), 153114. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153114>
356. Stewart, G., Chantry, A., & Lawson, M. (2021). The Use of Oncolytic Viruses in the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers13225687>
357. Garfall, A. L., & Stadtmauer, E. A. (2016). Cellular and vaccine immunotherapy for multiple myeloma. *Hematology*, 2016(1), 521–527. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.521>
358. Podar, K., Shah, J., Chari, A., Richardson, P. G., & Jagannath, S. (2020). Selinexor for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(4), 399–408. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1707184>
359. Nexpovio. (2022). *European Medicines Agency*. Retrieved January 10, 2022, from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/nexpovio>
360. Sellin, M., Berg, S., Hagen, P., & Zhang, J. (2022). The molecular mechanism and challenge of targeting XPO1 in treatment of relapsed and refractory myeloma. *Translational Oncology*, 22, 101448. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101448>
361. Maes, A., Menu, E., De Veirman, K., Maes, K., Vanderkerken, K., & De Bruyne, E. (2017). The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. *Oncotarget*, 8(52), 90501–90520. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18765>
362. ClinicalTrials.gov. (2022). *U.S. National Library of Medicine*. Retrieved June 29, 2022, from <https://clinicaltrials.gov>
363. Hay, A. E., Murugesan, A., DiPasquale, A. M., Kouroukis, T., Sandhu, I., Kukreti, V., ... Reiman, T. (2016). A phase II study of AT9283, an aurora kinase inhibitor, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: NCIC clinical trials group IND.191. *Leukemia & Lymphoma*, 57(6), 1463–1466. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1091927>
364. Kelly, K. R., Shea, T. C., Goy, A., Berdeja, J. G., Reeder, C. B., McDonagh, K. T., ... Iyer, S. P. (2014). Phase I study of MLN8237—investigational Aurora A kinase inhibitor—in relapsed/refractory multiple myeloma, Non-Hodgkin lymphoma and chronic

- lymphocytic leukemia. *Investigational New Drugs*, 32(3), 489–499. <https://doi.org/10.1007/s10637-013-0050-9>
365. Rosenthal, A., Kumar, S., Hofmeister, C., Laubach, J., Vij, R., Dueck, A., ... Stewart, A. K. (2016). A Phase Ib Study of the combination of the Aurora Kinase Inhibitor Alisertib (MLN8237) and Bortezomib in Relapsed Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology*, 174(2), 323–325. <https://doi.org/10.1111/bjh.13765>
 366. Branagan, A., Lei, M., Lou, U., & Raje, N. (2020). Current Treatment Strategies for Multiple Myeloma. *JCO Oncology Practice*, 16(1), 5–14. <https://doi.org/10.1200/JOP.19.00244>
 367. Bringhen, S., Milan, A., Ferri, C., Wäsch, R., Gay, F., Larocca, A., ... Engelhardt, M. (2018). Cardiovascular adverse events in modern myeloma therapy – Incidence and risks. A review from the European Myeloma Network (EMN) and Italian Society of Arterial Hypertension (SIIA). *Haematologica*, 103(9), 1422–1432. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191288>
 368. American Cancer Society. (2023). *Cancer Facts & Figures 2023*. Atlanta.
 369. U. S. National Institutes of Health (National Cancer Institute). (n.d.). SEER Training Modules, Cancer as a disease. Retrieved June 7, 2023, from <https://training.seer.cancer.gov/>
 370. World Health Organization. (2023). Cancer - Overview. Retrieved June 7, 2023, from https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
 371. World Health Organization. (2022). Cancer. Retrieved June 7, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
 372. World Health Organization. (2023). *World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. Geneva.
 373. American Cancer Society. (2022). What is Cancer? Retrieved June 8, 2023, from <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>
 374. SA Health. (2022). Types of cancers. Retrieved June 8, 2023, from <https://www.sahealth.sa.gov.au/wps/wcm/connect/public+content/sa+health+internet/conditions/cancer/types+of+cancers/types+of+cancers#:~:text=Cancer%20can%20be%20described%20as,the%20body%20through%20the%20bloodstream>
 375. Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
 376. Lippi, G., & Mattiuzzi, C. (2020). The global burden of pancreatic cancer. *Archives of Medical Science*, 16(4), 820–824. <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.94845>
 377. Rajkumar, S. V. (2022). Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 97(8), 1086–1107. <https://doi.org/10.1002/ajh.26590>
 378. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., ... Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 20503121211034370. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>

379. Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., ... Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>
380. Chung, C. (2017). Role of Immunotherapy in Targeting the Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma: An Evolving Therapeutic Strategy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 37(1), 129–143. <https://doi.org/10.1002/phar.1871>
381. Dima, D., Jiang, D., Singh, D. J., Hasipek, M., Shah, H. S., Ullah, F., ... Jha, B. K. (2022). Multiple Myeloma Therapy: Emerging Trends and Challenges. *Cancers*, 14(17), 4082. <https://doi.org/10.3390/cancers14174082>
382. Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., & Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
383. Mayekar, M. K., & Bivona, T. G. (2017). Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(5), 757–764. <https://doi.org/10.1002/cpt.810>
384. De Dosso, S., Siebenhüner, A. R., Winder, T., Meisel, A., Fritsch, R., Astaras, C., ... Borner, M. (2021). Treatment landscape of metastatic pancreatic cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 96, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102180>
385. Amanam, I., & Chung, V. (2018). Targeted Therapies for Pancreatic Cancer. *Cancers*, 10(2), 36. <https://doi.org/10.3390/cancers10020036>
386. Chu, Q., Vincent, M., Logan, D., Mackay, J. A., & Evans, W. K. (2005). Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and practice guideline. *Lung Cancer*, 50(3), 355–374. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.06.010>
387. Furuse, K., Kubota, K., Kawahara, M., Ogawara, M., Kinuwaki, E., Motomiya, M., ... Sakuma, A. (1994). A Phase II study of vinorelbine, a new derivative of vinca alkaloid, for previously untreated advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 11(5–6), 385–391. [https://doi.org/10.1016/0169-5002\(94\)92167-9](https://doi.org/10.1016/0169-5002(94)92167-9)
388. Muro, K., Nozawa, H., Nagata, H., Ishimaru, K., Sonoda, H., Emoto, S., ... Ishihara, S. (2020). Efficacy of intraperitoneally administered paclitaxel for colorectal cancer with peritoneal metastases. *International Journal of Colorectal Disease*, 35(10), 1945–1949. <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03649-0>
389. Auyeung, K. K. W., Law, P. C., & Ko, J. K. S. (2014). Combined Therapeutic Effects of Vinblastine and Astragalus Saponins in Human Colon Cancer Cells and Tumor Xenograft via Inhibition of Tumor Growth and Proangiogenic Factors. *Nutrition and Cancer*, 66(4), 662–674. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.894093>
390. Yamada, S., Fujii, T., Yamamoto, T., Takami, H., Yoshioka, I., Yamaki, S., ... Satoi, S. (2020). Phase I/II study of adding intraperitoneal paclitaxel in patients with pancreatic cancer and peritoneal metastasis. *British Journal of Surgery*, 107(13), 1811–1817. <https://doi.org/10.1002/bjs.11792>

391. Gelmon, K. A., Tolcher, A., Diab, A. R., Bally, M. B., Embree, L., Hudon, N., ... Mayer, L. D. (1999). Phase I Study of Liposomal Vincristine. *Journal of Clinical Oncology*, 17(2), 697–705. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.2.697>
392. Kroning, R., & Lichtenstein, A. (1998). Taxol can induce phosphorylation of BCL-2 in multiple myeloma cells and potentiate dexamethasone-induced apoptosis. *Leukemia Research*, 22(3), 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(97\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(97)00170-7)
393. Zervas, K., Dimopoulos, M. A., Hatzicharissi, E., Anagnostopoulos, A., Papaioannou, M., Mitsouli, C., ... Maniatis, A. (2004). Primary treatment of multiple myeloma with thalidomide, vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone(T-VAD doxil): a phase II multicenter study. *Annals of Oncology*, 15(1), 134–138. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh026>
394. Kaul, R., Risinger, A. L., & Mooberry, S. L. (2019). Microtubule-Targeting Drugs: More than Antimitotics. *Journal of Natural Products*, 82(3), 680–685. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00105>
395. Görgün, G., Calabrese, E., Hideshima, T., Ecsedy, J., Perrone, G., Mani, M., ... Anderson, K. C. (2010). A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood*, 115(25), 5202–5213. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259523>
396. Helfrich, B. A., Kim, J., Gao, D., Chan, D. C., Zhang, Z., Tan, A.-C., & Bunn, P. A. J. (2016). Barasertib (AZD1152), a Small Molecule Aurora B Inhibitor, Inhibits the Growth of SCLC Cell Lines *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(10), 2314–2322. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0298>
397. Kelly, K. R., Friedberg, J. W., Park, S. I., McDonagh, K., Hayslip, J., Persky, D., ... Mahadevan, D. (2018). Phase I Study of the Investigational Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib plus Rituximab or Rituximab/Vincristine in Relapsed/Refractory Aggressive B-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 24(24), 6150–6159. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0286>
398. Schwartz, G. K., Carvajal, R. D., Midgley, R., Rodig, S. J., Stockman, P. K., Ataman, O., ... Shapiro, G. I. (2013). Phase I study of barasertib (AZD1152), a selective inhibitor of Aurora B kinase, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 31(2), 370–380. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9825-7>
399. Löwenberg, B., Muus, P., Ossenkoppele, G., Rousselot, P., Cahn, J.-Y., Ifrah, N., ... Kantarjian, H. (2011). Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood*, 118(23), 6030–6036. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-366930>
400. Collins, G. P., Toby, E. A., Hatton, C. S., Radford, J., & Linton, K. M. (2014). A Phase 2 Trial of AZD1152 in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*, 124(21), 4481. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.4481.4481>
401. Kaloni, D., Diepstraten, S. T., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2023). BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis*, 28(1–2), 20–38. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01780-7>
402. Karczmarek-Borowska, B., Filip, A., Wojcierowski, J., Smoleń, A., Korobowicz, E., Korszen-Pilecka, I., & Zdunek, M. (2006). Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene

- expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 51(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.08.010>
403. Shen, Q., Li, J., Mai, J., Zhang, Z., Fisher, A., Wu, X., ... Shen, H. (2018). Sensitizing non-small cell lung cancer to BCL-xL-targeted apoptosis. *Cell Death & Disease*, 9(10), 986. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1040-9>
 404. Scherr, A.-L., Gdynia, G., Salou, M., Radhakrishnan, P., Duglova, K., Heller, A., ... Koehler, B. C. (2016). Bcl-xL is an oncogenic driver in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 7(8), e2342. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.233>
 405. Miyamoto, Y., Hosotani, R., Wada, M., Lee, J.-U., Koshiba, T., Fujimoto, K., ... Imamura, M. (1999). Immunohistochemical Analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 Expression in Pancreatic Cancers. *Oncology*, 56(1), 73–82. <https://doi.org/10.1159/000011933>
 406. 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>
 407. Montero, J., & Haq, R. (2022). Adapted to Survive: Targeting Cancer Cells with BH3 Mimetics. *Cancer Discovery*, 12(5), 1217–1232. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1334>
 408. Li, Z.-N., & Luo, Y. (2023). HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncology Reports*, 49(1), 6. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8443>
 409. Basset, C. A., Conway de Macario, E., Leone, L. G., Macario, A. J. L., & Leone, A. (2023). The chaperone system in cancer therapies: Hsp90. *Journal of Molecular Histology*, 54(2), 105–118. <https://doi.org/10.1007/s10735-023-10119-8>
 410. McMillin, D. W., Negri, J., Delmore, J., Hayden, P., Ooi, M., Mitsiades, N., ... Mitsiades, C. S. (2007). Activity of New Heat Shock Protein 90 (hsp90) Inhibitor NVP-AUY922 Against Myeloma Cells Sensitive and Resistant to Conventional Agents. *Blood*, 110(11), 1587. <https://doi.org/10.1182/blood.V110.11.1587.1587>
 411. Mitsiades, C., Chanan-Khan, A., Alsina, M., Doss, D., Landrigan, B., Kettner, D., ... Richardson, P. (2005). Phase 1 trial of 17-AAG in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM). *Journal of Clinical Oncology*, 23(16_suppl), 3056–3056. https://doi.org/10.1200/jco.2005.23.16_suppl.3056
 412. Cavenagh, J., Oakervee, H., Baetiong-Caguioa, P., Davies, F., Gharibo, M., Rabin, N., ... Yong, K. (2017). A phase I/II study of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, in combination with bortezomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *British Journal of Cancer*, 117(9), 1295–1302. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.302>
 413. Mughal, M. J., Bhadresha, K., & Kwok, H. F. (2023). CDK inhibitors from past to present: A new wave of cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 88, 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.12.006>
 414. Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a026831. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>

415. Lemberg, K. M., Gori, S. S., Tsukamoto, T., Rais, R., & Slusher, B. S. (2022). Clinical development of metabolic inhibitors for oncology. *Journal of Clinical Investigation*, 132(1), e148550. <https://doi.org/10.1172/JCI148550>
416. Tataranni, T., & Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/8201079>
417. Saraei, P., Asadi, I., Kakar, M. A., & Moradi-Kor, N. (2019). The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. *Cancer Management and Research*, 2019(11), 3295–3313. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S200059>
418. Serrano-Del Valle, A. (2020). *Immunogenicity and cell death mechanisms in cancer treatment. Application to multiple myeloma*. Universidad de Zaragoza.
419. Galán-Malo, P. (2010). *Papel de las proteínas de la familia bcl-2 en la apoptosis inducida por fármacos*. Universidad de Zaragoza.
420. Marco, J. (2019). *Metabolismo glucídico de los tumores y distintas aproximaciones de terapia antitumoral*. Universidad de Zaragoza.
421. Jiménez, N. (2022). *Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor del proteasoma ixazomib en células de mieloma. Evaluación de factores de resistencia y análisis de su potenciación por agonistas BH3*. Universidad de Zaragoza.
422. Benedi, A. (2018). *Mecanismo de acción de compuestos miméticos de BH3 en células tumorales humanas*. Universidad de Zaragoza.
423. Beltrán-Visiedo, M. (2023). *New insights into the molecular mechanisms of novel targeted drugs against multiple myeloma*. Universidad de Zaragoza.
424. Beltrán-Visiedo, M., Jiménez-Alduán, N., Díez, R., Cuenca, M., Benedi, A., Serrano-Del Valle, A. S., ... Marzo, I. (2023). Dinaciclib synergizes with BH3 mimetics targeting BCL-2 and BCL-X_L in multiple myeloma cell lines partially-dependent on MCL-1 and in plasma cells from patients. *Molecular Oncology*. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13522>
425. Roca, A. (2015). *Mecanismo de muerte inducida en células tumorales por la combinación de barasertib y compuestos miméticos de BH3*. Universidad de Zaragoza.
426. Benedi, A. (2016). *Mecanismos de muerte celular inducida por fármacos antimitóticos y miméticos BH3*. Universidad de Zaragoza.
427. Ortiz de Solórzano, B. (2016). *Mecanismos de muerte celular inducida por compuestos antimitóticos en la línea de cáncer colorrectal HCT116*. Universidad de Zaragoza.
428. Benedi, A. (2017). *Construcción y evaluación de vectores pBiFC para el estudio de las interacciones entre las proteínas Bim, PUMA y Noxa y otras proteínas de la familia Bcl-2 y estudio del potencial terapéutico de compuestos miméticos de BH3*. Universidad de Zaragoza.
429. García, A. (2018). *Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por Dinaciclib en células de mieloma múltiple*. Universidad de Zaragoza.
430. Ibáñez, R. (2021). *Inmunotoxina anti-CEA basada en la granulicina como una nueva terapia antitumoral*. Universidad de Zaragoza.

431. Gonzalo, O. (2017). *Las interacciones entre proteínas de la familia BCL2 como diana en terapia antitumoral: estudio mediante la técnica BiFC y aplicación de miméticos BH3 a la leucemia linfocítica crónica*. Universidad de Zaragoza.
432. Ripollés, C. (2022). *Efecto de fármacos metabólicos sobre la capacidad anti-tumoral de células inmunitarias*. Universidad de Zaragoza.
433. Belkahla, S., Brualla, J. M., Fayd'herbe de Maudave, A., Falvo, P., Allende-Vega, N., Constantinides, M., ... Villalba, M. (2022). The metabolism of cells regulates their sensitivity to NK cells depending on p53 status. *Scientific Reports*, 12(1), 3234. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07281-6>
434. Allende-Vega, N., Marco Brualla, J., Falvo, P., Alexia, C., Constantinides, M., de Maudave, A. F., ... Villalba, M. (2022). Metformin sensitizes leukemic cells to cytotoxic lymphocytes by increasing expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Scientific Reports*, 12(1), 1341. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05470-x>
435. 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>
436. 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>
437. 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>
438. Bauer, D. E., Canver, M. C., & Orkin, S. H. (2015). Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. *JoVE*, (95), e52118. <https://doi.org/10.3791/52118>
439. Gamen, S., Anel, A., Montoya, J., Marzo, I., Piñeiro, A., & Naval, J. (1995). mtDNA-depleted U937 cells are sensitive to TNF and Fas-mediated cytotoxicity. *FEBS Letters*, 376(1–2), 15–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01236-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01236-1)
440. Triglia, R. P., & Linscott, W. D. (1980). Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera. *Molecular Immunology*, 17(6), 741–748. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(80\)90144-3](https://doi.org/10.1016/0161-5890(80)90144-3)
441. Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods*, 94(1–2), 57–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)
442. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>
443. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

444. Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. In S. D. Satyanarayanajois (Ed.), *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols* (pp. 157–168). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9
445. 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/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
446. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., & Tsukamoto, K. (1986). An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods*, 93(2), 157–165. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90183-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90183-3)
447. Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*, 51(10), 2515–2520. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/51/10/2515.abstract>
448. Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56(3), 279–285. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>
449. Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 115–118. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>
450. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
451. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 237–245). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
452. van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)
453. Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (2003). Aminophospholipid Asymmetry: A Matter of Life and Death. *Annual Review of Physiology*, 65, 701–734. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142459>
454. 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>
455. *Catalogue. Fluorescent Dyes for Bioanalytical and Hightech Applications*. (2017) (5th ed.). Jena: Dyomics GmbH.
456. Berghe, T. Vanden, Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., ... Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death & Differentiation*, 17(6), 922–930. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.184>

457. Silva, F. F. V. e, Padín-Iruegas, M. E., Caponio, V. C. A., Lorenzo-Pouso, A. I., Saavedra-Nieves, P., Chamorro-Petronacci, C. M., ... Pérez-Sayáns, M. (2022). Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11937. <https://doi.org/10.3390/ijms231911937>
458. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., ... Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>
459. Teodoro, J. S., Palmeira, C. M., & Rolo, A. P. (2018). Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. In C. M. Palmeira & A. J. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* (pp. 109–119). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_6
460. Ramzan, R., Staniek, K., Kadenbach, B., & Vogt, S. (2010). Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(9), 1672–1680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.005>
461. Alpert, N. M., Guehl, N., Ptaszek, L., Pelletier-Galarneau, M., Ruskin, J., Mansour, M. C., ... El Fakhri, G. (2018). Quantitative *in vivo* mapping of myocardial mitochondrial membrane potential. *PLoS ONE*, 13(1), e0190968. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190968>
462. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, 50(2), 98–115. <https://doi.org/10.2144/000113610>
463. Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 793(1), 141–150. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00371-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00371-4)
464. Fan, S., Li, L., Chen, S., Yu, Y., Qi, M., Tashiro, S.-I., ... Ikejima, T. (2011). Silibinin induced-autophagic and apoptotic death is associated with an increase in reactive oxygen and nitrogen species in HeLa cells. *Free Radical Research*, 45(11–12), 1307–1324. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.618186>
465. James Bound, D., Murthy, P. S., & Srinivas, P. (2016). 2,3-Dideoxyglucosides of selected terpene phenols and alcohols as potent antifungal compounds. *Food Chemistry*, 210, 371–380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.127>
466. Arndt-Jovin, D. J., & Jovin, T. M. (1989). Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA. In D. L. Taylor & Y.-L. B. T.-M. in C. B. Wang (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 30, pp. 417–448). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60989-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60989-9)
467. Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *Journal of Cell Biology*, 66(1), 188–193. <https://doi.org/10.1083/jcb.66.1.188>

468. Childs, B. G., Bussian, T. J., & Baker, D. J. (2019). Cellular Identification and Quantification of Senescence-Associated β -Galactosidase Activity *In Vivo*. In M. Demaria (Ed.), *Cellular Senescence: Methods and Protocols* (pp. 31–38). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7_4
469. Chazotte, B. (2011). Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5557. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
470. Nijhof, I. S., van Bueren, J. J. L., van Kessel, B., Andre, P., Morel, Y., Lokhorst, H. M., ... Mutis, T. (2015). Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenalidomide. *Haematologica*, 100(2), 263–268. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.117531>
471. Cuenca, M., Van Nieuwenhuijzen, N., Moesbergen, L. M., Bloem, A., Minnema, M. C., & Peperzak, V. (2022). Targeting B-cell maturation antigen increases sensitivity of multiple myeloma cells to MCL-1 inhibition. *Haematologica*, 107(4), 980–983. <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279517>
472. Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299), 535–554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)
473. Hossain, Md. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., ... Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, 14(7), 1732. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
474. Torphy, R. J., Fujiwara, Y., & Schulick, R. D. (2020). Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go. *Surgery Today*, 50(10), 1117–1125. <https://doi.org/10.1007/s00595-020-02028-0>
475. Kolbeinsson, H. M., Chandana, S., Wright, G. P., & Chung, M. (2023). Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *Journal of Investigative Surgery*, 36(1). <https://doi.org/10.1080/08941939.2022.2129884>
476. Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
477. Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M. J., ... Elmore, S. W. (2011). The Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w Inhibitor, Navitoclax, Enhances the Activity of Chemotherapeutic Agents *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(12), 2340–2349. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0415>
478. Arulananda, S., O'Brien, M., Evangelista, M., Harris, T. J., Steinohrt, N. S., Jenkins, L. J., ... Fairlie, W. D. (2020). BCL-XL is an actionable target for treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cell Death Discovery*, 6(1), 114. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00348-1>
479. Merino, D., Whittle, J. R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.-N., Giner, G., ... Lindeman, G. J. (2017). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science Translational Medicine*, 9(401). Retrieved from <http://stm.sciencemag.org/content/9/401/eaam7049.abstract>

480. Sinha, D., Duijf, P. H. G., & Khanna, K. K. (2019). Mitotic slippage: an old tale with a new twist. *Cell Cycle*, 18(1), 7–15. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1559557>
481. Hu, W., Sung, T., Jessen, B. A., Thibault, S., Finkelstein, M. B., Khan, N. K., & Sacaan, A. I. (2016). Mechanistic Investigation of Bone Marrow Suppression Associated with Palbociclib and its Differentiation from Cytotoxic Chemotherapies. *Clinical Cancer Research*, 22(8), 2000–2008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1421>
482. Driscoll, D. L., Chakravarty, A., Bowman, D., Shinde, V., Lasky, K., Shi, J., ... Hyer, M. L. (2014). Plk1 Inhibition Causes Post-Mitotic DNA Damage and Senescence in a Range of Human Tumor Cell Lines. *PLOS ONE*, 9(11), e111060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111060>
483. Paget, J. A., Restall, I. J., Daneshmand, M., Mersereau, J. A., Simard, M. A., Parolin, D. A. E., ... Lorimer, I. A. J. (2012). Repression of cancer cell senescence by PKC ϵ . *Oncogene*, 31(31), 3584–3596. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.524>
484. Anderson, M. A., Huang, D., & Roberts, A. (2014). Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Seminars in Hematology*, 51(3), 219–227. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.05.008>
485. Szlavik, Z., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., ... Kotschy, A. (2020). Discovery of S64315, a Potent and Selective Mcl-1 Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13762–13795. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01234>
486. Vandenberg, C. J., & Cory, S. (2013). ABT-199, a new Bcl-2–specific BH3 mimetic, has *in vivo* efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood*, 121(12), 2285–2288. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-475855>
487. Wang, L., Doherty, G. A., Judd, A. S., Tao, Z.-F., Hansen, T. M., Frey, R. R., ... Souers, A. J. (2020). Discovery of A-1331852, a First-in-Class, Potent, and Orally-Bioavailable BCL-XL Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(10), 1829–1836. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00568>
488. Arulananda, S., O'Brien, M., Evangelista, M., Jenkins, L. J., Poh, A. R., Walkiewicz, M., ... Fairlie, W. D. (2021). A novel BH3-mimetic, AZD0466, targeting BCL-XL and BCL-2 is effective in pre-clinical models of malignant pleural mesothelioma. *Cell Death Discovery*, 7(1), 122. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00505-0>
489. Ailawadhi, S., Chanan-Khan, A. A. A., Chen, Z., Huang, B., Konopleva, M., Brander, D. M., ... Zhai, Y. (2021). First-in-human study of lisaftoclax (APG-2575), a novel BCL-2 inhibitor (BCL-2i), in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) CLL and other hematologic malignancies (HMs). *Journal of Clinical Oncology*, 39(15_suppl), 7502–7502. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.7502
490. Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2021). Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01079-1>
491. Reljic, B., Conos, S., Lee, E. F., Garnier, J.-M., Dong, L., Lessene, G., ... Lindqvist, L. M. (2016). BAX-BAK1-independent LC3B lipidation by BH3 mimetics is unrelated to BH3 mimetic activity and has only minimal effects on autophagic flux. *Autophagy*, 12(7), 1083–1093. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1179406>

492. Takahashi, H., Chen, M. C., Pham, H., Matsuo, Y., Ishiguro, H., Reber, H. A., ... Eibl, G. (2013). Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2980–2987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.006>
493. Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9(5), 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027>
494. Chang, H., & Zou, Z. (2020). Targeting autophagy to overcome drug resistance: further developments. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01000-2>
495. Liu, S., Yao, S., Yang, H., Liu, S., & Wang, Y. (2023). Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death & Disease*, 14(10), 648. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06154-8>
496. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., ... Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*, 26(10), 2527–2539. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601689>
497. Levine, B., Sinha, S. C., & Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600–606. <https://doi.org/10.4161/auto.6260>
498. Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., ... Semenza, G. L. (2008). Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16), 10892–10903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800102200>
499. Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P. P. C., Sadiq, O., & Rubinsztein, D. C. (2012). Bim Inhibits Autophagy by Recruiting Beclin 1 to Microtubules. *Molecular Cell*, 47(3), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.040>
500. Fu, Y., Zhang, Y., Gao, M., Quan, L., Gui, R., & Liu, J. (2016). Alisertib induces apoptosis and autophagy through targeting the AKT/mTOR/AMPK/p38 pathway in leukemic cells. *Molecular Medicine Reports*, 14(1), 394–398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5249>
501. Liu, Z., Wang, F., Zhou, Z.-W., Xia, H.-C., Wang, X.-Y., Yang, Y.-X., ... Zhou, S.-F. (2017). Alisertib induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR-and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells. *American Journal of Translational Research*, 9(3), 845–873. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2611>
502. Ren, B.-J., Zhou, Z.-W., Zhu, D.-J., Ju, Y.-L., Wu, J.-H., Ouyang, M.-Z., ... Zhou, S.-F. (2016). Alisertib Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, Autophagy and Suppresses EMT in HT29 and Caco-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 41. <https://doi.org/10.3390/ijms17010041>
503. Tan, J., Xu, W., Lei, L., Liu, H., Wang, H., Cao, X., & Xu, M. (2020). Inhibition of Aurora Kinase A by Alisertib Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis and Autophagy in HuH-6 Human Hepatoblastoma Cells. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 3953–3963. <https://doi.org/10.2147/OTT.S228656>
504. Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), 15790–15797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521919112>
505. 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>
 506. Thukral, L., Sengupta, D., Ramkumar, A., Murthy, D., Agrawal, N., & Gokhale, R. S. (2015). The Molecular Mechanism Underlying Recruitment and Insertion of Lipid-Anchored LC3 Protein into Membranes. *Biophysical Journal*, 109(10), 2067–2078. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.022>
 507. Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
 508. Wu, Y., Jin, Y., Sun, T., Zhu, P., Li, J., Zhang, Q., ... Zhao, X. (2020). p62/SQSTM1 accumulation due to degradation inhibition and transcriptional activation plays a critical role in silica nanoparticle-induced airway inflammation via NF- κ B activation. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00634-1>
 509. Lian, J., Karnak, D., & Xu, L. (2010). The Bcl-2-Becclin 1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy*, 6(8), 1201–1203. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13549>
 510. Cai, B., Gong, L., Zhu, Y., Kong, L., Ju, X., Li, X., ... Li, Y. (2022). Identification of Gossypol Acetate as an Autophagy Modulator with Potent Anti-tumor Effect against Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(8), 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06399>
 511. Wang, Y., Fan, S., Li, X., Xiaokaiti, Y., Pan, Y., Tie, L., & Li, X. (2019). The novel small molecular BH3 mimetics SM3 and its regulation of cell apoptosis and autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.068>
 512. Mei, H., Lin, Z., Wang, Y., Wu, G., & Song, Y. (2014). Autophagy inhibition enhances pan-Bcl-2 inhibitor AT-101-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Neoplasma*, 61(2), 186–192. https://doi.org/10.4149/neo_2014_024
 513. Bravo-San Pedro, J. M., Wei, Y., Sica, V., Maiuri, M. C., Zou, Z., Kroemer, G., & Levine, B. (2015). BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy. *Autophagy*, 11(3), 452–459. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017191>
 514. Malik, S. A., Orhon, I., Morselli, E., Criollo, A., Shen, S., Mariño, G., ... Kroemer, G. (2011). BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene*, 30(37), 3918–3929. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.104>
 515. Zeng, C., Zhang, Z., Luo, W., Wang, L., Zhou, H., & Nie, C. (2022). JNK initiates Beclin-1 dependent autophagic cell death against Akt activation. *Experimental Cell Research*, 414(2), 113105. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113105>
 516. Xu, D., Liang, S.-Q., Yang, Z., Yang, H., Bruggmann, R., Oberhaensli, S., ... Peng, R.-W. (2021). Malignant pleural mesothelioma co-opts BCL-XL and autophagy to escape apoptosis. *Cell Death & Disease*, 12(4), 406. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03668-x>

517. Widden, H., & Placzek, W. J. (2021). The multiple mechanisms of MCL1 in the regulation of cell fate. *Communications Biology*, 4(1), 1029. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02564-6>
518. Tai, W.-T., Shiau, C.-W., Chen, H.-L., Liu, C.-Y., Lin, C.-S., Cheng, A.-L., ... Chen, K.-F. (2013). Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 4(2), e485. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.18>
519. Lindqvist, L. M., Heinlein, M., Huang, D. C. S., & Vaux, D. L. (2014). Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8512–8517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406425111>
520. Niu, H., Manfredi, M., & Ecsedy, J. A. (2015). Scientific rationale supporting the clinical development strategy for the investigational Aurora A kinase inhibitor alisertib in cancer. *Frontiers in Oncology*, 5, 189. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00189>
521. Tao, Y., Leteur, C., Calderaro, J., Girdler, F., Zhang, P., Frascogna, V., ... Deutsch, E. (2009). The Aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe. *Cell Cycle*, 8(19), 3172–3181. <https://doi.org/10.4161/cc.8.19.9729>
522. Li, J.-P., Yang, Y.-X., Liu, Q.-L., Pan, S., He, Z., Zhang, X., ... Zhou, S.-F. (2015). The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 1627–1652. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S75378>
523. Yuan, C.-X., Zhou, Z.-W., Yang, Y.-X., He, Z.-X., Zhang, X., Wang, D., ... Zhou, S.-F. (2015). Inhibition of mitotic Aurora kinase A by alisertib induces apoptosis and autophagy of human gastric cancer AGS and NCI-N78 cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 487–508. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S74127>
524. Zhu, Q., Yu, X., Zhou, Z.-W., Zhou, C., Chen, X.-W., & Zhou, S.-F. (2017). Inhibition of Aurora A Kinase by Alisertib Induces Autophagy and Cell Cycle Arrest and Increases Chemosensitivity in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 17(4), 386–401. <https://doi.org/10.2174/1568009616666160630182344>
525. Ding, Y.-H., Zhou, Z.-W., Ha, C.-F., Zhang, X.-Y., Pan, S.-T., He, Z.-X., ... Zhou, S.-F. (2015). Alisertib, an Aurora kinase A inhibitor, induces apoptosis and autophagy but inhibits epithelial to mesenchymal transition in human epithelial ovarian cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 425–464. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S74062>
526. Niu, N., Wang, Z.-L., Pan, S., Ding, H.-Q., Au, G., He, Z., ... Zhou, S.-F. (2015). Pro-apoptotic and pro-autophagic effects of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) on human osteosarcoma U-2 OS and MG-63 cells through the activation of mitochondria-mediated pathway and inhibition of p38 MAPK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 1555–1584. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S74197>
527. Shang, Y.-Y., Yao, M., Zhou, Z.-W., Jian-Cui, Li-Xia, Hu, R.-Y., ... Nan-Yu. (2017). Alisertib promotes apoptosis and autophagy in melanoma through p38 MAPK-mediated

- aurora a signaling. *Oncotarget*, 8(63), 107076–107088. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22328>
528. Li, J.-P., Yang, Y.-X., Liu, Q.-L., Zhou, Z.-W., Pan, S.-T., He, Z.-X., ... Zhou, S.-F. (2015). The pan-inhibitor of Aurora kinases danusertib induces apoptosis and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 1027–1062. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S74412>
 529. Zou, Z., Yuan, Z., Zhang, Q., Long, Z., Chen, J., Tang, Z., ... Liu, Q. (2012). Aurora kinase A inhibition-induced autophagy triggers drug resistance in breast cancer cells. *Autophagy*, 8(12), 1798–1810. <https://doi.org/10.4161/auto.22110>
 530. Harrington, E. A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R. K., Ajose-Adeogun, A. O., Nakayama, T., ... Miller, K. M. (2004). VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature Medicine*, 10(3), 262–267. <https://doi.org/10.1038/nm1003>
 531. Wu, X., Liu, J., Song, H., Yang, Q., Ying, H., Tong, W., ... Liu, Z. (2020). Aurora-B knockdown inhibits osteosarcoma metastasis by inducing autophagy via the mTOR/ULK1 pathway. *Cancer Cell International*, 20(1), 575. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01674-1>
 532. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y. Y., Zhao, J., McGowan, S. J., Zhu, Y., Brooks, R. W., ... Robbins, P. D. (2017). Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nature Communications*, 8(1), 422. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00314-z>
 533. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2021). Recent advances in the discovery of senolytics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 200, 111587. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111587>
 534. Birbo, B., Madu, E. E., Madu, C. O., Jain, A., & Lu, Y. (2021). Role of HSP90 in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10317. <https://doi.org/10.3390/ijms221910317>
 535. Koren, J., & Blagg, B. S. J. (2020). The Right Tool for the Job: An Overview of Hsp90 Inhibitors. In *HSF1 and Molecular Chaperones in Biology and Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1243, pp. 135–146). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4_9
 536. Ishii, T., Seike, T., Nakashima, T., Juliger, S., Maharaj, L., Soga, S., ... Shiotsu, Y. (2012). Anti-tumor activity against multiple myeloma by combination of KW-2478, an Hsp90 inhibitor, with bortezomib. *Blood Cancer Journal*, 2(4), e68. <https://doi.org/10.1038/bcj.2012.13>
 537. Yu, J., Zhang, C., & Song, C. (2022). Pan- and isoform-specific inhibition of Hsp90: Design strategy and recent advances. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 238, 114516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114516>
 538. Sreedhar, A. S., Kalmár, É., Csermely, P., & Shen, Y.-F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1–3), 11–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00229-7)

539. Sanchez, J., Carter, T. R., Cohen, M. S., & Blagg, B. S. J. (2020). Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Current Cancer Drug Targets*, 20(4), 253–270. <https://doi.org/10.2174/1568009619666191202101330>
540. Zeng, D., Gao, M., Zheng, R., Qin, R., He, W., Liu, S., ... Huang, Z. (2022). The HSP90 inhibitor KW-2478 depletes the malignancy of BCR/ABL and overcomes the imatinib-resistance caused by BCR/ABL amplification. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00287-w>
541. Cooper, G. (2000). The Eukaryotic Cell Cycle. In *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
542. Ryu, J., Pyo, J., Lee, C.-W., & Kim, J.-E. (2018). An Aurora kinase inhibitor, AMG900, inhibits glioblastoma cell proliferation by disrupting mitotic progression. *Cancer Medicine*, 7(11), 5589–5603. <https://doi.org/10.1002/cam4.1771>
543. Burrows, F., Zhang, H., & Kamal, A. (2004). Hsp90 Activation and Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle*, 3(12), 1530–1536. <https://doi.org/10.4161/cc.3.12.1277>
544. Karkoulis, P. K., Stravopodis, D. J., Konstantakou, E. G., & Voutsinas, G. E. (2013). Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 13(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-11>
545. Zitzmann, K., Ailer, G., Vlotides, G., Spoetl, G., Maurer, J., Göke, B., ... Auernhammer J., C. (2013). Potent antitumor activity of the novel HSP90 inhibitors AUY922 and HSP990 in neuroendocrine carcinoid cells. *International Journal of Oncology*, 43(6), 1824–1832. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2130>
546. Senju, M., Sueoka, N., Sato, A., Iwanaga, K., Sakao, Y., Tomimitsu, S., ... Sueoka, E. (2006). Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(3), 150–158. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0047-7>
547. Okamoto, J., Mikami, I., Tominaga, Y., Kuchenbecker, K. M., Lin, Y.-C., Bravo, D. T., ... Jablons, D. M. (2008). Inhibition of Hsp90 Leads to Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(10), 1089–1095. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181839693>
548. Li, H.-J., Wang, Q.-S., Han, W., Zhou, H., Li, P., Zhou, F., ... Cao, H.-L. (2021). Anti-NSCLC activity *in vitro* of Hsp90N inhibitor KW-2478 and complex crystal structure determination of Hsp90N-KW-2478. *Journal of Structural Biology*, 213(2), 107710. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107710>
549. Schwock, J., Pham, N.-A., Cao, M. P., & Hedley, D. W. (2008). Efficacy of Hsp90 inhibition for induction of apoptosis and inhibition of growth in cervical carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(4), 669–681. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0522-8>
550. Restall, I. J., & Lorimer, I. A. J. (2010). Induction of Premature Senescence by Hsp90 Inhibition in Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE*, 5(6), e11076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011076>

551. Kanugovi Vijayavittal, A., & Amere Subbarao, S. (2021). The conformation-specific Hsp90 inhibition interferes with the oncogenic RAF kinase adaptation and triggers premature cellular senescence, hence, acts as a tumor suppressor mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(3), 118943. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118943>
552. Sarangi, U., Paithankar, K. R., Kumar, J. U., Subramaniam, V., & Sreedhar, A. S. (2012). 17AAG Treatment Accelerates Doxorubicin Induced Cellular Senescence: Hsp90 Interferes with Enforced Senescence of Tumor Cells. *Drug Target Insights*, 6(1), 19–39. <https://doi.org/10.33393/dti.2012.1375>
553. Ploumaki, I., Triantafyllou, E., Koumprentziotis, I.-A., Karampinos, K., Drougkas, K., Karavolias, I., ... Kotteas, E. A. (2023). Bcl-2 pathway inhibition in solid tumors: a review of clinical trials. *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-03070-9>
554. Shi, J., & Mitchison, T. J. (2017). Cell death response to anti-mitotic drug treatment in cell culture, mouse tumor model and the clinic. *Endocrine-Related Cancer*, 24(9), 83–96. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0003>
555. Barillé-Nion, S., Bah, N., Véquaud, E., & Juin, P. (2012). Regulation of Cancer Cell Survival by BCL2 Family Members upon Prolonged Mitotic Arrest: Opportunities for Anticancer Therapy. *Anticancer Research*, 32(10), 4225–4233. Retrieved from <http://ar.iijournals.org/content/32/10/4225.abstract>
556. Bah, N., Maillet, L., Ryan, J., Dubreil, S., Gautier, F., Letai, A., ... Barillé-Nion, S. (2014). Bcl-xL controls a switch between cell death modes during mitotic arrest. *Cell Death & Disease*, 5(6), e1291. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.251>
557. Suleimenov, M., Bekbayev, S., Ten, M., Suleimenova, N., Tlegenova, M., Nurmagambetova, A., ... Vorobjev, I. (2022). Bcl-xL activity influences outcome of the mitotic arrest. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.933112>
558. Shah, O. J., Lin, X., Li, L., Huang, X., Li, J., Anderson, M. G., ... Shen, Y. (2010). Bcl-XL represents a druggable molecular vulnerability during aurora B inhibitor-mediated polyploidization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12634–12639. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913615107>
559. Bennett, A., Sloss, O., Topham, C., Nelson, L., Tighe, A., & Taylor, S. S. (2016). Inhibition of Bcl-xL sensitizes cells to mitotic blockers, but not mitotic drivers. *Open Biology*, 6(8), 160134. <https://doi.org/10.1098/rsob.160134>
560. Haschka, M. D., Soratroi, C., Kirschnek, S., Häcker, G., Hilbe, R., Geley, S., ... Fava, L. L. (2015). The NOXA–MCL1–BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest. *Nature Communications*, 6(1), 6891. <https://doi.org/10.1038/ncomms7891>
561. Wang, P., Lindsay, J., Owens, T. W., Mularczyk, E. J., Warwood, S., Foster, F., ... Gilmore, A. P. (2014). Phosphorylation of the Proapoptotic BH3-Only Protein Bid Primes Mitochondria for Apoptosis during Mitotic Arrest. *Cell Reports*, 7(3), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.050>
562. Allan, L. A., & Clarke, P. R. (2007). Phosphorylation of Caspase-9 by CDK1/Cyclin B1 Protects Mitotic Cells against Apoptosis. *Molecular Cell*, 26(2), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.019>

563. Park, H.-K., Yoon, N. G., Lee, J.-E., Hu, S., Yoon, S., Kim, S. Y., ... Kang, B. H. (2020). Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(1), 79–91. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0360-x>
564. Daunys, S., Matulis, D., & Petrikaitė, V. (2019). Synergistic activity of Hsp90 inhibitors and anticancer agents in pancreatic cancer cell cultures. *Scientific Reports*, 9(1), 16177. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52652-1>
565. Raja, S. M., Clubb, R. J., Bhattacharyya, M., Dimri, M., Cheng, H., Pan, W., ... Band, H. (2008). A combination of Trastuzumab and 17-AAG induces enhanced ubiquitinylation and lysosomal pathway-dependent ErbB2 degradation and cytotoxicity in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 7(10), 1630–1640. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.10.6585>
566. Modi, S., Stopeck, A. T., Gordon, M. S., Mendelson, D., Solit, D. B., Bagatell, R., ... Hudis, C. A. (2007). Combination of Trastuzumab and Tanespimycin (17-AAG, KOS-953) Is Safe and Active in Trastuzumab-Refractory HER-2-Overexpressing Breast Cancer: A Phase I Dose-Escalation Study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(34), 5410–5417. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.7960>
567. Ramalingam, S., Goss, G., Rosell, R., Schmid-Bindert, G., Zaric, B., Andric, Z., ... Fennell, D. (2015). A randomized phase II study of ganetespib, a heat shock protein 90 inhibitor, in combination with docetaxel in second-line therapy of advanced non-small cell lung cancer (GALAXY-1). *Annals of Oncology*, 26(8), 1741–1748. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv220>
568. Busacca, S., Law, E. W. P., Powley, I. R., Proia, D. A., Sequeira, M., Le Quesne, J., ... Fennell, D. A. (2016). Resistance to HSP90 inhibition involving loss of MCL1 addiction. *Oncogene*, 35(12), 1483–1492. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.213>
569. Karpel-Massler, G., Ishida, C. T., Bianchetti, E., Shu, C., Perez-Lorenzo, R., Horst, B., ... Siegelin, M. D. (2017). Inhibition of Mitochondrial Matrix Chaperones and Antiapoptotic Bcl-2 Family Proteins Empower Antitumor Therapeutic Responses. *Cancer Research*, 77(13), 3513–3526. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3424>
570. Duus, J., Bahar, H. I., Venkataraman, G., Ozpuyan, F., Izban, K. F., Al-Masri, H., ... Alkan, S. (2006). Analysis of expression of heat shock protein-90 (HSP90) and the effects of HSP90 inhibitor (17-AAG) in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 47(7), 1369–1378. <https://doi.org/10.1080/10428190500472123>
571. Wang, S.-X., Ju, H.-Q., Liu, K.-S., Zhang, J.-X., Wang, X., Xiang, Y.-F., ... Wang, Y.-F. (2011). SNX-2112, a Novel Hsp90 Inhibitor, Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in MCF-7 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), 1540–1545. <https://doi.org/10.1271/bbb.110225>
572. Hu, L., Li, H., Zi, M., Li, W., Liu, J., Yang, Y., ... He, Y. (2022). Why Senescent Cells Are Resistant to Apoptosis: An Insight for Senolytic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 822816. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.822816>
573. Zeng, S., Shen, W., & Liu, L. (2018). Senescence and Cancer. *Cancer Translational Medicine*, 4(3), 70–74. https://doi.org/10.4103/ctm.ctm_22_18

574. Saleh, T., Carpenter, V. J., Tyutyunyk-Massey, L., Murray, G., Levenson, J. D., Souers, A. J., ... Gewirtz, D. A. (2020). Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-XL–BAX interaction. *Molecular Oncology*, 14(10), 2504–2519. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12761>
575. Brattinga, B., & van Leeuwen, B. L. (2021). Senescent Cells: A Potential Target for New Cancer Therapies in Older Oncologic Patients. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers13020278>
576. Chaib, S., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2022). Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nature Medicine*, 28(8), 1556–1568. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01923-y>
577. Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., ... Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7(1), 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>
578. Basu, A. (2022). The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 230, 107943. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107943>
579. Shahbandi, A., Rao, S. G., Anderson, A. Y., Frey, W. D., Olayiwola, J. O., Ungerleider, N. A., & Jackson, J. G. (2020). BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer. *Cell Death & Differentiation*, 27(11), 3097–3116. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0564-6>
580. Rysanek, D., Vasicova, P., Kolla, J. N., Sedlak, D., Andera, L., Bartek, J., & Hodny, Z. (2022). Synergism of BCL-2 family inhibitors facilitates selective elimination of senescent cells. *Aging*, 14(16), 6381–6414. <https://doi.org/10.18632/aging.204207>
581. Jaber, S., Warnier, M., Leers, C., Vernier, M., Goehrig, D., Médard, J.-J., ... Bernard, D. (2023). Targeting chemoresistant senescent pancreatic cancer cells improves conventional treatment efficacy. *Molecular Biomedicine*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s43556-023-00116-4>
582. Kolodkin-Gal, D., Roitman, L., Ovadya, Y., Azazmeh, N., Assouline, B., Schlesinger, Y., ... Krizhanovsky, V. (2022). Senolytic elimination of Cox2-expressing senescent cells inhibits the growth of premalignant pancreatic lesions. *Gut*, 71(2), 345–355. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321112>
583. Huart, C., Fransolet, M., Demazy, C., Le Calvé, B., Lucas, S., Michiels, C., & Wéra, A.-C. (2022). Taking Advantage of the Senescence-Promoting Effect of Olaparib after X-ray and Proton Irradiation Using the Senolytic Drug, ABT-263. *Cancers*, 14(6), 1460. <https://doi.org/10.3390/cancers14061460>
584. Zhang, L., Fok, J. H. L., & Davies, F. E. (2014). Heat shock proteins in multiple myeloma. *Oncotarget*, 5(5), 1132–1148. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1584>
585. Romero, A. (2015). *Mecanismo de muerte celular inducida por el inhibidor de Btk Ibrutinib en células de mieloma múltiple*. Universidad de Zaragoza.
586. Redrado, A. (2023). *Caracterización de líneas celulares de mieloma múltiple resistentes a miméticos-BH3*. Universidad de Zaragoza.

587. Vogler, M., Walter, H. S., & Dyer, M. J. S. (2017). Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies – from pathogenesis to treatment. *British Journal of Haematology*, 178(3), 364–379. <https://doi.org/10.1111/bjh.14684>
588. Gong, J.-N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C. D., Garnier, J.-M., ... Huang, D. C. S. (2016). Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood*, 128(14), 1834–1844. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704908>
589. 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>
590. Doi, K., Li, R., Sung, S.-S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., ... Wang, H.-G. (2012). Discovery of Marinopyrrole A (Maritoclax) as a Selective Mcl-1 Antagonist that Overcomes ABT-737 Resistance by Binding to and Targeting Mcl-1 for Proteasomal Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10224–10235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334532>
591. Wang, B., Ni, Z., Dai, X., Qin, L., Li, X., Xu, L., ... He, F. (2014). The Bcl-2/xL inhibitor ABT-263 increases the stability of Mcl-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-98>
592. Wang, Q., & Hao, S. (2019). A-1210477, a selective MCL-1 inhibitor, overcomes ABT-737 resistance in AML. *Oncology Letters*, 18(5), 5481–5489. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10891>
593. Fischer, M. A., Song, Y., Arrate, M. P., Gbyli, R., Villaume, M. T., Smith, B. N., ... Savona, M. R. (2022). Selective inhibition of MCL1 overcomes venetoclax resistance in a murine model of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 108(2), 522–531. <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.280631>
594. Ramsey, H. E., Fischer, M. A., Lee, T., Gorska, A. E., Arrate, M. P., Fuller, L., ... Savona, M. R. (2018). A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discovery*, 8(12), 1566–1581. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0140>
595. Ramesh, P., Di Franco, S., Atencia Taboada, L., Zhang, L., Nicotra, A., Stassi, G., & Medema, J. P. (2022). BCL-XL inhibition induces an FGFR4-mediated rescue response in colorectal cancer. *Cell Reports*, 38(7), 110374. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110374>
596. Haselager, M., Thijssen, R., West, C., Young, L., Van Kampen, R., Willmore, E., ... Eldering, E. (2021). Regulation of Bcl-XL by non-canonical NF-κB in the context of CD40-induced drug resistance in CLL. *Cell Death & Differentiation*, 28(5), 1658–1668. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00692-w>
597. Choudhary, G. S., Al-harbi, S., Mazumder, S., Hill, B. T., Smith, M. R., Bodo, J., ... Almasan, A. (2015). MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death & Disease*, 6(1), e1593. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.525>

598. Yecies, D., Carlson, N. E., Deng, J., & Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*, 115(16), 3304–3313. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233304>
599. Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A. J., Phillips, D. C., Smith, M. R., & Hsi, E. D. (2016). Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget*, 7(43), 70000–70010. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12132>
600. Mérino, D., Khaw, S. L., Glaser, S. P., Anderson, D. J., Belmont, L. D., Wong, C., ... Bouillet, P. (2012). Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood*, 119(24), 5807–5816. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-400929>
601. Liu, Q., Osterlund, E. J., Chi, X., Pogmore, J., Leber, B., & Andrews, D. W. (2019). Bim escapes displacement by BH3-mimetic anti-cancer drugs by double-bolt locking both Bcl-XL and Bcl-2. *eLife*, 8, e37689. <https://doi.org/10.7554/eLife.37689>
602. Li, X., Li, B., Ni, Z., Zhou, P., Wang, B., He, J., ... He, F. (2017). Metformin Synergizes with BCL-XL/BCL-2 Inhibitor ABT-263 to Induce Apoptosis Specifically in p53-Defective Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(9), 1806–1818. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0763>
603. Ianevski, A., Kuleskiy, E., Krpina, K., Lou, G., Aman, Y., Bugai, A., ... Kainov, D. E. (2020). Chemical, Physical and Biological Triggers of Evolutionary Conserved Bcl-xL-Mediated Apoptosis. *Cancers*, 12(6), 1694. <https://doi.org/10.3390/cancers12061694>
604. Alford, S. E., Kothari, A., Loeff, F. C., Eichhorn, J. M., Sakurikar, N., Goselink, H. M., ... Chambers, T. C. (2015). BH3 Inhibitor Sensitivity and Bcl-2 Dependence in Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Research*, 75(7), 1366–1375. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1849>
605. Touzeau, C., Ryan, J., Guerriero, J., Moreau, P., Chonghaile, T. N., Le Gouill, S., ... Letai, A. (2016). BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia*, 30(3), 761–764. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.184>
606. Punnoose, E., Levenson, J. D., Peale, F., Boghaert, E. R., Belmont, L. D., Tan, N., ... 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>
607. Oberlton, B., Matulis, S., & Boise, L. H. (2014). Induction of Bim-Dependent and -Independent Apoptosis in Multiple Myeloma. *Blood*, 124(21), 4716. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.4716.4716>
608. Morales, A. A., Kurtoglu, M., Matulis, S. M., Liu, J., Siefker, D., Gutman, D. M., ... 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>
609. Wuillème-Toumi, S., Trichet, V., Gomez-Bougie, P., Gratas, C., Bataille, R., & Amiot, M. (2007). Reciprocal protection of Mcl-1 and Bim from ubiquitin-proteasome

- degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(4), 865–869. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.070>
610. 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>
 611. Gomez-Bougie, P., Oliver, L., Le Gouill, S., Bataille, R., & Amiot, M. (2005). Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex. *Oncogene*, 24(54), 8076–8079. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208949>
 612. Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., ... 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. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/11/5418.abstract>
 613. Seiller, C., Maiga, S., Touzeau, C., Bellanger, C., Kervoëlen, C., Descamps, G., ... 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 & Disease*, 11(5), 316. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2505-1>
 614. Chen, S., Zhang, Y., Zhou, L., Leng, Y., Lin, H., Kmiecik, M., ... 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>
 615. Pan, R., Ruvolo, V. R., Wei, J., Konopleva, M., Reed, J. C., Pellicchia, M., ... Ruvolo, P. P. (2015). Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (–)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. *Blood*, 126(3), 363–372. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-604975>
 616. Zhang, Z., Song, T., Zhang, T., Gao, J., Wu, G., An, L., & Du, G. (2011). A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1. *International Journal of Cancer*, 128(7), 1724–1735. <https://doi.org/10.1002/ijc.25484>
 617. Klanova, M., Kazantsev, D., Pokorna, E., Zikmund, T., Karolova, J., Behounek, M., ... Klener, P. (2022). Anti-apoptotic MCL1 Protein Represents Critical Survival Molecule for Most Burkitt Lymphomas and BCL2-negative Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 21(1), 89–99. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0511>
 618. Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., ... 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>
 619. Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., Tahir, S. K., ... 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), 279ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4642>

620. van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., ... Huang, D. C. S. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, 10(5), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.027>
621. Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M. J. S., & Cohen, G. M. (2009). Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), 1030–1039. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.48>
622. Caenepeel, S., Brown, S. P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K. S., Chui, D., ... Hughes, P. E. (2018). AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. *Cancer Discovery*, 8(12), 1582–1597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0387>
623. Villalobos-Ortiz, M., Ryan, J., Mashaka, T. N., Opferman, J. T., & Letai, A. (2020). BH3 profiling discriminates on-target small molecule BH3 mimetics from putative mimetics. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 999–1007. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0391-9>
624. Lin, K. H., Winter, P. S., Xie, A., Roth, C., Martz, C. A., Stein, E. M., ... Wood, K. C. (2016). Targeting MCL-1/BCL-XL Forestalls the Acquisition of Resistance to ABT-199 in Acute Myeloid Leukemia. *Scientific Reports*, 6(1), 27696. <https://doi.org/10.1038/srep27696>
625. Moujalled, D. M., Brown, F. C., Chua, C. C., Dengler, M. A., Pomilio, G., Anstee, N. S., ... Wei, A. H. (2023). Acquired mutations in BAX confer resistance to BH3-mimetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*, 141(6), 634–644. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016090>
626. Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J. D., Souers, A. J., ... 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>
627. Guièze, R., Liu, V. M., Rosebrock, D., Jourdain, A. A., Hernández-Sánchez, M., Martínez Zurita, A., ... Wu, C. J. (2019). Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*, 36(4), 369–384.E13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.005>
628. Kerkhofs, M., Vervloessem, T., Stopa, K. B., Smith, V. M., Vogler, M., & Bultynck, G. (2020). DLBCL Cells with Acquired Resistance to Venetoclax Are Not Sensitized to BIRD-2 But Can Be Resensitized to Venetoclax through Bcl-XL Inhibition. *Biomolecules*, 10(7), 1081. <https://doi.org/10.3390/biom10071081>
629. Lucantoni, F., Düssmann, H., Llorente-Folch, I., & Prehn, J. H. M. (2018). BCL2 and BCL(X)L selective inhibitors decrease mitochondrial ATP production in breast cancer cells and are synthetically lethal when combined with 2-deoxy-D-glucose. *Oncotarget*, 9(40), 26046–26063. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25433>
630. Bolomsky, A., Miettinen, J. J., Malyutina, A., Besse, A., Huber, J., Fellingner, S., ... Ludwig, H. (2021). Heterogeneous modulation of Bcl-2 family members and drug efflux mediate MCL-1 inhibitor resistance in multiple myeloma. *Blood Advances*, 5(20), 4125–4139. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003826>

631. Alhoshani, A., Alatawi, F. O., Al-Anazi, F. E., Attafi, I. M., Zeidan, A., Agouni, A., ... Korashy, H. M. (2020). BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *OncoTargets and Therapy*, 2020(13), 13357–13370. <https://doi.org/10.2147/OTT.S281519>
632. Calis, S., Dogan, B., Durdagi, S., Celebi, A., Yapicier, O., Kilic, T., ... Avsar, T. (2022). A novel BH3 mimetic Bcl-2 inhibitor promotes autophagic cell death and reduces in vivo Glioblastoma tumor growth. *Cell Death Discovery*, 8(1), 433. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01225-9>
633. Song, J. H., Kandasamy, K., Zemskova, M., Lin, Y.-W., & Kraft, A. S. (2011). The BH3 Mimetic ABT-737 Induces Cancer Cell Senescence. *Cancer Research*, 71(2), 506–515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1977>
634. Koehler, B. C., Scherr, A.-L., Lorenz, S., Ellsner, C., Kautz, N., Welte, S., ... Schulze-Bergkamen, H. (2014). Pan-Bcl-2 Inhibitor Obatoclax Delays Cell Cycle Progression and Blocks Migration of Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(9), e106571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106571>
635. Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., ... Andreeff, M. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 10(5), 375–388. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.006>
636. Adhikary, U., Paulo, J. A., Godes, M., Roychoudhury, S., Prew, M. S., Ben-Nun, Y., ... Walensky, L. D. (2023). Targeting MCL-1 triggers DNA damage and an anti-proliferative response independent from apoptosis induction. *Cell Reports*, 42(10), 113176. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113176>
637. Konopleva, M., Watt, J., Contractor, R., Tsao, T., Harris, D., Estrov, Z., ... Andreeff, M. (2008). Mechanisms of Antileukemic Activity of the Novel Bcl-2 Homology Domain-3 Mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Research*, 68(9), 3413–3420. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1919>
638. Jiménez-Guerrero, R., Gasca, J., Flores, M., Pérez-Valderrama, B., Tejera-Parrado, C., Medina, R., ... Sáez, C. (2018). Obatoclax and Paclitaxel Synergistically Induce Apoptosis and Overcome Paclitaxel Resistance in Urothelial Cancer Cells. *Cancers*, 10(12), 490. <https://doi.org/10.3390/cancers10120490>
639. Zhong, D., Gu, C., Shi, L., Xun, T., Li, X., Liu, S., & Yu, L. (2014). Obatoclax Induces G1/G0-Phase Arrest via p38/p21^{waf1/Cip1} Signaling Pathway in Human Esophageal Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(9), 1624–1635. <https://doi.org/10.1002/jcb.24829>
640. Or, C.-H., Chang, Y., Lin, W.-C., Lee, W.-C., Su, H.-L., Cheung, M.-W., ... Chang, C.-C. (2017). Obatoclax, a Pan-BCL-2 Inhibitor, Targets Cyclin D1 for Degradation to Induce Antiproliferation in Human Colorectal Carcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 44. <https://doi.org/10.3390/ijms18010044>
641. Li, L., Li, P., Song, H., Ma, X., Zeng, S., Peng, Y., & Zhang, G. (2022). Targeting entry into mitochondria for increased anticancer efficacy of BCL-XL-selective inhibitors in lung cancer. *Pharmacological Research*, 177, 106095. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106095>

642. Zhong, J., Xu, Y., Yi, H., Su, J., Yu, H., Xiang, X., ... Sun, L. (2012). The BH3 mimetic S1 induces autophagy through ER stress and disruption of Bcl-2/Beclin 1 interaction in human glioma U251 cells. *Cancer Letters*, 323(2), 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.009>
643. Pan, J., Cheng, C., Verstovsek, S., Chen, Q., Jin, Y., & Cao, Q. (2010). The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Letters*, 293(2), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.006>
644. Cai, Y., Cai, J., Ma, Q., Xu, Y., Zou, J., Xu, L., ... Guo, X. (2017). Chloroquine affects autophagy to achieve an anticancer effect in EC109 esophageal carcinoma cells *in vitro*. *Oncology Letters*, 15(1), 1143–1148. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7415>
645. Ye, H., Chen, M., Cao, F., Huang, H., Zhan, R., & Zheng, X. (2016). Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurology*, 16(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0700-6>
646. Jia, B., Xue, Y., Yan, X., Li, J., Wu, Y., Guo, R., ... Sun, L. (2018). Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress. *Oncology Letters*, 16(3), 3509–3516. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9131>
647. Yan, X., Zhong, X., Yu, S., Zhang, L., Liu, Y., Zhang, Y., ... Su, J. (2019). p62 aggregates mediated Caspase 8 activation is responsible for progression of ovarian cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(6), 4030–4042. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14288>
648. Lee, S. H., Cho, W. J., Najy, A. J., Saliganan, A.-D., Pham, T., Rakowski, J., ... Kim, H.-R. C. (2021). p62/SQSTM1-induced caspase-8 aggresomes are essential for ionizing radiation-mediated apoptosis. *Cell Death & Disease*, 12(11), 997. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04301-7>
649. Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
650. Jarauta, V., Jaime, P., Gonzalo, O., de Miguel, D., Ramírez-Labrada, A., Martínez-Lostao, L., ... 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>
651. McCarthy, A., Yeung, V., Gribben, J. G., & Jia, L. (2012). Inhibition of Autophagy by Chloroquine Sensitises Lymphoma Cells to ABT-737-Induced Apoptosis. *Blood*, 120(21), 1625. <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.1625.1625>
652. Lee, Y.-C., Wang, L.-J., Huang, C.-H., Shi, Y.-J., & Chang, L.-S. (2018). ABT-263-induced MCL1 upregulation depends on autophagy-mediated 4EBP1 downregulation in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 432, 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.019>
653. Chiou, J.-T., Lee, Y.-C., Wang, L.-J., & Chang, L.-S. (2022). BCL2 inhibitor ABT-199 and BCL2L1 inhibitor WEHI-539 coordinately promote NOXA-mediated degradation of MCL1 in human leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions*, 361, 109978. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109978>

654. Evans, R. P., Naber, C., Steffler, T., Checkland, T., Maxwell, C. A., Keats, J. J., ... Reiman, T. (2008). The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 is a potential new treatment for multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 140(3), 295–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06913.x>
655. Beksac, M., Balli, S., & Akcora Yildiz, D. (2020). Drug Targeting of Genomic Instability in Multiple Myeloma. *Frontiers in Genetics*, 11, 228. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00228>
656. Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Taniguchi, A., Kuwayama, Y., ... Yokoyama, A. (2007). AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 110(6), 2034–2040. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-073700>
657. Ashton, S., Song, Y. H., Nolan, J., Cadogan, E., Murray, J., Odedra, R., ... Barry, S. T. (2016). Aurora kinase inhibitor nanoparticles target tumors with favorable therapeutic index *in vivo*. *Science Translational Medicine*, 8(325), 325ra17. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad2355>
658. Donnellan, W. B., Atallah, E. L., Asch, A. S., Patel, M. R., Yang, J., Eghtedar, A., ... Cosaert, J. (2019). A Phase I/II Study of AZD2811 Nanoparticles (NP) As Monotherapy or in Combination in Treatment-Naïve or Relapsed/Refractory AML/MDS Patients Not Eligible for Intensive Induction Therapy. *Blood*, 134(Supplement_1), 3919. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-130635>
659. Johnson, M. L., Cosaert, J. G. C. E., Falchook, G. S., Jones, S. F., Strickland, D., Greenlees, C., ... Wang, J. S.-Z. (2019). A phase I, open label, multicenter dose escalation study of AZD2811 nanoparticle in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl), 3098–3098. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.3098
660. Qi, W., Spier, C., Liu, X., Agarwal, A., Cooke, L. S., Persky, D. O., ... Mahadevan, D. (2013). Alisertib (MLN8237) an investigational agent suppresses Aurora A and B activity, inhibits proliferation, promotes endo-reduplication and induces apoptosis in T-NHL cell lines supporting its importance in PTCL treatment. *Leukemia Research*, 37(4), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.017>
661. Asteriti, I. A., Cesare, E. Di, Mattia, F. De, Hilsenstein, V., Neumann, B., Cundari, E., ... Guarguaglini, G. (2014). The Aurora-A inhibitor MLN8237 affects multiple mitotic processes and induces dose-dependent mitotic abnormalities and aneuploidy. *Oncotarget*, 5(15), 6229–6242. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2190>
662. Du, J., Yan, L., Torres, R., Gong, X., Bian, H., Marugán, C., ... Campbell, R. M. (2019). Aurora A–Selective Inhibitor LY3295668 Leads to Dominant Mitotic Arrest, Apoptosis in Cancer Cells, and Shows Potent Preclinical Antitumor Efficacy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(12), 2207–2219. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0529>
663. Marxer, M., Ma, H. T., Man, W. Y., & Poon, R. Y. C. (2014). p53 deficiency enhances mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Aurora kinases. *Oncogene*, 33(27), 3550–3560. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.325>

664. Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2020). Aurora kinases and DNA damage response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 821, 111716. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111716>
665. Lok, W., Klein, R. Q., & Saif, M. W. (2010). Aurora kinase inhibitors as anti-cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 21(4), 339–350. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283350dd1>
666. Bousset, L., & Gil, J. (2022). Targeting senescence as an anticancer therapy. *Molecular Oncology*, 16(21), 3855–3880. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13312>
667. Zhou, N., Singh, K., Mir, M. C., Parker, Y., Lindner, D., Dreicer, R., ... Hansel, D. E. (2013). The Investigational Aurora Kinase A Inhibitor MLN8237 Induces Defects in Cell Viability and Cell-Cycle Progression in Malignant Bladder Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Clinical Cancer Research*, 19(7), 1717–1728. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2383>
668. Yuan, C.-X., Zhou, Z.-W., Yang, Y.-X., He, Z., Zhang, X., Wong, D., ... Zhou, S.-F. (2015). Danusertib, a potent pan-Aurora kinase and ABL kinase inhibitor, induces cell cycle arrest and programmed cell death and inhibits epithelial to mesenchymal transition involving the PI3K/Akt/mTOR-mediated signaling pathway in human gastric cancer AGS and NCI-N78 cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015(9), 1293–1318. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S74964>
669. Das, B. K., Kannan, A., Nguyen, Q., Gogoi, J., Zhao, H., & Gao, L. (2021). Selective Inhibition of Aurora Kinase A by AK-01/LY3295668 Attenuates MCC Tumor Growth by Inducing MCC Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Cancers*, 13(15), 3708. <https://doi.org/10.3390/cancers13153708>
670. Qi, J., Gao, X., Zhong, X., Zhang, N., Wang, R., Zhang, H., ... Xu, K. (2019). Selective inhibition of Aurora A and B kinases effectively induces cell cycle arrest in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117, 109113. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109113>
671. Zi, D., Zhou, Z.-W., Yang, Y.-J., Huang, L., Zhou, Z.-L., He, S.-M., ... Zhou, S.-F. (2015). Danusertib Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Autophagy but Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition Involving PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27228–27251. <https://doi.org/10.3390/ijms161126018>
672. Li, Y., Zhou, W., Wei, L., Jin, J., Tang, K., Li, C., ... Chen, X. (2012). The effect of Aurora kinases on cell proliferation, cell cycle regulation and metastasis in renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 41(6), 2139–2149. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1633>
673. Jiang, Z., Jiang, J., Yang, H., Ge, Z., Wang, Q., Zhang, L., ... Wang, J. (2014). Silencing of Aurora kinase A by RNA interference inhibits tumor growth in human osteosarcoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Oncology Reports*, 31(3), 1249–1254. <https://doi.org/10.3892/or.2014.2986>
674. Taniguchi, H., Caeser, R., Chavan, S. S., Zhan, Y. A., Chow, A., Manoj, P., ... Sen, T. (2022). WEE1 inhibition enhances the antitumor immune response to PD-L1 blockade by the concomitant activation of STING and STAT1 pathways in SCLC. *Cell Reports*, 39(7), 110814. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110814>

675. Pezuk, J. A., Brassesco, M. S., Morales, A. G., de Oliveira, J. C., de Oliveira, H. F., Scrideli, C. A., & Tone, L. G. (2013). Inhibition of Polo-Like Kinase 1 Induces Cell Cycle Arrest and Sensitizes Glioblastoma Cells to Ionizing Radiation. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(7), 516–522. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1415>
676. Schmit, T. L., Zhong, W., Setaluri, V., Spiegelman, V. S., & Ahmad, N. (2009). Targeted Depletion of Polo-Like Kinase (Plk) 1 Through Lentiviral shRNA or a Small-Molecule Inhibitor Causes Mitotic Catastrophe and Induction of Apoptosis in Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(12), 2843–2853. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.172>
677. Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., ... Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28), 10660–10665. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600447103>
678. Alimova, I., Ng, J., Harris, P., Birks, D., Donson, A., Taylor, M. D., ... Vibhakar, R. (2016). MPS1 kinase as a potential therapeutic target in medulloblastoma. *Oncology Reports*, 36(5), 2633–2640. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5085>
679. Sutton, D., Gilmartin, A., Kusnierz, A., Sung, C.-M., Luo, L., Carson, J., ... Jackson, J. (2007). A potent and selective inhibitor of the mitotic kinesin CENP-E (GSK923295A), demonstrates a novel mechanism of inhibiting tumor cell proliferation and shows activity against a broad panel of human tumor cell lines in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(11_Supplement), A111.
680. Teodoro, J. G., Heilman, D. W., Parker, A. E., & Green, M. R. (2004). The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes & Development*, 18(16), 1952–1957. <https://doi.org/10.1101/gad.1198404>
681. Qi, W., Cooke, L. S., Liu, X., Rimsza, L., Roe, D. J., Manziolli, A., ... Mahadevan, D. (2011). Aurora inhibitor MLN8237 in combination with docetaxel enhances apoptosis and anti-tumor activity in mantle cell lymphoma. *Biochemical Pharmacology*, 81(7), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.017>
682. Islam, S., Qi, W., Morales, C., Cooke, L., Pandey, M., Spier, C. M., & Mahadevan, D. (2016). Alisertib-Induced Polyploidy and Senescence in DH/DP-DLBCL Is Abrogated By Synthetic Lethal Interactions with Ibrutinib and Rituximab. *Blood*, 128(22), 5397. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.5397.5397>
683. Nair, J. S., Ho, A. L., & Schwartz, G. K. (2012). The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle*, 11(4), 807–817. <https://doi.org/10.4161/cc.11.4.19323>
684. Sehdev, V., Katsha, A., Ecsedy, J., Zaika, A., Belkhiri, A., & El-Rifai, W. (2013). The combination of alisertib, an investigational Aurora kinase A inhibitor, and docetaxel promotes cell death and reduces tumor growth in preclinical cell models of upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer*, 119(4), 904–914. <https://doi.org/10.1002/cncr.27801>
685. Moreaux, J., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maïga, S., Hose, D., ... Pellat-Deceunynck, C. (2011). A high-risk signature for patients with multiple myeloma

- established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*, 96(4), 574–582. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033456>
686. Choi, M., Kim, W., Cheon, M. G., Lee, C.-W., & Kim, J.-E. (2015). Polo-like kinase 1 inhibitor BI2536 causes mitotic catastrophe following activation of the spindle assembly checkpoint in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, 357(2), 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.023>
 687. Min, Y. H., Kim, W., & Kim, J.-E. (2016). The Aurora kinase A inhibitor TC-A2317 disrupts mitotic progression and inhibits cancer cell proliferation. *Oncotarget*, 7(51), 84718–84735. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12448>
 688. Porcelli, L., Guida, G., Quatralè, A. E., Cocco, T., Sidella, L., Maida, I., ... Azzariti, A. (2015). Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0385-4>
 689. Tsuno, T., Natsume, A., Katsumata, S., Mizuno, M., Fujita, M., Osawa, H., ... Yoshida, J. (2007). Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 83(3), 249–258. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9335-1>
 690. Ha, D.-H., Min, A., Kim, S., Jang, H., Kim, S. H., Kim, H.-J., ... Im, S.-A. (2020). Antitumor effect of a WEE1 inhibitor and potentiation of olaparib sensitivity by DNA damage response modulation in triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 9930. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66018-5>
 691. Choi, M., Min, Y. H., Pyo, J., Lee, C.-W., Jang, C.-Y., & Kim, J.-E. (2017). TC Mps1 12, a novel Mps1 inhibitor, suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells via the accumulation of chromosomal instability. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1810–1825. <https://doi.org/10.1111/bph.13782>
 692. Iegiani, G., Gai, M., Di Cunto, F., & Pallavicini, G. (2021). CENPE Inhibition Leads to Mitotic Catastrophe and DNA Damage in Medulloblastoma Cells. *Cancers*, 13(5), 1028. <https://doi.org/10.3390/cancers13051028>
 693. Kwok, M., Davies, N., Agathangelou, A., Smith, E., Oldreive, C., Petermann, E., ... Stankovic, T. (2016). ATR inhibition induces synthetic lethality and overcomes chemoresistance in TP53- or ATM-defective chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 127(5), 582–595. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-644872>
 694. Mak, J. P. Y., Man, W. Y., Chow, J. P. H., Ma, H. T., & Poon, R. Y. C. (2015). Pharmacological inactivation of CHK1 and WEE1 induces mitotic catastrophe in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(25), 21074–21084. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4020>
 695. Chen, Y., Chow, J. P. H., & Poon, R. Y. C. (2012). Inhibition of Eg5 Acts Synergistically with Checkpoint Abrogation in Promoting Mitotic Catastrophe. *Molecular Cancer Research*, 10(5), 626–635. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0491>
 696. Xie, B., Wang, S., Jiang, N., & Li, J. J. (2019). Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance. *Cancer Letters*, 443, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.11.019>

697. Nakayama, Y., & Yamaguchi, N. (2013). Role of Cyclin B1 Levels in DNA Damage and DNA Damage-Induced Senescence. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 305, pp. 303–337). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407695-2.00007-X>
698. Porter, L. A., & Donoghue, D. J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Progress in Cell Cycle Research*, 5, 335–347.
699. Crncec, A., & Hochegger, H. (2019). Triggering mitosis. *FEBS Letters*, 593(20), 2868–2888. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13635>
700. Yatskevich, S., Kroonen, J. S., Alfieri, C., Tischler, T., Howes, A. C., Clijsters, L., ... Barford, D. (2021). Molecular mechanisms of APC/C release from spindle assembly checkpoint inhibition by APC/C SUMOylation. *Cell Reports*, 34(13), 108929. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108929>
701. Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C., & Wolthuis, R. M. F. (2007). Cyclin B1–Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *PLoS Biology*, 5(5), e123. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050123>
702. Vader, G., Cruijsen, C. W. A., van Harn, T., Vromans, M. J. M., Medema, R. H., & Lens, S. M. A. (2007). The Chromosomal Passenger Complex Controls Spindle Checkpoint Function Independent from Its Role in Correcting Microtubule–Kinetochore Interactions. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), 4553–4564. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-04-0328>
703. Ghelli Luserna di Rorà, A., Martinelli, G., & Simonetti, G. (2019). The balance between mitotic death and mitotic slippage in acute leukemia: a new therapeutic window? *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0808-4>
704. Keen, N., & Taylor, S. (2009). Mitotic drivers—inhibitors of the Aurora B Kinase. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s10555-009-9184-9>
705. Topham, C. H., & Taylor, S. S. (2013). Mitosis and apoptosis: how is the balance set? *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.003>
706. Wang, F., Li, H., Yan, X.-G., Zhou, Z.-W., Yi, Z.-G., He, Z.-X., ... Zhou, S.-F. (2015). Alisertib induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR and sirtuin 1-mediated signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 575–601. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S75221>
707. Lawrence, K. S., & Engebrecht, J. (2015). The spindle assembly checkpoint: More than just keeping track of the spindle. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 10, 141–150. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27667906>
708. Bloom, C. R., & North, B. J. (2021). Physiological relevance of post-translational regulation of the spindle assembly checkpoint protein BubR1. *Cell & Bioscience*, 11(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00589-2>
709. Oikawa, T., Okuda, M., Ma, Z., Goorha, R., Tsujimoto, H., Inokuma, H., & Fukasawa, K. (2005). Transcriptional Control of BubR1 by p53 and Suppression of Centrosome Amplification by BubR1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), 4046–4061. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4046-4061.2005>

710. Schwartzman, J.-M., Duijf, P. H. G., Sotillo, R., Coker, C., & Benezra, R. (2011). Mad2 Is a Critical Mediator of the Chromosome Instability Observed upon Rb and p53 Pathway Inhibition. *Cancer Cell*, 19(6), 701–714. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.017>
711. Menssen, A., Epanchintsev, A., Lodygin, D., Rezaei, N., Jung, P., Verdoodt, B., ... Hermeking, H. (2007). c-MYC Delays Prometaphase by Direct Transactivation of MAD2 and BubR1: Identification of Mechanisms Underlying c-MYC-Induced DNA Damage and Chromosomal Instability. *Cell Cycle*, 6(3), 339–352. <https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3808>
712. Li, Y., Li, X., Pu, J., Yang, Q., Guan, H., Ji, M., ... Hou, P. (2018). c-Myc Is a Major Determinant for Antitumor Activity of Aurora A Kinase Inhibitor MLN8237 in Thyroid Cancer. *Thyroid*, 28(12), 1642–1654. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0183>
713. Jiang, J., Wang, J., Yue, M., Cai, X., Wang, T., Wu, C., ... Liu, H. (2020). Direct Phosphorylation and Stabilization of MYC by Aurora B Kinase Promote T-cell Leukemogenesis. *Cancer Cell*, 37(2), 200–215.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.01.001>
714. Sasai, K., Treekitkarnmongkol, W., Kai, K., Katayama, H., & Sen, S. (2016). Functional Significance of Aurora Kinases–p53 Protein Family Interactions in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6, 247. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00247>
715. Yang, Y., Ding, L., Zhou, Q., Fen, L., Cao, Y., Sun, J., ... Liu, A. (2020). Silencing of AURKA augments the antitumor efficacy of the AURKA inhibitor MLN8237 on neuroblastoma cells. *Cancer Cell International*, 20(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1072-y>
716. Gully, C. P., Velazquez-Torres, G., Shin, J.-H., Fuentes-Mattei, E., Wang, E., Carlock, C., ... Lee, M.-H. (2012). Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), E1513–E1522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110287109>
717. Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*, 7(3), 683–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3)
718. Haschka, M., Karbon, G., Fava, L. L., & Villunger, A. (2018). Perturbing mitosis for anti-cancer therapy: is cell death the only answer? *EMBO reports*, 19(3), e45440. <https://doi.org/10.15252/embr.201745440>
719. Skov, N., Alves, C. L., Ehmsen, S., & Ditzel, H. J. (2022). Aurora Kinase A and Bcl-xL Inhibition Suppresses Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10053. <https://doi.org/10.3390/ijms231710053>
720. Whitaker, R. H., & Placzek, W. J. (2019). Regulating the BCL2 Family to Improve Sensitivity to Microtubule Targeting Agents. *Cells*, 8(4), 346. <https://doi.org/10.3390/cells8040346>
721. Pedley, R., & Gilmore, A. P. (2016). Mitosis and mitochondrial priming for apoptosis. *Biological Chemistry*, 397(7), 595–605. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0134>
722. Chiu, W.-H., Luo, S.-J., Chen, C.-L., Cheng, J.-H., Hsieh, C.-Y., Wang, C.-Y., ... Lin, C.-F. (2012). Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 83(9), 1159–1171. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.016>

723. Gabrielli, B., Bokhari, F., Ranall, M. V., Oo, Z. Y., Stevenson, A. J., Wang, W., ... McMillan, N. A. J. (2015). Aurora A Is Critical for Survival in HPV-Transformed Cervical Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(12), 2753–2761. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0506>
724. Shaikh, M. H., Idris, A., Johnson, N. W., Fallaha, S., Clarke, D. T. W., Martin, D., ... McMillan, N. A. J. (2018). Aurora kinases are a novel therapeutic target for HPV-positive head and neck cancers. *Oral Oncology*, 86, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.09.006>
725. Phadke, M. S., Sini, P., & Smalley, K. S. M. (2015). The Novel ATP-Competitive MEK/Aurora Kinase Inhibitor BI-847325 Overcomes Acquired BRAF Inhibitor Resistance through Suppression of Mcl-1 and MEK Expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(6), 1354–1364. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0832>
726. Sun, J., Knickelbein, K., He, K., Chen, D., Dudgeon, C., Shu, Y., ... Zhang, L. (2014). Aurora Kinase Inhibition Induces PUMA via NF- κ B to Kill Colon Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1298–1308. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0846>
727. Dar, A. A., Belkhiri, A., Ecsedy, J., Zaika, A., & El-Rifai, W. (2008). Aurora Kinase A Inhibition Leads to p73-Dependent Apoptosis in p53-Deficient Cancer Cells. *Cancer Research*, 68(21), 8998–9004. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2658>
728. Shuang, W., Hou, L., Zhu, Y., Li, Q., & Hu, W. (2017). Mcl-1 stabilization confers resistance to taxol in human gastric cancer. *Oncotarget*, 8(47), 82981–82990. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20222>
729. Li, J., Chen, C.-H., O'Neill, K. L., Fousek-Schuller, V. J., Black, A. R., Black, J. D., ... Luo, X. (2023). Combined inhibition of aurora kinases and Bcl-xL induces apoptosis through select BH3-only proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 299(2), 102875. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102875>
730. Tanimoto, A., Della Corte, C. M., Ramkumar, K., Cardnell, R. J., Stewart, A. C., Gay, C. M., ... Travers, J. (2021). Abstract P079: The impact of BCL2 expression on sensitivity to the novel Aurora kinase B inhibitor AZD2811 in small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(12_Supplement), P079. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-21-P079>
731. Lee, S. T., Lee, J. Y., Han, C. R., Kim, Y. H., Jun, D. Y., Taub, D., & Kim, Y. H. (2015). Dependency of 2-methoxyestradiol-induced mitochondrial apoptosis on mitotic spindle network impairment and prometaphase arrest in human Jurkat T cells. *Biochemical Pharmacology*, 94(4), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.011>
732. Han, C. R., Jun, D. Y., Kim, Y. H., Lee, J. Y., & Kim, Y. H. (2013). Prometaphase arrest-dependent phosphorylation of Bcl-2 family proteins and activation of mitochondrial apoptotic pathway are associated with 17 α -estradiol-induced apoptosis in human Jurkat T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(10), 2220–2232. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.016>
733. Kollareddy, M., Zheleva, D., Džubák, P., Srovnal, J., Radová, L., Doležal, D., ... Hajdúch, M. (2020). Identification and characterization of drug resistance mechanisms in cancer cells against Aurora kinase inhibitors CYC116 and ZM447439. *bioRxiv*, 2020.08.26.268128. <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268128>

734. Wang, C., Huang, S.-B., Yang, M.-C., Lin, Y.-T., Chu, I.-H., Shen, Y.-N., ... Chen, C.-H. (2015). Combining Paclitaxel with ABT-263 Has a Synergistic Effect on Paclitaxel Resistant Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, 10(3), e0120913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120913>
735. Minn, A., Rudin, C., Boise, L., & Thompson, C. (1995). Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*, 86(5), 1903–1910. <https://doi.org/10.1182/blood.V86.5.1903.bloodjournal8651903>
736. Pühr, M., Hoefer, J., Neuwirt, H., Eder, I. E., Kern, J., Schäfer, G., ... Culig, Z. (2014). PIAS1 is a crucial factor for prostate cancer cell survival and a valid target in docetaxel resistant cells. *Oncotarget*, 5(23), 12043–12056. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2658>
737. Salerni, B. L., Bates, D. J., Albershardt, T. C., Lowrey, C. H., & Eastman, A. (2010). Vinblastine Induces Acute, Cell Cycle Phase-Independent Apoptosis in Some Leukemias and Lymphomas and Can Induce Acute Apoptosis in Others when Mcl-1 Is Suppressed. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(4), 791–802. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0028>
738. Mhaidat, N. M., Wang, Y., Kiejda, K. A., Zhang, X. D., & Hersey, P. (2007). Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(2), 752–761. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0564>
739. Zhang, X. D., Wang, P., Mhaidat, N., Gillespie, S., & Hersey, P. (2006). Antimicrotubule agent-induced activation of ERK1/2 protects human melanoma cells from apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase. *Cancer Research*, 66(8_Supplement), 324.
740. Zhu, B., Wang, P., Zhang, X. D., Jiang, C. C., Chen, L. H., Avery-Kiejda, K. A., ... Hersey, P. (2008). Activation of Jun N-terminal kinase is a mediator of vincristine-induced apoptosis of melanoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 19(2), 189–200. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3282f3138a>
741. Savry, A., Carre, M., Berges, R., Rovini, A., Pobel, I., Chacon, C., ... Bourgarel-Rey, V. (2013). Bcl-2—Enhanced Efficacy of Microtubule-Targeting Chemotherapy through Bim Overexpression: Implications for Cancer Treatment. *Neoplasia*, 15(1), 49–60. <https://doi.org/10.1593/neo.121074>
742. Craik, A. C., Veldhoen, R. A., Czernick, M., Buckland, T. W., Kyselytzia, K., Ghosh, S., ... Goping, I. S. (2010). The BH3-only protein Bad confers breast cancer taxane sensitivity through a nonapoptotic mechanism. *Oncogene*, 29(39), 5381–5391. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.272>
743. Mann, J., Yang, N., Montpetit, R., Kirschenman, R., Lemieux, H., & Goping, I. S. (2020). BAD sensitizes breast cancer cells to docetaxel with increased mitotic arrest and necroptosis. *Scientific Reports*, 10(1), 355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57282-1>
744. Ogura, T., Tanaka, Y., Tamaki, H., & Harada, M. (2016). Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2330–2338. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3482>
745. Moustafa-Kamal, M., Gamache, I., Lu, Y., Li, S., & Teodoro, J. G. (2013). BimEL is phosphorylated at mitosis by Aurora A and targeted for degradation by β TrCP1. *Cell Death & Differentiation*, 20(10), 1393–1403. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.93>

746. Sak, M., Williams, B. J., Zumbar, C. T., Teer, L., Al-Kawaaz, M. N. G., Kakar, A., ... Lehman, N. L. (2023). The CNS-penetrating taxane drug TPI 287 potentiates antiglioma activity of the AURKA inhibitor alisertib in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 91(2), 191–201. <https://doi.org/10.1007/s00280-023-04503-0>
747. Dai, Y., Chen, S., Venditti, C. A., Pei, X.-Y., Nguyen, T. K., Dent, P., & Grant, S. (2008). Vorinostat synergistically potentiates MK-0457 lethality in chronic myelogenous leukemia cells sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Blood*, 112(3), 793–804. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-116376>
748. Knickelbein, K., Tong, J., Chen, D., Wang, Y.-J., Misale, S., Bardelli, A., ... Zhang, L. (2018). Restoring PUMA induction overcomes KRAS-mediated resistance to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. *Oncogene*, 37(33), 4599–4610. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0289-x>
749. Kutuk, O., & Letai, A. (2008). Alteration of the Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Key to Acquired Paclitaxel Resistance and Can Be Reversed by ABT-737. *Cancer Research*, 68(19), 7985–7994. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1418>
750. Groth-Pedersen, L., Ostensfeld, M. S., Høyer-Hansen, M., Nylandsted, J., & Jäättelä, M. (2007). Vincristine Induces Dramatic Lysosomal Changes and Sensitizes Cancer Cells to Lysosome-Destabilizing Siramesine. *Cancer Research*, 67(5), 2217–2225. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3520>
751. Li, M., Jung, A., Ganswindt, U., Marini, P., Friedl, A., Daniel, P. T., ... Belka, C. (2010). Aurora kinase inhibitor ZM447439 induces apoptosis via mitochondrial pathways. *Biochemical Pharmacology*, 79(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.011>
752. Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., ... Dixit, V. M. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 471(7336), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature09779>
753. Upreti, M., Chu, R., Galitovskaya, E., Smart, S. K., & Chambers, T. C. (2008). Key role for Bak activation and Bak-Bax interaction in the apoptotic response to vinblastine. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 2224–2232. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2299>
754. Liu, D., Hou, X., Wu, W., Zanfagnin, V., Li, Y., Correia, C., ... Dai, H. (2021). Constitutive BAK/MCL1 complexes predict paclitaxel and S63845 sensitivity of ovarian cancer. *Cell Death & Disease*, 12(8), 789. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04073-0>
755. Ieranò, C., Chakraborty, A., Nicolae, A., Bahr, J., Zhan, Z., Pittaluga, S., ... Robey, R. (2013). Loss of the proteins Bak and Bax prevents apoptosis mediated by histone deacetylase inhibitors. *Cell Cycle*, 12(17), 2829–2838. <https://doi.org/10.4161/cc.25914>
756. 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 & Disease*, 11(11), 941. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03144-y>
757. Fairlie, W. D., & Lee, E. F. (2021). Targeting the BCL-2-regulated apoptotic pathway for the treatment of solid cancers. *Biochemical Society Transactions*, 49(5), 2397–2410. <https://doi.org/10.1042/BST20210750>
758. Wong, M., Tan, N., Zha, J., Peale, F. V., Yue, P., Fairbrother, W. J., & Belmont, L. D. (2012). Navitoclax (ABT-263) Reduces Bcl-xL-Mediated Chemoresistance in Ovarian

- Cancer Models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(4), 1026–1035. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0693>
759. Chu, R., Terrano, D. T., & Chambers, T. C. (2012). Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration. *Biochemical Pharmacology*, 83(2), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.10.008>
 760. Maji, S., Shriwas, O., Samal, S. K., Priyadarshini, M., Rath, R., Panda, S., ... Dash, R. (2019). STAT3- and GSK3 β -mediated Mcl-1 regulation modulates TPF resistance in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 40(1), 173–183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy135>
 761. Belhoussine, R., Morjani, H., Gillet, R., Palissot, V., & Manfait, M. (1999). Two Distinct Modes of Oncoprotein Expression During Apoptosis Resistance in Vincristine and Daunorubicin Multidrug-Resistant HL60 Cells. In *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 457, pp. 365–381). Boston: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4811-9_39
 762. Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Distefano, M., Filippetti, F., Martinelli, E., ... Scambia, G. (2003). Bcl-2 Down-Regulation Is a Novel Mechanism of Paclitaxel Resistance. *Molecular Pharmacology*, 64(1), 51–58. <https://doi.org/10.1124/mol.64.1.51>
 763. Inoue, Y., Gika, M., Abiko, T., Oyama, T., Saitoh, Y., Yamazaki, H., ... Kobayashi, K. (2005). Bcl-2 overexpression enhances in vitro sensitivity against docetaxel in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 13(2), 259–264.
 764. Del Bufalo, D., Biroccio, A., Trisciuglio, D., Bruno, T., Floridi, A., Aquino, A., & Zupi, G. (2002). Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *European Journal of Cancer*, 38(18), 2455–2462. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00391-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00391-X)
 765. Estève, M.-A., Carré, M., Bourgarel-Rey, V., Kruczynski, A., Raspaglio, G., Ferlini, C., & Braguer, D. (2006). Bcl-2 down-regulation and tubulin subtype composition are involved in resistance of ovarian cancer cells to vinflunine. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2824–2833. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0277>
 766. Liu, L.-L., Long, Z.-J., Wang, L.-X., Zheng, F.-M., Fang, Z.-G., Yan, M., ... Liu, Q. (2013). Inhibition of mTOR Pathway Sensitizes Acute Myeloid Leukemia Cells to Aurora Inhibitors by Suppression of Glycolytic Metabolism. *Molecular Cancer Research*, 11(11), 1326–1336. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0172>
 767. Carlos, J. A. E. G., Lima, K., Coelho-Silva, J. L., de Melo Alves-Paiva, R., Moreno, N. C., Vicari, H. P., ... Machado-Neto, J. A. (2020). Reversine exerts cytotoxic effects through multiple cell death mechanisms in acute lymphoblastic leukemia. *Cellular Oncology*, 43(6), 1191–1201. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00551-3>
 768. He, S.-J., Shu, L.-P., Zhou, Z.-W., Yang, T., Duan, W., Zhang, X., ... Zhou, S.-F. (2016). Inhibition of Aurora kinases induces apoptosis and autophagy via AURKB/p70S6K/RPL15 axis in human leukemia cells. *Cancer Letters*, 382(2), 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.016>
 769. Shu, L.-P., Zhou, Z.-W., Zi, D., He, Z.-X., & Zhou, S.-F. (2015). A SILAC-based proteomics elicits the molecular interactome of alisertib (MLN8237) in human

- erythroleukemia K562 cells. *American Journal of Translational Research*, 7(11), 2442–2461.
770. Yang, D., Liu, H., Goga, A., Kim, S., Yuneva, M., & Bishop, J. M. (2010). Therapeutic potential of a synthetic lethal interaction between the *MYC* proto-oncogene and inhibition of aurora-B kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13836–13841. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008366107>
 771. Deng, J., Gutiérrez, L. G., Stoll, G., Motiño, O., Martins, I., Núñez, L., ... Senovilla, L. (2021). Paradoxical implication of BAX/BAK in the persistence of tetraploid cells. *Cell Death & Disease*, 12(11), 1039. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04321-3>
 772. Liu, Y., Hawkins, O. E., Su, Y., Vilgelm, A. E., Sobolik, T., Thu, Y.-M., ... Richmond, A. (2013). Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF- κ B impairs this drug-induced senescence. *EMBO Molecular Medicine*, 5(1), 149–166. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201378>
 773. Oke, A., Pearce, D., Wilkinson, R. W., Crafter, C., Odedra, R., Cavenagh, J., ... Bonnet, D. (2009). AZD1152 Rapidly and Negatively Affects the Growth and Survival of Human Acute Myeloid Leukemia Cells *In vitro* and *In vivo*. *Cancer Research*, 69(10), 4150–4158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3203>
 774. Bonet, C., Giuliano, S., Ohanna, M., Bille, K., Allegra, M., Lacour, J.-P., ... Bertolotto, C. (2012). Aurora B Is Regulated by the Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (MAPK/ERK) Signaling Pathway and Is a Valuable Potential Target in Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29887–29898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371682>
 775. Bertran-Alamillo, J., Cattan, V., Schoumacher, M., Codony-Servat, J., Giménez-Capitán, A., Cantero, F., ... Molina-Vila, M.-A. (2019). AURKB as a target in non-small cell lung cancer with acquired resistance to anti-EGFR therapy. *Nature Communications*, 10(1), 1812. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09734-5>
 776. Koo, S., Won, M., Li, H., Kim, W. Y., Li, M., Yan, C., ... Kim, J. S. (2021). Harnessing α -L-fucosidase for *in vivo* cellular senescence imaging. *Chemical Science*, 12(29), 10054–10062. <https://doi.org/10.1039/D1SC02259H>
 777. Wang, L.-X., Wang, J.-D., Chen, J.-J., Long, B., Liu, L.-L., Tu, X.-X., ... Liu, Q. (2016). Aurora A Kinase Inhibitor AKI603 Induces Cellular Senescence in Chronic Myeloid Leukemia Cells Harboring T315I Mutation. *Scientific Reports*, 6(1), 35533. <https://doi.org/10.1038/srep35533>
 778. Gürtler, U., Tontsch-Grunt, U., Jarvis, M., Zahn, S. K., Boehmelt, G., Quant, J., ... Solca, F. (2010). Effect of BI 811283, a novel inhibitor of Aurora B kinase, on tumor senescence and apoptosis. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15_suppl), e13632. https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.e13632
 779. Huck, J. J., Zhang, M., McDonald, A., Bowman, D., Hoar, K. M., Stringer, B., ... Hyer, M. L. (2010). MLN8054, an Inhibitor of Aurora A Kinase, Induces Senescence in Human Tumor Cells Both *In vitro* and *In vivo*. *Molecular Cancer Research*, 8(3), 373–384. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0300>

780. Yin, S., Yang, S., Luo, Y., Lu, J., Hu, G., Wang, K., ... Yu, H. (2021). Cyclin-dependent kinase 1 as a potential target for lycorine against hepatocellular carcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 193, 114806. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114806>
781. M. Serafim, R. A., da Silva Santiago, A., Schwalm, M. P., Hu, Z., dos Reis, C. V., Takarada, J. E., ... Gehringer, M. (2022). Development of the First Covalent Monopolar Spindle Kinase 1 (MPS1/TTK) Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(4), 3173–3192. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01165>
782. Nakai, R., Iida, S., Takahashi, T., Tsujita, T., Okamoto, S., Takada, C., ... Yamashita, Y. (2009). K858, a Novel Inhibitor of Mitotic Kinesin Eg5 and Antitumor Agent, Induces Cell Death in Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(9), 3901–3909. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4373>
783. Volonte, D., Sedorovitz, M., & Galbiati, F. (2022). Impaired Cdc20 signaling promotes senescence in normal cells and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 298(10), 102405. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102405>
784. Paller, C. J., Wissing, M. D., Mendonca, J., Sharma, A., Kim, E., Kim, H., ... Kachhap, S. K. (2014). Combining the pan-aurora kinase inhibitor AMG 900 with histone deacetylase inhibitors enhances antitumor activity in prostate cancer. *Cancer Medicine*, 3(5), 1322–1335. <https://doi.org/10.1002/cam4.289>
785. Kroemer, G., & Martin, S. J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nature Medicine*, 11(7), 725–730. <https://doi.org/10.1038/nm1263>
786. Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
787. Walsh, J. G., Cullen, S. P., Sheridan, C., Lüthi, A. U., Gerner, C., & Martin, S. J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(35), 12815–12819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707715105>
788. Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>
789. Wang, X., Sinn, A. L., Pollok, K., Sandusky, G., Zhang, S., Chen, L., ... Farag, S. S. (2010). Preclinical activity of a novel multiple tyrosine kinase and aurora kinase inhibitor, ENMD-2076, against multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 150(3), 313–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08248.x>
790. Huang, X.-F., Luo, S.-K., Xu, J., Li, J., Xu, D.-R., Wang, L.-H., ... Liu, Q. (2008). Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(5), 2854–2865. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099325>
791. Georgieva, I., Koychev, D., Wang, Y., Holstein, J., Hopfenmüller, W., Zeitz, M., & Grabowski, P. (2010). ZM447439, a Novel Promising Aurora Kinase Inhibitor, Provokes Antiproliferative and Proapoptotic Effects Alone and in Combination with Bio- and Chemotherapeutic Agents in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumor Cell Lines. *Neuroendocrinology*, 91(2), 121–130. <https://doi.org/10.1159/000258705>

792. Bogen, D., Wei, J. S., Azorsa, D. O., Ormanoglu, P., Buehler, E., Guha, R., ... Khan, J. (2015). Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma. *Oncotarget*, 6(34), 35247–35262. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6208>
793. Lee, P.-Y., Chen, C.-L., Lin, Z.-Z., Cheng, A.-L., Chen, E. I.-T., Whang-Peng, J., & Huang, C.-Y. F. (2013). The Aurora Kinases Inhibitor VE-465 is a Novel Treatment for Glioblastoma Multiforme. *Oncology*, 84(6), 326–335. <https://doi.org/10.1159/000347021>
794. Xie, Y., Zhu, S., Zhong, M., Yang, M., Sun, X., Liu, J., ... Tang, D. (2017). Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. *Gastroenterology*, 153(5), 1429-1443.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.036>
795. Lamy, L., Ngo, V. N., Emre, N. C. T., Shaffer, A. L., Yang, Y., Tian, E., ... Staudt, L. M. (2013). Control of Autophagic Cell Death by Caspase-10 in Multiple Myeloma. *Cancer Cell*, 23(4), 435–449. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.017>
796. Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., ... Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7 - beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science*, 304(5676), 1500–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1096645>
797. Eskandari, E., & Eaves, C. J. (2022). Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *Journal of Cell Biology*, 221(6), e202201159. <https://doi.org/10.1083/jcb.202201159>
798. Schwarzer, R., Laurien, L., & Pasparakis, M. (2020). New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.004>
799. Ketelut-Carneiro, N., & Fitzgerald, K. A. (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *Journal of Molecular Biology*, 434(4), 167378. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>
800. Peng, F., Liao, M., Qin, R., Zhu, S., Peng, C., Fu, L., ... Han, B. (2022). Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 286. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01110-y>
801. Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., ... Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>
802. Liang, J., He, Y., Cui, Y., Sun, Y., He, G., Zhu, Z., & Mao, X. (2023). Proteasomal inhibitors induce myeloma cell pyroptosis via the BAX/GSDME pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 44(7), 1464–1474. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01060-3>
803. He, Y., Jiang, S., Cui, Y., Liang, J., Zhong, Y., Sun, Y., ... Mao, X. (2023). The Interferon-Inducible Genes IFIT1 and IFIT3 are Essential for Clotrimazole-Induced Pyroptosis in Myeloma and Leukemia Cells by Promoting N-Terminal GSDME Translocation to Mitochondria. Available at SSRN. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4613653>
804. Gaikwad, S. M., Phyo, Z., Arteaga, A. Q., Gorjifard, S., Calabrese, D. R., Connors, D., ... Mock, B. A. (2020). A Small Molecule Stabilizer of the MYC G4-Quadruplex Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Senescence and Pyroptosis in Multiple Myeloma. *Cancers*, 12(10), 2952. <https://doi.org/10.3390/cancers12102952>

805. Zhang, C., Wu, S., & Chen, B. (2023). A novel prognostic model based on pyroptosis-related genes for multiple myeloma. *BMC Medical Genomics*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12920-023-01455-5>
806. Li, C., Liang, H., Bian, S., Hou, X., & Ma, Y. (2022). Construction of a Prognosis Model of the Pyroptosis-Related Gene in Multiple Myeloma and Screening of Core Genes. *ACS Omega*, 7(38), 34608–34620. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04212>
807. Lim, Y., De Bellis, D., Sandow, J. J., Capalbo, L., D'Avino, P. P., Murphy, J. M., ... Kumar, S. (2021). Phosphorylation by Aurora B kinase regulates caspase-2 activity and function. *Cell Death & Differentiation*, 28(1), 349–366. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00604-y>
808. Mohan, J., Gandhi, A. A., Bhavya, B. C., Rashmi, R., Karunagaran, D., Indu, R., & Santhoshkumar, T. R. (2006). Caspase-2 Triggers Bax-Bak-dependent and -independent Cell Death in Colon Cancer Cells Treated with Resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17599–17611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602641200>
809. Chauvier, D., Ankri, S., Charriaut-Marlangue, C., Casimir, R., & Jacotot, E. (2007). Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death & Differentiation*, 14(2), 387–391. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402044>
810. Wang, G.-F., Dong, Q., Bai, Y., Yuan, J., Xu, Q., Cao, C., & Liu, X. (2017). Oxidative stress induces mitotic arrest by inhibiting Aurora A-involved mitotic spindle formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.031>
811. Lee, D. H., Kim, C. G., Lim, Y., & Shin, S. Y. (2017). Aurora kinase A inhibitor TCS7010 demonstrates pro-apoptotic effect through the unfolded protein response pathway in HCT116 colon cancer cells. *Oncology Letters*, 14(6), 6571–6577. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7023>
812. Zekri, A., Mesbahi, Y., Ghanizadeh-Vesali, S., Alimoghaddam, K., Ghavamzadeh, A., & Ghaffari, S. H. (2017). Reactive oxygen species generation and increase in mitochondrial copy number: new insight into the potential mechanism of cytotoxicity induced by aurora kinase inhibitor, AZD1152-HQPA. *Anti-Cancer Drugs*, 28(8), 841–851. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000523>
813. Patterson, J. C., Joughin, B. A., van de Kooij, B., Lim, D. C., Lauffenburger, D. A., & Yaffe, M. B. (2019). ROS and Oxidative Stress Are Elevated in Mitosis during Asynchronous Cell Cycle Progression and Are Exacerbated by Mitotic Arrest. *Cell Systems*, 8(2), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.01.005>
814. Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2017). The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 79–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808>
815. Ribas, V., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 151. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151>
816. Booth, D. M., Murphy, J. A., Mukherjee, R., Awais, M., Neoptolemos, J. P., Gerasimenko, O. V., ... Criddle, D. N. (2011). Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce

- Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology*, 140(7), 2116–2125. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.054>
817. Shin, H.-J., Kwon, H.-K., Lee, J.-H., Anwar, M. A., & Choi, S. (2016). Etoposide induced cytotoxicity mediated by ROS and ERK in human kidney proximal tubule cells. *Scientific Reports*, 6(1), 34064. <https://doi.org/10.1038/srep34064>
818. Zhang, S., Liu, Q., Chang, M., Pan, Y., Yahaya, B. H., Liu, Y., & Lin, J. (2023). Chemotherapy impairs ovarian function through excessive ROS-induced ferroptosis. *Cell Death & Disease*, 14(5), 340. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05859-0>
819. Troyano, A., Fernández, C., Sancho, P., de Blas, E., & Aller, P. (2001). Effect of Glutathione Depletion on Antitumor Drug Toxicity (Apoptosis and Necrosis) in U-937 Human Promonocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47107–47115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104516200>
820. Sun, Y., Zheng, Y., Wang, C., & Liu, Y. (2018). Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death & Disease*, 9(7), 753. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0794-4>
821. Corrado, C., Raimondo, S., Flugy, A. M., Fontana, S., Santoro, A., Stassi, G., ... Alessandro, R. (2011). Carboxyamidotriazole inhibits cell growth of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells including T315I Bcr–Abl mutant by a redox-mediated mechanism. *Cancer Letters*, 300(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.007>
822. Okabe, S., Tauchi, T., Tanaka, Y., & Ohyashiki, K. (2018). Therapeutic targeting of Aurora A kinase in Philadelphia chromosome-positive ABL tyrosine kinase inhibitor-resistant cells. *Oncotarget*, 9(65), 32496–32506. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25985>
823. Shaalan, A. K., Teshima, T. H. N., Tucker, A. S., & Proctor, G. B. (2021). Inhibition of Aurora Kinase B activity disrupts development and differentiation of salivary glands. *Cell Death Discovery*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00393-w>
824. Jane, E. P., Premkumar, D. R., Rajasundaram, D., Thambireddy, S., Reslink, M. C., Agnihotri, S., & Pollack, I. F. (2022). Reversing tozasertib resistance in glioma through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinases. *Molecular Oncology*, 16(1), 219–249. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13025>
825. Ramanathan, B., Jan, K.-Y., Chen, C.-H., Hour, T.-C., Yu, H.-J., & Pu, Y.-S. (2005). Resistance to Paclitaxel Is Proportional to Cellular Total Antioxidant Capacity. *Cancer Research*, 65(18), 8455–8460. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1162>
826. Bertolin, G., & Tramier, M. (2020). Insights into the non-mitotic functions of Aurora kinase A: more than just cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(6), 1031–1047. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03310-2>
827. Grant, R., Abdelbaki, A., Bertoldi, A., Gavilan, M. P., Mansfeld, J., Glover, D. M., & Lindon, C. (2018). Constitutive regulation of mitochondrial morphology by Aurora A kinase depends on a predicted cryptic targeting sequence at the N-terminus. *Open Biology*, 8(6), 170272. <https://doi.org/10.1098/rsob.170272>

828. Kashatus, D. F., Lim, K.-H., Brady, D. C., Pershing, N. L. K., Cox, A. D., & Counter, C. M. (2011). RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1108–1115. <https://doi.org/10.1038/ncb2310>
829. Shlevkov, E., Basu, H., Bray, M.-A., Sun, Z., Wei, W., Apaydin, K., ... Schwarz, T. L. (2019). A High-Content Screen Identifies TPP1 and Aurora B as Regulators of Axonal Mitochondrial Transport. *Cell Reports*, 28(12), 3224–3237.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.035>
830. Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
831. Mori, N., Ishikawa, C., Senba, M., Kimura, M., & Okano, Y. (2011). Effects of AZD1152, a selective Aurora B kinase inhibitor, on Burkitt's and Hodgkin's lymphomas. *Biochemical Pharmacology*, 81(9), 1106–1115. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.02.010>
832. Nguyen, T. T. T., Shang, E., Shu, C., Kim, S., Mela, A., Humala, N., ... Siegelin, M. D. (2021). Aurora kinase A inhibition reverses the Warburg effect and elicits unique metabolic vulnerabilities in glioblastoma. *Nature Communications*, 12(1), 5203. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25501-x>
833. Lee, J. Y., Ahn, S. S., Jeong, Y. J., Choi, J., Ahn, S., Koh, D., ... Shin, S. Y. (2020). A Synthetic Pan-Aurora Kinase Inhibitor, 5-Methoxy-2-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-4H-chromen-4-one, Triggers Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis in HCT116 Colon Cancer Cells. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/3025281>
834. Baisch, H., Bollmann, H., & Bornkessel, S. (1999). Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. *Cell Proliferation*, 32(5), 303–319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.1999.3250303.x>
835. Matsuyama, S., & Reed, J. C. (2000). Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death & Differentiation*, 7(12), 1155–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400779>
836. Nguyen, C., & Pandey, S. (2019). Exploiting Mitochondrial Vulnerabilities to Trigger Apoptosis Selectively in Cancer Cells. *Cancers*, 11(7), 916. <https://doi.org/10.3390/cancers11070916>
837. Lim, J. S. L., Chong, P. S. Y., & Chng, W.-J. (2022). Metabolic Vulnerabilities in Multiple Myeloma. *Cancers*, 14(8), 1905. <https://doi.org/10.3390/cancers14081905>
838. Rizzieri, D., Paul, B., & Kang, Y. (2019). Metabolic alterations and the potential for targeting metabolic pathways in the treatment of multiple myeloma. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 5, 26. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2019.05>
839. Tiersma, J. F., Evers, B., Bakker, B. M., Jalving, M., & de Jong, S. (2022). Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibition by Dichloroacetate in Melanoma Cells Unveils Metabolic Vulnerabilities. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3745. <https://doi.org/10.3390/ijms23073745>

840. Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
841. Iizuka, K. (2019). The Role of Carbohydrate Response Element–Binding Protein in the Development of Liver Diseases. In *Dietary Interventions in Liver Disease* (pp. 263–274). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814466-4.00022-7>
842. Fujiwara, S., Kawano, Y., Yuki, H., Okuno, Y., Nosaka, K., Mitsuya, H., & Hata, H. (2013). PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *British Journal of Cancer*, 108(1), 170–178. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.527>
843. Sanchez, W. Y., McGee, S. L., Connor, T., Mottram, B., Wilkinson, A., Whitehead, J. P., ... Catley, L. (2013). Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *British Journal of Cancer*, 108(8), 1624–1633. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.120>
844. Sharma, R. K., Chafik, A., & Bertolin, G. (2023). Aurora kinase A/AURKA interacts with the mitochondrial ATP synthase to regulate energy metabolism and cell death. *bioRxiv*, 2023.02.02.526754. <https://doi.org/10.1101/2023.02.02.526754>
845. Dominy, J. E., & Puigserver, P. (2013). Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a015008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015008>
846. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
847. Mailloux, R. J. (2020). An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants*, 9(6), 472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>
848. Mazat, J.-P., Devin, A., & Ransac, S. (2020). Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(3), 455–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03381-1>
849. Kowalczyk, P., Sulejczak, D., Kleczkowska, P., Bukowska-Ośko, I., Kucia, M., Popiel, M., ... Kaczyńska, K. (2021). Mitochondrial Oxidative Stress—A Causative Factor and Therapeutic Target in Many Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13384. <https://doi.org/10.3390/ijms222413384>
850. Hernansanz-Agustín, P., & Enríquez, J. A. (2021). Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants*, 10(3), 415. <https://doi.org/10.3390/antiox10030415>
851. Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
852. Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., ... Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report*, 27(1), 45–52. <https://doi.org/10.1080/13510002.2022.2046423>
853. Demirel, Y. (2002). Thermodynamics and biological systems. In *Nonequilibrium Thermodynamics* (pp. 293–355). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044450886-7/50012-6>

854. Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 292. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00292>
855. Zhang, Z., Zeng, D., Zhang, W., Chen, A., Lei, J., Liu, F., ... Wang, Z. (2021). Modulation of oxidative phosphorylation augments antineoplastic activity of mitotic aurora kinase inhibition. *Cell Death & Disease*, 12(10), 893. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04190-w>
856. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
857. Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science*, 112(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
858. Sun, S., Han, Y., Liu, J., Fang, Y., Tian, Y., Zhou, J., ... Wu, P. (2014). Trichostatin A Targets the Mitochondrial Respiratory Chain, Increasing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production to Trigger Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(3), e91610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091610>
859. Cao, Y., Wang, J., Tian, H., & Fu, G.-H. (2020). Mitochondrial ROS accumulation inhibiting JAK2/STAT3 pathway is a critical modulator of CYT997-induced autophagy and apoptosis in gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01621-y>
860. Xue, C., Gu, X., Li, G., Bao, Z., & Li, L. (2021). Mitochondrial Mechanisms of Necroptosis in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms22010066>
861. Lv, Y., Shao, G., Zhang, Q., Wang, X., Meng, Y., Wang, L., ... Fu, C. (2019). The antimicrobial peptide PFR induces necroptosis mediated by ER stress and elevated cytoplasmic calcium and mitochondrial ROS levels: cooperation with Ara-C to act against acute myeloid leukemia. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0073-6>
862. Zhong, H., Song, R., Pang, Q., Liu, Y., Zhuang, J., Chen, Y., ... Tang, J. (2018). Propofol inhibits parthanatos via ROS–ER–calcium–mitochondria signal pathway in vivo and vitro. *Cell Death & Disease*, 9(10), 932. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0996-9>
863. Payne, B. A. I., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(11), 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.022>
864. Stefanatos, R., & Sanz, A. (2018). The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Letters*, 592(5), 743–758. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12902>
865. Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 592(5), 692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
866. Yadav, N., Kumar, S., Marlowe, T., Chaudhary, A. K., Kumar, R., Wang, J., ... Chandra, D. (2015). Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell Death & Disease*, 6(11), e1969. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.305>

867. Sundqvist, M., Christenson, K., Björnsdóttir, H., Osla, V., Karlsson, A., Dahlgren, C., ... Bylund, J. (2017). Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Redox Imbalance in Human NADPH-Oxidase-Deficient Phagocytes. *Frontiers in Immunology*, 8, 1828. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01828>
868. Roh, M., van der Meer, R., & Abdulkadir, S. A. (2012). Tumorigenic polyploid cells contain elevated ROS and ARE selectively targeted by antioxidant treatment. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 801–812. <https://doi.org/10.1002/jcp.22793>
869. Suski, J., Lebiezinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., & Wieckowski, M. R. (2018). Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS Formation. In C. Palmeira & A. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1782, pp. 357–381). New York: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_22
870. Lugli, E., Troiano, L., Ferraresi, R., Roat, E., Prada, N., Nasi, M., ... Cossarizza, A. (2005). Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry Part A*, 68A(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20188>
871. Sugrue, M. M., & Tatton, W. G. (2001). Mitochondrial Membrane Potential in Aging Cells. *Biological Signals and Receptors*, 10(3–4), 176–188. <https://doi.org/10.1159/000046886>
872. Zou, R., Tao, J., Qiu, J., Shi, W., Zou, M., Chen, W., ... Chen, X. (2021). Ndufs1 Deficiency Aggravates the Mitochondrial Membrane Potential Dysfunction in Pressure Overload-Induced Myocardial Hypertrophy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2021/5545261>
873. Gollapudi, S., McCormick, M. J., & Gupta, S. (2003). Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass occur independent of the activation of caspase-8 and caspase-3 during CD95-mediated apoptosis in peripheral blood T cells. *International Journal of Oncology*, 22(3), 597–600. <https://doi.org/10.3892/ijo.22.3.597>
874. Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., ... Sarry, J.-E. (2017). Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery*, 7(7), 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
875. Mani, S., Swargiary, G., & Singh, K. K. (2020). Natural Agents Targeting Mitochondria in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 6992. <https://doi.org/10.3390/ijms21196992>
876. Liu, X., Li, M., Chen, Z., Yu, Y., Shi, H., Yu, Y., ... Ge, J. (2022). Mitochondrial calpain-1 activates NLRP3 inflammasome by cleaving ATP5A1 and inducing mitochondrial ROS in CVB3-induced myocarditis. *Basic Research in Cardiology*, 117(1), 40. <https://doi.org/10.1007/s00395-022-00948-1>
877. Miriyala, S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, D., Vujaskovic, Z., St. Clair, D., & Batinic-Haberle, I. (2012). Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 794–814. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.002>

878. Filograna, R., Mennuni, M., Alsina, D., & Larsson, N. (2021). Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Letters*, 595(8), 976–1002. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14021>
879. Singh, K. K., Russell, J., Sigala, B., Zhang, Y., Williams, J., & Keshav, K. F. (1999). Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene*, 18(48), 6641–6646. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203056>
880. Vancura, A., Bu, P., Bhagwat, M., Zeng, J., & Vancurova, I. (2018). Metformin as an Anticancer Agent. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(10), 867–878. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.006>
881. Tataranni, T., Agriesti, F., Pacelli, C., Ruggieri, V., Laurenzana, I., Mazzoccoli, C., ... Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cells*, 8(5), 478. <https://doi.org/10.3390/cells8050478>
882. Stockwin, L. H., Yu, S. X., Borgel, S., Hancock, C., Wolfe, T. L., Phillips, L. R., ... Newton, D. L. (2010). Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *International Journal of Cancer*, 127(11), 2510–2519. <https://doi.org/10.1002/ijc.25499>
883. Queiroz, E. A. I. F., Puukila, S., Eichler, R., Sampaio, S. C., Forsyth, H. L., Lees, S. J., ... Khaper, N. (2014). Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(5), e98207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098207>
884. Warkad, M. S., Kim, C.-H., Kang, B.-G., Park, S.-H., Jung, J.-S., Feng, J.-H., ... Lee, J.-Y. (2021). Metformin-induced ROS upregulation as amplified by apigenin causes profound anticancer activity while sparing normal cells. *Scientific Reports*, 11(1), 14002. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93270-0>
885. Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., ... Michelakis, E. D. (2007). A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*, 11(1), 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.020>
886. Ward, N. P., Poff, A. M., Koutnik, A. P., & D'Agostino, D. P. (2017). Complex I inhibition augments dichloroacetate cytotoxicity through enhancing oxidative stress in VM-M3 glioblastoma cells. *PLOS ONE*, 12(6), e0180061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180061>
887. Wang, Z., Litterio, M. C., Müller, M., Vauzour, D., & Oteiza, P. I. (2020). (-)-Epicatechin and NADPH oxidase inhibitors prevent bile acid-induced Caco-2 monolayer permeabilization through ERK1/2 modulation. *Redox Biology*, 28, 101360. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101360>
888. Choi, Y. W., & Lim, I. K. (2014). Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells. *Cancer Letters*, 346(2), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.015>
889. Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2020). Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria

- and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biology*, 34, 101517. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>
890. Vial, G., Demaille, D., & Guigas, B. (2019). Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 294. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00294>
 891. Kim, K. H., Jeong, Y. T., Kim, S. H., Jung, H. S., Park, K. S., Lee, H.-Y., & Lee, M.-S. (2013). Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.026>
 892. Kajiwar, C., Kusaka, Y., Kimura, S., Yamaguchi, T., Nanjo, Y., Ishii, Y., ... Tateda, K. (2018). Metformin Mediates Protection against *Legionella* Pneumonia through Activation of AMPK and Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology*, 200(2), 623–631. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700474>
 893. Katila, N., Bhurtel, S., Park, P.-H., & Choi, D.-Y. (2021). Metformin attenuates rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial damage via the AKT/Nrf2 pathway. *Neurochemistry International*, 148, 105120. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105120>
 894. Ma, W., Zhao, X., Wang, K., Liu, J., & Huang, G. (2018). Dichloroacetic acid (DCA) synergizes with the SIRT2 inhibitor Sirtinol and AGK2 to enhance anti-tumor efficacy in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 19(9), 835–846. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1480281>
 895. Kitamura, S., Yamaguchi, K., Murakami, R., Furutake, Y., Higasa, K., Abiko, K., ... Mandai, M. (2021). PDK2 leads to cisplatin resistance through suppression of mitochondrial function in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Science*, 112(11), 4627–4640. <https://doi.org/10.1111/cas.15125>
 896. Abildgaard, C., Rizza, S., Christiansen, H., Schmidt, S., Dahl, C., Abdul-Al, A., ... Guldberg, P. (2021). Screening of metabolic modulators identifies new strategies to target metabolic reprogramming in melanoma. *Scientific Reports*, 11(1), 4390. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83796-8>
 897. Chen, Y.-H., Wu, J.-X., Yang, S.-F., Chen, M.-L., Chen, T.-H., & Hsiao, Y.-H. (2021). Metformin Potentiates the Anticancer Effect of Everolimus on Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *Cancers*, 13(18), 4612. <https://doi.org/10.3390/cancers13184612>
 898. Xia, C., Chen, R., Chen, J., Qi, Q., Pan, Y., Du, L., ... Jiang, S. (2017). Combining metformin and nelfinavir exhibits synergistic effects against the growth of human cervical cancer cells and xenograft in nude mice. *Scientific Reports*, 7(1), 43373. <https://doi.org/10.1038/srep43373>
 899. Haugrud, A. B., Zhuang, Y., Coppock, J. D., & Miskimins, W. K. (2014). Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(3), 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3128-y>
 900. Santucci, R., Sinibaldi, F., Cozza, P., Polticelli, F., & Fiorucci, L. (2019). Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1237–1246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180>

901. Ow, Y.-L. P., Green, D. R., Hao, Z., & Mak, T. W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 532–542. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>
902. Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). Mitochondria in cell death. *Essays in Biochemistry*, 47, 99–114. <https://doi.org/10.1042/bse0470099>
903. Zhu, Q., Yu, X., Zhou, Z.-W., Luo, M., Zhou, C., He, Z.-X., ... Zhou, S.-F. (2018). A quantitative proteomic response of hepatocellular carcinoma Hep3B cells to danusertib, a pan-Aurora kinase inhibitor. *Journal of Cancer*, 9(12), 2061–2071. <https://doi.org/10.7150/jca.20822>
904. Liu, J., & Qin, C.-Y. (2018). VX-680 induces p53-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 29(10), 1004–1010. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000682>
905. Zamorano, S., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Parra, V., Court, F. A., Villegas, R., ... Hetz, C. (2012). A BAX/BAK and Cyclophilin D-Independent Intrinsic Apoptosis Pathway. *PLoS ONE*, 7(6), e37782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037782>
906. Mizuta, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Nakagawa, T., & Tsujimoto, Y. (2007). A Bax/Bak-independent Mechanism of Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16623–16630. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611060200>
907. Mullauer, F. B., Kessler, J. H., & Medema, J. P. (2009). Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis*, 14(2), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0290-x>
908. Wan, K. F., Chan, S.-L., Sukumaran, S. K., Lee, M.-C., & Yu, V. C. (2008). Chelerythrine Induces Apoptosis through a Bax/Bak-independent Mitochondrial Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8423–8433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707687200>
909. Lei, X., Chen, Y., Du, G., Yu, W., Wang, X., Qu, H., ... Chen, Q. (2006). Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2. *The FASEB Journal*, 20(12), 2147–2149. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5665fje>
910. Nutt, L. K., Gogvadze, V., Uthaisang, W., Mirnikjoo, B., McConkey, D. J., & Orrenius, S. (2005). Bax and Bak are required for cytochrome c release during arsenic trioxide-induced apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*, 4(4), 465–473. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.4.1652>
911. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, 275(5303), 1132–1136. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1132>
912. Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., & Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO Journal*, 17(1), 37–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.37>
913. Kim, W.-S., Lee, K.-S., Kim, J.-H., Kim, C.-K., Lee, G., Choe, J., ... Kim, Y.-M. (2017). The caspase-8/Bid/cytochrome c axis links signals from death receptors to mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.001>

914. Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.-C., Antonsson, B., Estaquier, J., & Ameisen, J. C. (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *Journal of Cell Biology*, 159(6), 923–929. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207071>
915. Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., & Hay, N. (1999). Akt/Protein Kinase B Inhibits Cell Death by Preventing the Release of Cytochrome c from Mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5800–5810. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.8.5800>
916. Chen, Q., Gong, B., & Almasan, A. (2000). Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 7(2), 227–233. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400629>
917. Nakashima, T., Ishii, T., Tagaya, H., Seike, T., Nakagawa, H., Kanda, Y., ... Shiotsu, Y. (2010). New Molecular and Biological Mechanism of Antitumor Activities of KW-2478, a Novel Nonansamycin Heat Shock Protein 90 Inhibitor, in Multiple Myeloma Cells. *Clinical Cancer Research*, 16(10), 2792–2802. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3112>
918. Francis, L. K., Alsayed, Y., Leleu, X., Jia, X., Singha, U. K., Anderson, J., ... Ghobrial, I. M. (2006). Combination Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Rapamycin and HSP90 Inhibitor 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin Has Synergistic Activity in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 12(22), 6826–6835. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1331>
919. Reddy, N., Voorhees, P. M., Houk, B. E., Brega, N., Hinson, J. M., & Jillela, A. (2013). Phase I Trial of the HSP90 Inhibitor PF-04929113 (SNX5422) in Adult Patients With Recurrent, Refractory Hematologic Malignancies. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 13(4), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.03.010>
920. STÜHMER, T., ISKANDAROV, K., GAO, Z., BUMM, T., GRELLA, E., JENSEN, M. R., ... BARGOU, R. C. (2012). Preclinical Activity of the Novel Orally Bioavailable HSP90 Inhibitor NVP-HSP990 against Multiple Myeloma Cells. *Anticancer Research*, 32(2), 453–462. Retrieved from <http://ar.iiarjournals.org/content/32/2/453.abstract>
921. Okawa, Y., Hideshima, T., Steed, P., Vallet, S., Hall, S., Huang, K., ... Anderson, K. C. (2009). SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK. *Blood*, 113(4), 846–855. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151928>
922. Kim, H.-B., Lee, S.-H., Um, J.-H., Oh, W. K., Kim, D.-W., Kang, C.-D., & Kim, S.-H. (2015). Sensitization of multidrug-resistant human cancer cells to Hsp90 inhibitors by down-regulation of SIRT1. *Oncotarget*, 6(34), 36202–36218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5343>
923. Powers, M. V., Valenti, M., Miranda, S., Maloney, A., Eccles, S. A., Thomas, G., ... Workman, P. (2013). Mode of cell death induced by the HSP90 inhibitor 17-AAG (tanespimycin) is dependent on the expression of pro-apoptotic BAX. *Oncotarget*, 4(11), 1963–1975. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1419>

924. He, K., Zheng, X., Zhang, L., & Yu, J. (2013). Hsp90 Inhibitors Promote p53-Dependent Apoptosis through PUMA and Bax. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(11), 2559–2568. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0284>
925. Read, A., & Schröder, M. (2021). The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology*, 10(5), 384. <https://doi.org/10.3390/biology10050384>
926. Almanza, A., Carlesso, A., Chintia, C., Creedican, S., Doultisinos, D., Leuzzi, B., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
927. Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
928. Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., ... 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>
929. Iurlaro, R., & Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal*, 283(14), 2640–2652. <https://doi.org/10.1111/febs.13598>
930. Scull, C. M., & Tabas, I. (2011). Mechanisms of ER Stress-Induced Apoptosis in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 2792–2797. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.224881>
931. Faitova, J., Krekac, D., Hrstka, R., & Vojtesek, B. (2006). Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(4), 488–505. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0040-4>
932. Malhotra, J. D., & Kaufman, R. J. (2011). ER Stress and Its Functional Link to Mitochondria: Role in Cell Survival and Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(9), a004424. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004424>
933. Gallerne, C., Prola, A., & Lemaire, C. (2013). Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(6), 1356–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.014>
934. Taiyab, A., Sreedhar, A. S., & Rao, Ch. M. (2009). Hsp90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma. *Biochemical Pharmacology*, 78(2), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.001>
935. Davenport, E. L., Moore, H. E., Dunlop, A. S., Sharp, S. Y., Workman, P., Morgan, G. J., & Davies, F. E. (2007). Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*, 110(7), 2641–2649. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-053728>
936. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., ... Kharbanda, S. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO Journal*, 19(16), 4310–4322. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4310>

937. Lamottke, B., Kaiser, M., Mieth, M., Heider, U., Gao, Z., Nikolova, Z., ... Sezer, O. (2012). The novel, orally bioavailable HSP90 inhibitor NVP-HSP990 induces cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells and acts synergistically with melphalan by increased cleavage of caspases. *European Journal of Haematology*, 88(5), 406–415. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01764.x>
938. Zhang, Z., Li, H.-M., Zhou, C., Li, Q., Ma, L., Zhang, Z., ... Liu, H. (2016). Non-benzoquinone geldanamycin analogs trigger various forms of death in human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0428-6>
939. Li, M., Zhang, X., Zhou, W., Chen, Y., Liu, H., Liu, L., ... Qian, W. (2013). Hsp90 inhibitor BIIB021 enhances triptolide-induced apoptosis of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells *in vitro* mainly by disrupting p53-MDM2 balance. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(12), 1545–1553. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.124>
940. Lin, S., Li, J., Zhou, W., Qian, W., Wang, B., & Chen, Z. (2014). BIIB021, an Hsp90 inhibitor, effectively kills a myelodysplastic syndrome cell line via the activation of caspases and inhibition of PI3K/Akt and NF-κB pathway proteins. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1539–1544. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1651>
941. Yao, Z., Chen, A., Li, X., Zhu, Z., & Jiang, X. (2017). Hsp90 inhibitor sensitizes TRAIL-mediated apoptosis via chop-dependent DR5 upregulation in colon cancer cells. *American Journal of Translational Research*, 9(11), 4945–4953.
942. Hu, L., Wang, Y., Chen, Z., Fu, L., Wang, S., Zhang, X., ... Liu, Z. (2019). Hsp90 Inhibitor SNX-2112 Enhances TRAIL-Induced Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells via the ROS-Mediated JNK-p53-Autophagy-DR5 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2019/9675450>
943. Gulla, A., & Anderson, K. C. (2020). Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into future. *Haematologica*, 105(10), 2358–2367. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247015>
944. Gomez-Bougie, P., Maiga, S., Tessoulin, B., Bourcier, J., Bonnet, A., Rodriguez, M. S., ... 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>
945. Kumar, S. K., Harrison, S. J., Cavo, M., de la Rubia, J., Popat, R., Gasparetto, 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)
946. Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., ... Hird, A. W. (2018). Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, 9(1), 5341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>
947. Farag, S. S. (2011). The potential role of Aurora kinase inhibitors in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 155(5), 561–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08898.x>

948. Choudary, I., Barr, P. M., & Friedberg, J. (2015). Recent advances in the development of Aurora kinases inhibitors in hematological malignancies. *Therapeutic Advances in Hematology*, 6(6), 282–294. <https://doi.org/10.1177/2040620715607415>
949. Paner, A., Patel, P., & Dhakal, B. (2020). The evolving role of translocation t(11;14) in the biology, prognosis, and management of multiple myeloma. *Blood Reviews*, 41, 100643. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100643>
950. Bagashev, A., Loftus, J. P., Wakefield, C., Wertheim, G., Hurtz, C., Carroll, M. P., ... Tasian, S. K. (2021). Alisertib Synergistically Strengthens the Anti-Leukemia Activity of Venetoclax in TCF3-Hlf B-ALL. *Blood*, 138(Supplement 1), 705. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-148671>
951. Olgac, E. (2022). *Characterisation of BH3-Mimetic-Drug Resistant Acute Myeloid Leukaemia Cell Lines to Identify Novel Drug Combinations for Targeted Cancer Therapy*. University of Helsinki.
952. Al-Odat, O. S., von Suskil, M., Chitren, R. J., Elbezanti, W. O., Srivastava, S. K., Budak-Alpddogan, T., ... Pandey, M. (2021). Mcl-1 Inhibition: Managing Malignancy in Multiple Myeloma. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 699629. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.699629>
953. Pei, X.-Y., Dai, Y., Felthousen, J., Chen, S., Takabatake, Y., Zhou, L., ... Grant, S. (2014). Circumvention of Mcl-1-Dependent Drug Resistance by Simultaneous Chk1 and MEK1/2 Inhibition in Human Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE*, 9(3), e89064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089064>
954. Robak, P., Drozd, I., Szemraj, J., & Robak, T. (2018). Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer treatment reviews*, 70, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.09.001>
955. Ludwig, H., Beksac, M., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Cavo, M., ... Zweegman, S. (2010). Current Multiple Myeloma Treatment Strategies with Novel Agents: A European Perspective. *The Oncologist*, 15(1), 6–25. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0203>
956. High, L. M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S. L., ... Lock, R. B. (2010). The Bcl-2 Homology Domain 3 Mimetic ABT-737 Targets the Apoptotic Machinery in Acute Lymphoblastic Leukemia Resulting in Synergistic in Vitro and in Vivo Interactions with Established Drugs. *Molecular Pharmacology*, 77(3), 483–494. <https://doi.org/10.1124/mol.109.060780>
957. Kang, M. H., Kang, H. K., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Sheard, M. A., Harned, T. M., ... Reynolds, C. P. (2007). Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 110(6), 2057–2066. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-080325>
958. Song, T., Chai, G., Liu, Y., Xie, M., Chen, Q., Yu, X., ... Zhang, Z. (2015). Mechanism of synergy of BH3 mimetics and paclitaxel in chronic myeloid leukemia cells: Mcl-1 inhibition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.003>
959. Zhou, W., Xu, J., Gelston, E., Wu, X., Zou, Z., Wang, B., ... Liu, Q. (2015). Inhibition of Bcl-xL overcomes polyploidy resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid

- leukemia cells. *Oncotarget*, 6(25), 21557–21571. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4306>
960. Alcon, C., Manzano-Muñoz, A., Prada, E., Mora, J., Soriano, A., Guillén, G., ... Montero, J. (2020). Sequential combinations of chemotherapeutic agents with BH3 mimetics to treat rhabdomyosarcoma and avoid resistance. *Cell Death & Disease*, 11(8), 634. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02887-y>
 961. Ma, Y., Cao, H., Lou, S., Shao, X., Lv, W., Qi, X., ... Yang, X. (2015). Sequential treatment with aurora B inhibitors enhances cisplatin-mediated apoptosis via c-Myc. *Journal of Molecular Medicine*, 93(4), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1228-0>
 962. Lohard, S., Bourgeois, N., Maillet, L., Gautier, F., Fétiveau, A., Lasla, H., ... Barillé-Nion, S. (2020). STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nature Communications*, 11(1), 259. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13689-y>
 963. Manzano-Muñoz, A., Alcon, C., Menéndez, P., Ramírez, M., Seyfried, F., Debatin, K.-M., ... Montero, J. (2021). MCL-1 Inhibition Overcomes Anti-apoptotic Adaptation to Targeted Therapies in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 695225. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.695225>
 964. Chinn, D. C., Holland, W. S., & Mack, P. C. (2014). Anticancer activity of the Aurora A kinase inhibitor MK-5108 in non-small-cell lung cancer (NSCLC) in vitro as monotherapy and in combination with chemotherapies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(7), 1137–1149. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1675-6>
 965. VanderPorten, E. C., Taverna, P., Hogan, J. N., Ballinger, M. D., Flanagan, W. M., & Fucini, R. V. (2009). The Aurora kinase inhibitor SNS-314 shows broad therapeutic potential with chemotherapeutics and synergy with microtubule-targeted agents in a colon carcinoma model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 930–939. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0754>
 966. Reiman, T., Evans, R. P., Naber, C., Steffler, T., Keats, J. J., Perry, T., ... Pilarski, L. M. (2006). Aurora Kinases as Therapeutic Targets in Multiple Myeloma. *Blood*, 108(11), 847. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.847.847>
 967. Qi, W., Liu, X., Cooke, L. S., Persky, D. O., Miller, T. P., Squires, M., & Mahadevan, D. (2012). AT9283, a novel aurora kinase inhibitor, suppresses tumor growth in aggressive B-cell lymphomas. *International Journal of Cancer*, 130(12), 2997–3005. <https://doi.org/10.1002/ijc.26324>
 968. Tyler, R. K., Shpiro, N., Marquez, R., & Evers, P. A. (2007). VX-680 Inhibits Aurora A and Aurora B Kinase Activity in Human Cells. *Cell Cycle*, 6(22), 2846–2854. <https://doi.org/10.4161/cc.6.22.4940>
 969. Carpinelli, P., Ceruti, R., Giorgini, M. L., Cappella, P., Gianellini, L., Croci, V., ... Moll, J. (2007). PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(12), 3158–3168. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0444>

970. Yang, H., Burke, T., Dempsey, J., Diaz, B., Collins, E., Toth, J., ... Ye, X. (2005). Mitotic requirement for aurora A kinase is bypassed in the absence of aurora B kinase. *FEBS Letters*, 579(16), 3385–3391. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.080>
971. Baldini, E., Tuccilli, C., Prinzi, N., Sorrenti, S., Antonelli, A., Gnassi, L., ... Ulisse, S. (2014). Effects of selective inhibitors of Aurora kinases on anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Endocrine-Related Cancer*, 21(5), 797–811. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0299>
972. Lin, S.-F., Lin, J.-D., Hsueh, C., Chou, T.-C., & Wong, R. J. (2017). A cyclin-dependent kinase inhibitor, dinaciclib in preclinical treatment models of thyroid cancer. *PLoS ONE*, 12(2), e0172315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172315>
973. Kumar, S. K., LaPlant, B., Chng, W. J., Zonder, J., Callander, N., Fonseca, R., ... Stewart, A. K. (2015). Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 125(3), 443–448. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-573741>
974. ClinicalTrials.gov. (2023). *U.S. National Library of Medicine*. Retrieved May 16, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/>
975. Blachly, J. S., & Byrd, J. C. (2013). Emerging drug profile: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, 54(10), 2133–2143. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.783911>
976. Kollareddy, M., Zheleva, D., Dzubak, P., Brahmshatriya, P. S., Lepsik, M., & Hajdich, M. (2012). Aurora kinase inhibitors: Progress towards the clinic. *Investigational New Drugs*, 30(6), 2411–2432. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9798-6>
977. Uras, I., Maurer, B., Nebenfuehr, S., Zojer, M., Valent, P., & Sexl, V. (2018). Therapeutic Vulnerabilities in FLT3-Mutant AML Unmasked by Palbociclib. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3987. <https://doi.org/10.3390/ijms19123987>
978. Matsushashi, A., Ohno, T., Kimura, M., Hara, A., Saio, M., Nagano, A., ... Shimizu, K. (2012). Growth Suppression and Mitotic Defect Induced by JNJ-7706621, an Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases and Aurora Kinases. *Current Cancer Drug Targets*, 12(6), 625–639. <https://doi.org/10.2174/156800912801784839>
979. Gregory, G. P., Hogg, S. J., Kats, L. M., Vidacs, E., Baker, A. J., Gilan, O., ... Shortt, J. (2015). CDK9 inhibition by dinaciclib potently suppresses Mcl-1 to induce durable apoptotic responses in aggressive MYC-driven B-cell lymphoma in vivo. *Leukemia*, 29(6), 1437–1441. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.10>
980. Varadarajan, S., Poornima, P., Milani, M., Gowda, K., Amin, S., Wang, H.-G., & Cohen, G. M. (2015). Maritoclax and dinaciclib inhibit MCL-1 activity and induce apoptosis in both a MCL-1-dependent and -independent manner. *Oncotarget*, 6(14), 12668–12681. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3706>
981. Booher, R. N., Hatch, H., Dolinski, B. M., Nguyen, T., Harmonay, L., Al-Assaad, A.-S., ... Strack, P. (2014). MCL1 and BCL-xL Levels in Solid Tumors Are Predictive of Dinaciclib-Induced Apoptosis. *PLoS ONE*, 9(10), e108371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108371>
982. Alsayegh, K., Matsuura, K., Sekine, H., & Shimizu, T. (2017). Dinaciclib potently suppresses MCL-1 and selectively induces the cell death in human iPS cells without

- affecting the viability of cardiac tissue. *Scientific Reports*, 7(1), 45577. <https://doi.org/10.1038/srep45577>
983. Chen, X.-X., Xie, F.-F., Zhu, X.-J., Lin, F., Pan, S.-S., Gong, L.-H., ... Yan, X.-J. (2015). Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib potently synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer. *Oncotarget*, 6(17), 14926–14939. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3717>
984. Fu, W., Ma, L., Chu, B., Wang, X., Bui, M. M., Gemmer, J., ... Pledger, W. J. (2011). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor SCH 727965 (Dinaciclib) Induces the Apoptosis of Osteosarcoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(6), 1018–1027. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0167>
985. Laubach, J. P., Moreau, P., San-Miguel, J. F., & Richardson, P. G. (2015). Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 21(21), 4767–4773. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0530>
986. Suraweera, A., O’Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2018). Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Frontiers in Oncology*, 8, 92. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00092>
987. Hontecillas-Prieto, L., Flores-Campos, R., Silver, A., de Álava, E., Hajji, N., & García-Domínguez, D. J. (2020). Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Frontiers in Genetics*, 11, 578011. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.578011>
988. Geron, L., Borges, K. S., Andrade, A. F., Suazo, V. K., Scrideli, C. A., & Tone, L. G. (2015). Antitumour activity of AMG 900 alone or in combination with histone deacetylase inhibitor SaHa on medulloblastoma cell lines. *Neurological Research*, 37(8), 703–711. <https://doi.org/10.1179/1743132815Y.0000000048>
989. Fiskus, W., Hembruff, S. L., Rao, R., Sharma, P., Balusu, R., Venkannagari, S., ... Bhalla, K. N. (2012). Co-treatment with vorinostat synergistically enhances activity of Aurora kinase inhibitor against human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(2), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2171-9>
990. Okabe, S., Tauchi, T., Tanaka, Y., Kimura, S., Maekawa, T., & Ohyashiki, K. (2013). Activity of histone deacetylase inhibitors and an Aurora kinase inhibitor in BCR-ABL-expressing leukemia cells: Combination of HDAC and Aurora inhibitors in BCR-ABL-expressing cells. *Cancer Cell International*, 13(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-32>
991. Kretzner, L., Scuto, A., Dino, P. M., Kowolik, C. M., Wu, J., Ventura, P., ... Kirschbaum, M. H. (2011). Combining Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat with Aurora Kinase Inhibitors Enhances Lymphoma Cell Killing with Repression of c-Myc, hTERT, and microRNA Levels. *Cancer Research*, 71(11), 3912–3920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2259>
992. Zullo, K. M., Guo, Y., Cooke, L., Jirau-Serrano, X., Mangone, M., Scotto, L., ... O’Connor, O. A. (2015). Aurora A Kinase Inhibition Selectively Synergizes with Histone Deacetylase Inhibitor through Cytokinesis Failure in T-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 21(18), 4097–4109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0033>

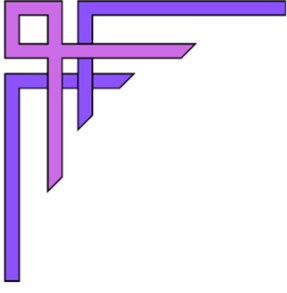
993. Strati, P., Nastoupil, L. J., Davis, R. E., Fayad, L. E., Fowler, N., Hagemeister, F. B., ... Lee, H. J. (2020). A phase 1 trial of alisertib and romidepsin for relapsed/refractory aggressive B-cell and T-cell lymphomas. *Haematologica*, 105(1), e26–e28. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.220012>
994. Siddiqi, T., Frankel, P., Beumer, J. H., Kiesel, B. F., Christner, S., Ruel, C., ... Newman, E. M. (2020). Phase 1 study of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) combined with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in lymphoid malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 61(2), 309–317. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1672052>
995. Yee, A. J., & Raje, N. S. (2018). Panobinostat and Multiple Myeloma in 2018. *The Oncologist*, 23(5), 516–517. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0644>
996. Park, J.-H., Jong, H.-S., Kim, S. G., Jung, Y., Lee, K.-W., Lee, J.-H., ... Kim, T.-Y. (2008). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective cytotoxicity through modulating Aurora-A kinase. *Journal of Molecular Medicine*, 86(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0260-8>
997. Cha, T.-L., Chuang, M.-J., Wu, S.-T., Sun, G.-H., Chang, S.-Y., Yu, D.-S., ... Hsiao, P.-W. (2009). Dual Degradation of Aurora A and B Kinases by the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Induces G2-M Arrest and Apoptosis of Renal Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 15(3), 840–850. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1918>
998. Skuli, S. J., Alomari, S., Gaitsch, H., Bakayoko, A., Skuli, N., & Tyler, B. M. (2022). Metformin and Cancer, an Ambiguanidous Relationship. *Pharmaceutics*, 15(5), 626. <https://doi.org/10.3390/ph15050626>
999. Zhou, X., Chen, R., Yu, Z., Li, R., Li, J., Zhao, X., ... Huang, G. (2015). Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation. *Molecular Cancer*, 14(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0331-3>
1000. Cunha, A., Rocha, A. C., Barbosa, F., Baião, A., Silva, P., Sarmiento, B., & Queirós, O. (2022). Glycolytic Inhibitors Potentiated the Activity of Paclitaxel and Their Nanoencapsulation Increased Their Delivery in a Lung Cancer Model. *Pharmaceutics*, 14(10), 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102021>
1001. Sun, H., Zhu, A., Zhou, X., & Wang, F. (2017). Suppression of pyruvate dehydrogenase kinase-2 re-sensitizes paclitaxel-resistant human lung cancer cells to paclitaxel. *Oncotarget*, 8(32), 52642–52650. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16991>
1002. Lu, X., Zhou, D., Hou, B., Liu, Q.-X., Chen, Q., Deng, X.-F., ... Zheng, H. (2018). Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer. *Cancer Management and Research*, 10, 1231–1241. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S156530>
1003. Lengyel, E., Litchfield, L. M., Mitra, A. K., Nieman, K. M., Mukherjee, A., Zhang, Y., ... Romero, I. L. (2015). Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(4), 479.e1–479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.10.026>
1004. Hanna, R. K., Zhou, C., Malloy, K. M., Sun, L., Zhong, Y., Gehrig, P. A., & Bae-Jump, V. L. (2012). Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells

- through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway. *Gynecologic Oncology*, 125(2), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.01.009>
1005. Asik, A., Kayabasi, C., Ozmen Yelken, B., Yılmaz Susluer, S., Dogan Sigva, Z. O., Balcı Okcanoglu, T., ... Gunduz, C. (2018). Antileukemic effect of paclitaxel in combination with metformin in HL-60 cell line. *Gene*, 647, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.017>
 1006. Ko, G., Kim, T., Ko, E., Park, D., & Lee, Y. (2019). Synergistic Enhancement of Paclitaxel-induced Inhibition of Cell Growth by Metformin in Melanoma Cells. *Development & Reproduction*, 23(2), 119–128. <https://doi.org/10.12717/DR.2019.23.2.119>
 1007. Yi, Y., Gao, L., Wu, M., Ao, J., Zhang, C., Wang, X., ... Xiao, Z.-X. J. (2017). Metformin Sensitizes Leukemia Cells to Vincristine via Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Cancer*, 8(13), 2636–2642. <https://doi.org/10.7150/jca.19873>
 1008. Pujalte Martin, M., Borchellini, D., Thamphya, B., Guillot, A., Paoli, J.-B., Besson, D., ... Ferrero, J.-M. (2021). TAXOMET: A French Prospective Multicentric Randomized Phase II Study of Docetaxel Plus Metformin Versus Docetaxel Plus Placebo in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 19(6), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2021.08.008>
 1009. Tian, D. D., Bennett, S. K., Coupland, L. A., Forwood, K., Lwin, Y., Pooryousef, N., ... Blackburn, A. C. (2019). *GSTZ1* genotypes correlate with dichloroacetate pharmacokinetics and chronic side effects in multiple myeloma patients in a pilot phase 2 clinical trial. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00526. <https://doi.org/10.1002/prp2.526>
 1010. Zi, F.-M., He, J.-S., Li, Y., Wu, C., Yang, L., Yang, Y., ... Cai, Z. (2015). Metformin displays anti-myeloma activity and synergistic effect with dexamethasone in in vitro and in vivo xenograft models. *Cancer Letters*, 356(2), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.050>
 1011. Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1–4. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
 1012. Hajdu, S. I. (2011). A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097–1102. <https://doi.org/10.1002/cncr.25553>
 1013. Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>
 1014. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G., & Kyrodimos, E. (2018). The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & Experimental Metastasis*, 35(4), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9903-0>
 1015. Ferlay, J., Laversanne, M., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., ... Bray, F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Retrieved November 8, 2023, from <https://gco.iarc.fr/tomorrow>
 1016. 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>

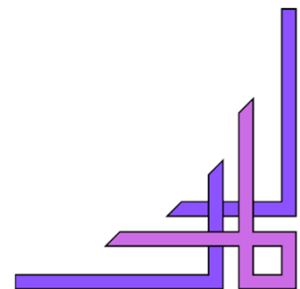
1017. Dengler, M. A., Teh, C. E., Thijssen, R., Gangoda, L., Lan, P., Herold, M. J., ... Adams, J. M. (2020). Potent efficacy of MCL-1 inhibitor-based therapies in preclinical models of mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 39(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1122-x>
1018. Konopleva, M., Pollyea, D. A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busman, T., ... Letai, A. (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discovery*, 6(10), 1106–1117. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0313>
1019. Gandhi, L., Camidge, D. R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., ... Rudin, C. M. (2011). Phase I Study of Navitoclax (ABT-263), a Novel Bcl-2 Family Inhibitor, in Patients With Small-Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 29(7), 909–916. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.6208>
1020. Senichkin, V. V., Pervushin, N. V., Zamaraev, A. V., Sazonova, E. V., Zuev, A. P., Streletskaia, A. Y., ... Kopeina, G. S. (2022). Bak and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors. *Cancers*, 14(1), 181. <https://doi.org/10.3390/cancers14010181>
1021. Streletskaia, A. Y., Senichkin, V. V., Prikazchikova, T. A., Zatsepin, T. S., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). Upregulation of Mcl-1S Causes Cell-Cycle Perturbations and DNA Damage Accumulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 543066. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.543066>
1022. Jing, X.-L., & Chen, S.-W. (2021). Aurora kinase inhibitors: a patent review (2014-2020). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 31(7), 625–643. <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1890027>
1023. Borisa, A. C., & Bhatt, H. G. (2017). A comprehensive review on Aurora kinase: Small molecule inhibitors and clinical trial studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.045>
1024. Gay, C. M., Zhou, Y., Lee, J. J., Tang, X. M., Lu, W., Wistuba, I. I., ... Tsao, A. S. (2020). A Phase II Trial of Alisertib (MLN8237) in Salvage Malignant Mesothelioma. *The Oncologist*, 25(10), e1457–e1463. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2020-0610>
1025. Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., & Saya, H. (2003). Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51786–51795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306275200>
1026. Sun, X., Shi, B., Zheng, H., Min, L., Yang, J., Li, X., ... Liu, X. (2018). Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway. *Cell Death & Disease*, 9(3), 260. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0303-9>
1027. Bojko, A., Czarnecka-Herok, J., Charzynska, A., Dabrowski, M., & Sikora, E. (2019). Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells*, 8(12), 1501. <https://doi.org/10.3390/cells8121501>
1028. Zhang, Y., Ma, Y., Wang, Y., Mukhopadhyay, D., Bi, Y., & Ji, B. (2022). Aurora kinase a inhibitor MLN8237 suppresses pancreatic cancer growth. *Pancreatology*, 22(5), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.03.019>

1029. Valenzuela, C. A., Vargas, L., Martinez, V., Bravo, S., & Brown, N. E. (2017). Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 360(2), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.031>
1030. Gao, M., Liu, T., Li, J., Guan, Q., Wang, H., Yan, S., ... Wu, Y. (2020). YAN, a novel microtubule inhibitor, inhibits P-gp and MRP1 function and induces mitotic slippage followed by apoptosis in multidrug-resistant A549/Taxol cells. *Toxicology in Vitro*, 69, 104971. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104971>
1031. Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunagaran, D., & Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 649(1–3), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.020>
1032. Orth, J. D., Loewer, A., Lahav, G., & Mitchison, T. J. (2012). Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Molecular Biology of the Cell*, 23(4), 567–576. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0781>
1033. Llambi, F., Wang, Y.-M., Victor, B., Yang, M., Schneider, D. M., Gingras, S., ... Green, D. R. (2016). BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell*, 165(2), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.026>
1034. Martens, S., Goossens, V., Devisscher, L., Hofmans, S., Claeys, P., Vuylsteke, M., ... Vandenameele, P. (2018). RIPK1-dependent cell death: a novel target of the Aurora kinase inhibitor Tozasertib (VX-680). *Cell Death & Disease*, 9(2), 211. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0245-7>
1035. Kryeziu, K., Bruun, J., Guren, T. K., Sveen, A., & Lothe, R. A. (2019). Combination therapies with HSP90 inhibitors against colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1871(2), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.002>
1036. Cory, S. (1995). Regulation of Lymphocyte Survival by the BCL-2 Gene Family. *Annual Review of Immunology*, 13(1), 513–543. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.002501>
1037. Agarwal, B., & Naresh, K. N. (2002). Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Study of 116 cases. *American Journal of Hematology*, 70(4), 278–282. <https://doi.org/10.1002/ajh.10139>
1038. Majid, A., Tsoulakis, O., Walewska, R., Gesk, S., Siebert, R., Kennedy, D. B. J., & Dyer, M. J. S. (2008). BCL2 expression in chronic lymphocytic leukemia: lack of association with the BCL2 –938A>C promoter single nucleotide polymorphism. *Blood*, 111(2), 874–877. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-098681>
1039. Campos, L., Rouault, J., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., ... Guyotat, D. (1993). High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*, 81(11), 3091–3096. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.11.3091.3091>

1040. Wang, L., & Bernards, R. (2018). Taking advantage of drug resistance, a new approach in the war on cancer. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 490–495. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0647-7>
1041. Wang, L., Lankhorst, L., & Bernards, R. (2022). Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 22(6), 340–355. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9>
1042. Estepa-Fernández, A., García-Fernández, A., Lérida-Viso, A., Blandez, J. F., Galiana, I., Sancenon-Galarza, F., ... Martínez-Mañez, R. (2023). Combination of palbociclib with navitoclax based-therapies enhances in vivo antitumoral activity in triple-negative breast cancer. *Pharmacological Research*, 187, 106628. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106628>
1043. Sancho, M., Leiva, D., Lucendo, E., & Orzáez, M. (2022). Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *The FEBS Journal*, 289(20), 6209–6234. <https://doi.org/10.1111/febs.16136>
1044. Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A., & McDaid, H. M. (2017). A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Scientific Reports*, 7(1), 1900. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01964-1>
1045. Desbats, M. A., Giacomini, I., Prayer-Galetti, T., & Montopoli, M. (2020). Metabolic Plasticity in Chemotherapy Resistance. *Frontiers in Oncology*, 10, 281. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00281>
1046. Kim, H., Jang, J., Song, M. J., Kim, G., Park, C.-H., Lee, D. H., ... Chung, J. H. (2022). Attenuation of intrinsic ageing of the skin via elimination of senescent dermal fibroblasts with senolytic drugs. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 36(7), 1125–1135. <https://doi.org/10.1111/jdv.18051>
1047. Miura, Y., Endo, K., Komori, K., & Sekiya, I. (2022). Clearance of senescent cells with ABT-263 improves biological functions of synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 222. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02901-4>
1048. Beltzig, L., Christmann, M., & Kaina, B. (2022). Abrogation of Cellular Senescence Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells: Search for Senolytics. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells11162588>



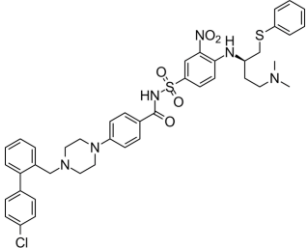
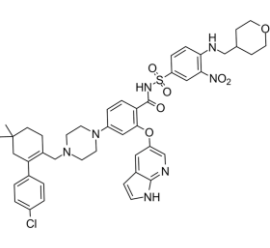
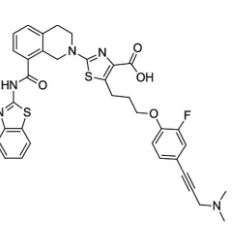
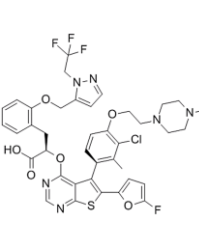
ANEXOS



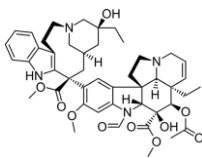
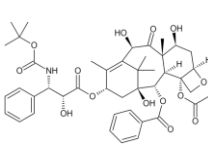
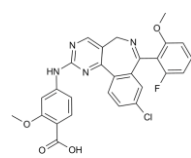
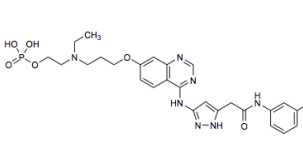
Anexos

Anexo I – Estructura química de los compuestos utilizados

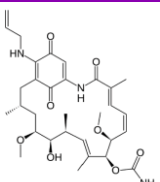
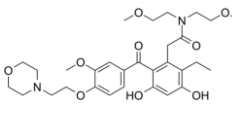
Miméticos BH3

ABT-737 (Bcl-2, Bcl-X _L y Mcl-1)	ABT-199 (Bcl-2)	A-1155463 (Bcl-X _L)	S63845 (Mcl-1)
			

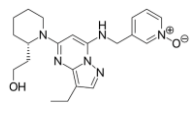
Fármacos antimetabólicos

Vincristina (microtúbulos)	Docetaxel (microtúbulos)	Alisertib (Aurora A)	Barasertib (Aurora B)
			

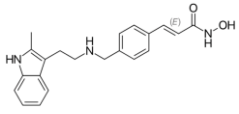
Inhibidores Hsp90

17-AAG (pan-inhibidor)	KW-2478 (Hsp90a)
	

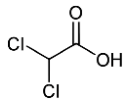
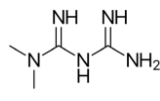
Inhibidor de CDKs

Dinaciclib (CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9)


Inhibidor de HDACs

Panobinostat (pan-inhibidor)


Inhibidores metabólicos

DCA (pan-inhibidor de PDKs)	Metformina (complejo I del sistema OXPHOS)
	

Anexo II – Tampones y disoluciones

Tampón/Disolución	Componentes	Utilidad
PBS 1x	En agua destilada: NaCl 150 mM K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O 8 mM KH ₂ PO ₄ 1,6 mM pH 7,4	General
Tripsina/EDTA (PAN-Biotech)	Tripsina 0,25 % (w/v) 1 mM EDTA-Na ₄ en HBSS w/o Ca-Mg Rojo fenol	Mantenimiento de los cultivos celulares (apartado 3.1.3)
Azul Trypan	Azul Trypan al 0,4 % disuelto en NaCl 0,15 M	Viabilidad celular (apartado 3.1.3)
Disolución de MTT	MTT 5 mg/ml en PBS	Proliferación celular (apartado 3.2.1)
ABB (Annexin Binding Buffer)	En agua milliQ estéril: HEPES/NaOH 10 mM CaCl ₂ 2,5 mM NaCl 140 mM pH 7,4	Análisis muerte celular (apartado 3.2.2)
CYTO-ID® Autophagy detection kit 2.0 (Enzo Life Sciences)	CYTO-ID® Green Detection Reagent 2 Hoechst 33342 Rapamicina (inductor de autofagia) Cloroquina (control) Buffer 10x (PBS)	Autofagia (apartado 3.2.3)
Paraformaldehído	Paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS	Caspasa 3 activa (apartado 3.3) Salida del citocromo c (apartado 3.4.2) Tinción núcleos (apartado 3.7.1)
Tampón de permeabilización (caspasa 3 activa)	Saponina 0,1 % (p/v) en PBS pH 7,4	Determinación de caspasa 3 activa (apartado 3.3)
Tampón de permeabilización (salida citocromo c)	En PBS: Digitonina 50 µg/ml KCl 10 mM pH 7,4	Salida del citocromo c (apartado 3.4.2)
Solución de bloqueo (salida citocromo c)	En PBS: Saponina 0,05 % (p/v) BSA 3 % (p/v) pH 7,4	Salida del citocromo c (apartado 3.4.2)
Solución “PI/RNase” (Immunostep)	PI/RNase y Na ₃ N 0,09 % en PBS pH 7,2	Ciclo celular (apartado 3.5)
Mezcla de fijación (actividad β-galactosidasa)	Paraformaldehído 2 % (v/v) y glutaraldehído 0,2 % (v/v) en PBS	Actividad β-galactosidasa (apartado 3.6)
Mezcla de tinción (actividad β-galactosidasa)	En PBS: K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mM MgCl ₂ 2 mM pH 6	Actividad β-galactosidasa (apartado 3.6)

Tampón Lisis 1x	Tritón X-100 1 % (v/v) Glicerol 10 % (v/v) NaCl 150 mM EDTA 1 mM Na₃VO₄ 1 mM Na₄P₂O₇ 10 mM Leupeptina 10 µg/ml NaF 10 mM PMSF 1 mM Inhibidor de proteasas 1 pastilla Tris-HCl 50 mM pH 7,6	Western Blot (apartado 3.8.1)
Tampón de carga concentrado 3x	Tris-HCl 150 mM SDS 3 % (p/v) Na₂MoO₄ · 2H₂O 0,3 mM Na₄P₂O₇ 30 mM NaF 30 mM Glicerol 30 % (v/v) β-mercaptoetanol 30 % (v/v) Azul de bromofenol 0,06 % (p/v) pH 7,4	Western Blot (apartado 3.8.2)
Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (10-15 %)	Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 40 % (<i>Fisher BioReagents</i>) Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8 (solo gel concentrador) Tris-HCl 1,5 M (solo gel separador) Agua destilada SDS 10 % APS 10 % TEMED (<i>Sigma-Aldrich</i>)	Western Blot (apartado 3.8.2)
Tampón de electroforesis	Tris 25 mM Glicina 192 mM SDS 3,5 mM pH 8,6	Western Blot (apartado 3.8.2)
Tampón de transferencia	Tris 25 mM Glicina 192 mM SDS 3,5 mM Metanol 20 % (v/v) pH 8,3	Western Blot (apartado 3.8.3)
Rojo Ponceau	Rojo Ponceau 0,1 % (p/v) disuelto en ácido acético al 5 % (v/v)	Western Blot (apartado 3.8.3)
Tampón B	Disueltos en PBS: Tween-20 0,1 % (p/v) Timerosal (1 g/l) pH 7,4	Western Blot (apartado 3.8.4)
Leche 5 %	Leche desnatada en polvo al 5 % (p/v) disuelta en tampón B	Western Blot (apartado 3.8.4)
Tampón Antibody solution	En tampón B: BSA 5 % (p/v) NaN₃ 0,05 % (p/v)	Western Blot (apartado 3.8.4)

Anexo III – Publicaciones

Redrado, M., **Benedi, A.**, Marzo, I., García-Otín, A. L., Fernández-Moreira, V., & Concepción Gimeno, M. (2021). Multifunctional Heterometallic Ir III –Au I Probes as Promising Anticancer and Antiangiogenic Agents. *Chemistry – A European Journal*, 27(38), 9885–9897. <https://doi.org/10.1002/chem.202100707>

Redrado, M., **Benedi, A.**, Marzo, I., Gimeno, M. C., & Fernández-Moreira, V. (2021). Dual Emissive Ir(III) Complexes for Photodynamic Therapy and Bioimaging. *Pharmaceutics*, 13(9), 1382. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091382>

Serrano-del Valle, A., Reina-Ortiz, C., **Benedi, A.**, Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2021). Future prospects for mitosis-targeted antitumor therapies. *Biochemical Pharmacology*, 190, 114655. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114655>

Ardevines, S., Auria-Luna, F., Romanos, E., Fernández-Moreira, V., Benedi, A., Gimeno, M. C., ... Herrera, R. P. (2023). 1-Benzamido-1,4-dihydropyridine derivatives as anticancer agents: in vitro and in vivo assays. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(2), 104514. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104514>

Gonzalo, Ó., **Benedi, A.**, Vela, L., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. (2023). Study of the Bcl-2 Interactome by BiFC Reveals Differences in the Activation Mechanism of Bax and Bak. *Cells*, 12(5), 800. <https://doi.org/10.3390/cells12050800>

Beltrán-Visiedo, M., Jiménez-Alduán, N., Díez, R., Cuenca, M., **Benedi, A.**, Serrano-Del Valle, A. S., ... Marzo, I. (2023). Dinaciclib synergizes with BH3 mimetics targeting BCL-2 and BCL-X L in multiple myeloma cell lines partially-dependent on MCL-1 and in plasma cells from patients. *Molecular Oncology*, 17(12), 2507–2525. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13522>

Redrado, M., Romanos, E., **Benedi, A.**, Canudo-Barreras, G., Marzo, I., Gimeno, M.C., & Fernández-Moreira. Synthetic Ease and Exceptional *In Vivo* Performance of Iridium Complexes: A Promising Breakthrough in Cancer Therapy.
En revisión en Inorganic Chemistry Frontiers.

Benedi, A., Jiménez-Alduán, N., Beltrán-Visiedo, M., Serrano-del Valle, A., Anel, A., Naval, J., & Marzo, I. Antitumor activity of the novel selective Aurora kinase A inhibitor alisertib in multiple myeloma cell lines.
En preparación.