



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO

PAPEL DE LA MITOCONDRIA Y LAS CASPASAS EN LA SENSIBILIDAD A DIVERSOS FÁRMACOS ANTITUMORALES EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE

ROLE OF MITOCHONDRIA AND CASPASES IN THE SENSITIVITY OF MULTIPLE MYELOMA CELLS TO ANTITUMOR DRUGS

Autora

Laura Judith Fraga Cabrejas

Directoras

Isabel Marzo Rubio

Laura Cambronero Arregui

Grado en Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre
Universidad de Zaragoza/ Facultad de Ciencias

Curso 2023/2024

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, a Isabel Marzo, por darme la oportunidad de dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación en este grupo, por la acogida y por haber puesto tanto empeño en enseñarme y ayudarme siempre que ha sido necesario, y a Laura Cambroner, por haberme enseñado cómo se trabaja de verdad en el laboratorio, pero sobre todo por darme la confianza e independencia necesarias para aprender a organizar mi tiempo y recursos y a tomar decisiones de forma autónoma y por la paciencia que has demostrado conmigo durante todo ese proceso.

Quiero agradecer en general a todas las personas que forman parte de este grupo de investigación, por acogerme desde el primer momento y por devolverme con vuestra amabilidad, compañerismo y actitud frente al trabajo, la pasión hacia la investigación. Sobre todo, me gustaría agradecer a Pilar por su interés, apoyo y palabras de ánimo durante todo este proceso, compartir espacio de trabajo contigo ha sido todo un placer.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos, porque pese a no entender ni una palabra de lo que os decía, me habéis escuchado hablar sobre viabilidad, cultivos y apoptosis incontables horas, siempre con muchísimo interés, y os habéis preocupado tanto como yo por el estado de mis células, de mis experimentos y de mis gráficas. Pero sobre todo os quiero agradecer el apoyo y confianza que me habéis brindado, no sólo mientras hacía este trabajo, si no durante estos cuatro años, por haber estado ahí en cada uno de mis altibajos, por consolarme y animarme cuando algo no me salía bien y por haber hecho los momentos duros más amenos, sin vosotros nunca lo hubiera conseguido.

ÍNDICE

1	RESUMEN	4
2	ABSTRACT	4
3	INTRODUCCIÓN	5
3.1	¿QUÉ ES EL MIELOMA MÚLTIPLE?.....	5
3.2	TRATAMIENTO ACTUAL FRENTE AL MIELOMA MÚLTIPLE	5
3.3	MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.....	7
3.3.1	Necrosis.....	7
3.3.2	Apoptosis.....	7
3.4	FÁRMACOS ANTITUMORALES EN ANÁLISIS	9
3.4.1	Silmitasertib o CX-4945	10
3.4.2	Selinexor	10
3.4.3	Doxorrubicina.....	10
3.4.4	Sorafenib	11
3.4.5	Iberdomide o CC-220.....	11
4	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
5	MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1	CULTIVO CELULAR	12
5.1.1	Determinación de la densidad y viabilidad celular	13
5.1.2	Criopreservación.....	13
5.2	ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA MUERTE CELULAR MEDIANTE CURVAS DOSIS-RESPUESTA.....	14
5.2.1	Determinación de la proliferación celular mediante MTT	14
5.2.2	Determinación de la muerte celular por citometría de flujo	14
5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	16
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
6.1	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS ENSAYADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	16
6.2	EFFECTO DE LOS FÁRMACOS ENSAYADOS SOBRE LA MUERTE CELULAR.....	19
6.3	EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CASPASAS EN LA MUERTE INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS.....	22
7	CONCLUSIONES.....	25
8	CONCLUSIONS.....	26
9	REFERENCIAS.....	26
10	ANEXOS.....	29

1 RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de células plasmáticas que se acumulan en la médula ósea. El MM, pese a la disponibilidad de terapias, continúa siendo una enfermedad incurable, generalmente los pacientes sufren recaídas en forma de una enfermedad quimiorresistente. Sabiendo que la mayoría de los tratamientos frente al MM inducen la muerte celular, resulta interesante esclarecer los mecanismos moleculares por los que se regula para evitar la aparición de resistencias y predecir la respuesta al tratamiento. En este trabajo se han evaluado los mecanismos de inducción de muerte celular de cinco fármacos diferentes (doxorubicina, iberdomide, selinexor, silmitasertib y sorafenib) sobre dos líneas de MM derivadas de la línea MM.1S: la línea MM.1S Bax/Bak KO, que presenta inhibida la vía intrínseca de la apoptosis, y su línea control, MM.1S LentiCRISPR Ø. Se realizó un cribado inicial de los fármacos, mediante el ensayo MTT, para determinar su capacidad de reducción de la proliferación celular. Tras comprobar que todos, en mayor o menor medida, reducen la proliferación de ambas líneas, se evaluó su capacidad para inducir la muerte celular mediante citometría de flujo. Finalmente, los fármacos capaces de inducir muerte celular en las MM.1S Bax/Bak KO se ensayaron con un inhibidor general de caspasas (Z-VAD-fmk) y, posteriormente, en los casos en los que Z-VAD-fmk producía un efecto, con un inhibidor específico de la caspasa-8 (Z-IETD-fmk). De estos ensayos se dedujo que la doxorubicina, el selinexor y el sorafenib son capaces de inducir apoptosis por mecanismos dependientes y/o independientes de caspasas dependiendo de la línea celular. Por su parte, el silmitasertib parece inducir apoptosis independiente de caspasas, y el iberdomide presenta principalmente un efecto citostático, combinado con un leve efecto citotóxico solo visible sobre la línea control.

2 ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a malignant neoplasm of plasma cells that accumulate in the bone marrow. MM remains an incurable disease, despite the availability of therapies. Patients generally experience relapses in the form of chemoresistant disease. Considering that most treatments for MM induce cell death, elucidating the molecular mechanisms that regulate these processes could be useful for avoiding the development of resistance and predicting response to treatment. This work aims to evaluate the mechanisms of induction of cell death exerted by five different drugs (doxorubicin, iberdomide, selinexor, silmitasertib, and sorafenib) on two MM lines derived from the MM.1S line: MM.1S Bax/Bak KO, which has the intrinsic pathway inhibited, and its control line, MM.1S LentiCRISPR Ø. Firstly, a drug screening was performed using the MTT assay to determine their ability to reduce cell proliferation. After confirming that all drugs, to a different extent, reduce the proliferation of both cell lines, their ability to induce cell death was evaluated using flow cytometry. Finally, the drugs capable of inducing cell death in MM.1S Bax/Bak KO were tested with a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-fmk) and then, in those cases in which Z-VAD-fmk was effective, with a specific caspase-8 inhibitor (Z-IETD-fmk). From these assays it was deduced that doxorubicin, selinexor and sorafenib induce apoptosis by caspase-dependent and/or caspase-independent mechanisms depending on the cell line. Meanwhile, silmitasertib seems to induce caspase-independent apoptosis, and iberdomide exhibits mainly a cytostatic effect, combined with a mild cytotoxic effect only visible in the control line.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 ¿QUÉ ES EL MIELOMA MÚLTIPLE?

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de células plasmáticas monoclonales que se acumulan inicialmente en la médula ósea y generan tumores. Las células plasmáticas son leucocitos o glóbulos blancos encargados de la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos.¹ Estas células se generan a partir de la activación y posterior maduración de los linfocitos B en los centros germinales.²

Las neoplasias de células plasmáticas o gammapatías monoclonales cursan con la producción incontrolada de inmunoglobulinas o fragmentos de ellas, que pueden ser detectadas en sangre y/u orina.¹ La sobreproducción de estas paraproteínas o proteínas monoclonales (proteínas M) es la responsable de algunas de las manifestaciones clínicas del MM activo, como la insuficiencia renal o el síndrome de hiperviscosidad plasmática.^{1,3}

Además de éstos, se pueden encontrar otros síntomas causados por la proliferación celular incontrolada. Al provocar un funcionamiento anormal de la médula ósea los pacientes pueden presentar anemia y un riesgo aumentado de padecer infecciones, debido a que afecta al correcto funcionamiento del sistema inmune.³ El mal funcionamiento del sistema inmune permite, además, el crecimiento tumoral gracias al escape inmunitario.¹ A su vez, se ven afectados los mecanismos de renovación del hueso, ya que las células de MM estimulan la actividad osteolítica, lo que provoca su descalcificación generando las llamadas lesiones líticas, que dan lugar a un intenso dolor óseo interno, un incremento del riesgo de fracturas espontáneas y un aumento del calcio en sangre (hipercalcemia).^{3,4}

3.2 TRATAMIENTO ACTUAL FRENTE AL MIELOMA MÚLTIPLE

Respecto al tratamiento, debe individualizarse teniendo en cuenta la situación clínica, edad y el pronóstico de los pacientes. Además, se debe valorar el balance entre el riesgo de toxicidad por el tratamiento y el beneficio esperado.¹ En los últimos 20 años se han desarrollado nuevos tratamientos, siendo los agentes más utilizados hasta 2023 los inhibidores del proteasoma (IPs) (bortezomib, carfilzomib e ixazomib), los fármacos inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida y pomalidomida) y, en los últimos años, los anticuerpos monoclonales como el daratumumab e isatuximab, frente a CD38, y el elotuzumab, dirigido contra SLAMF7.⁵

La efectividad de los IPs está basada en la exacerbada actividad secretora que presentan las células de MM, lo que las hace muy dependientes de la degradación de proteínas por la vía del proteasoma.⁶ Cuando las proteínas presentan un plegamiento anormal se acumulan en el retículo endoplasmático (RE), lo que activa la respuesta a proteínas desplegadas (RPD), que, entre otras acciones, promueve la degradación de estas proteínas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, en ocasiones, la acumulación de proteínas mal plegadas puede persistir, excediendo la capacidad del RE, lo que lleva a un estrés irresoluble que deriva en la apoptosis.⁷ Este efecto es en el que se basa el mecanismo de acción de los IPs como tratamiento antitumoral, bloquean la degradación de las proteínas mal plegadas resultantes de la síntesis de la proteína M, provocando la activación de la RPD, que no se puede ejecutar de manera adecuada por la inhibición del proteasoma, generando estrés en el RE e induciendo la apoptosis.⁸

En cuanto a los inmunomoduladores, actúan provocando la ubiquitinación de proteínas clave para las células de MM a través de su unión a cereblon (CRBN), la proteína que sirve como el receptor de sustratos y dicta la especificidad del complejo CRL4-CRBN E3 ubiquitin ligasa (CRL4^{CRBN}). Este complejo, formado por las proteínas ROC1, CUL4, DDB1 y CRBN (**Figura 1**), está implicado en la degradación de proteínas por la vía del proteasoma, determinando la especificidad para la ubiquitinación.⁹

En condiciones fisiológicas CRL4^{CRBN} ubiquitina una gran cantidad de sustratos endógenos que regulan el metabolismo, la proliferación y la diferenciación celular.⁹ Cuando los inmunomoduladores se unen a CRBN alteran su afinidad de sustrato haciendo que CRL4^{CRBN} se una a nuevos sustratos (**Figura 1**), que serán ubiquitinados y degradados por la vía del proteasoma.¹⁰ Estos neosustratos pueden ser Ikaros (IKZF1) y Aiolos (IKZF3), factores de transcripción asociados con la patogénesis del MM, que regulan el factor 4 del interferón (IRF4) y el proto-oncogén c-MYC, necesarios para la supervivencia y proliferación de las células de MM,¹¹ o la caseína quinasa 1α (CK1α), enzima con actividad anti-apoptótica y estimuladora del crecimiento celular en las malignidades de células B.⁹

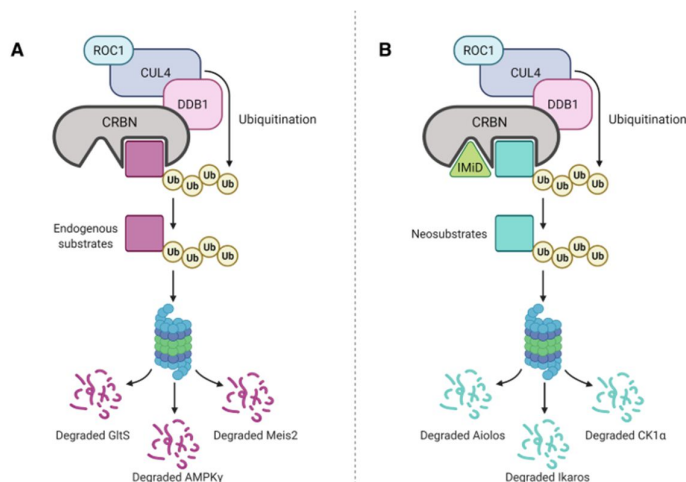


Figura 1. Comparación entre la especificidad de sustrato de CRL4^{CRBN} en condiciones fisiológicas (A) y en presencia de un inmunomodulador (IMiD) (B). Fuente:⁹

Respecto a los anticuerpos monoclonales, como ya se ha mencionado algunos anticuerpos se dirigen contra CD38 o SLAMF7, sobreexpresados en MM. La unión del anticuerpo a estas moléculas activa múltiples mecanismos de citotoxicidad, como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC).¹¹

Tras un periodo de remisión del MM gracias a la terapia, la gran mayoría de los pacientes sufrirá una recaída en algún momento de la enfermedad.¹ Además, tras la recaída casi todos presentan una enfermedad quimiorresistente (mieloma múltiple refractario recidivante o MMRR).¹² El uso de los fármacos mencionados en terapias triples o cuádruples, en combinación entre ellos o también con glucocorticoides como la dexametasona, favorece periodos de remisión más largos y se encuentran entre los tratamientos de elección tanto en el MM de nuevo diagnóstico como en el MMRR.^{5,13}

Aunque los tratamientos mencionados han conseguido alargar la esperanza y calidad de vida de los pacientes de MM, es una enfermedad que sigue siendo, por el momento, incurable. Es precisamente aquí donde reside la necesidad de encontrar nuevos fármacos que permitan la total recuperación de los que la padecen.¹

3.3 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte celular es un proceso esencial para mantener el equilibrio entre la proliferación y la muerte en los organismos pluricelulares. La mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento del MM actúan induciendo la muerte celular, por lo que conocer los mecanismos que la regulan podría ser interesante para predecir la respuesta al tratamiento o para diseñar nuevas terapias que eviten las resistencias.¹¹

De acuerdo con el NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) una célula se considera muerta si presenta al menos uno de los siguientes criterios: (1) ha perdido su integridad de membrana, lo que debe ser corroborado con colorantes vitales; (2) se ha fragmentado por completo en cuerpos apoptóticos, incluyendo su núcleo, y/o (3) los restos celulares o los cuerpos apoptóticos han sido absorbidos por células adyacentes *in vivo*.¹⁴

En función de las características inmunológicas y morfológicas y de criterios enzimológicos y funcionales podemos definir distintos tipos de muerte celular, siendo los principales mecanismos la necrosis y la apoptosis.¹⁴ Aunque algunos autores incluyen en esta categoría la autofagia, no se tiene claro si puede incluirse, puesto que generalmente se considera un mecanismo de supervivencia celular.¹⁵

3.3.1 Necrosis

La necrosis se caracteriza morfológicamente por el aumento del volumen tanto de los orgánulos como de las células, la liberación al espacio extracelular de moléculas que estimulan la respuesta inmunitaria y la reparación de heridas y la pérdida de la integridad de membrana sin condensación nuclear, con la consecuente pérdida del contenido intracelular.^{16,17} Aunque durante mucho tiempo ha sido considerada un tipo de muerte celular desordenada, recientemente se ha descubierto que está regulada en procesos como la necroptosis. La necroptosis actúa como una vía alternativa de la muerte celular en casos en los que la apoptosis no puede ser llevada a cabo debido a la presencia de inhibidores de caspasas naturales, como en una infección viral, o sintéticos.¹⁶

3.3.2 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada en el que las células que ya no son necesarias o se encuentran dañadas se suicidan. Se trata de un proceso altamente conservado que puede actuar mediante dos vías de señalización, la vía extrínseca o la vía intrínseca,¹⁸ con una morfología asociada caracterizada por la condensación nuclear y citoplasmática y la fragmentación de la célula en los llamados cuerpos apoptóticos.¹⁹

En la vía extrínseca, también conocida como la ruta de receptores mortales, la activación se produce principalmente por la unión de ligandos extracelulares (FasL/CD95L, TNF α , TRAIL/Apo2L) a un subgrupo de receptores de membrana del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Fas, TNFR1 y TRAIL).^{18,20} Por su parte, la vía intrínseca o ruta mitocondrial se activa en respuesta a daños por estrés intracelular y depende de las mitocondrias y de las proteínas de la familia BCL-2 (B cell Lymphoma-2).¹⁸

Ambas rutas desembocan en la activación de las caspasas, que median la fragmentación celular, permitiendo a las células adyacentes llevar a cabo la fagocitosis.¹⁸ En aquellos casos en los que la

fagocitosis no se lleva a cabo, como en el cultivo *in vitro*, los cuerpos apoptóticos pueden perder su integridad, provocando una necrosis secundaria o apoptosis necrótica.^{19,21}

3.3.2.1 Caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas con especificidad de corte en aspártico implicadas en el proceso de la apoptosis.¹⁸

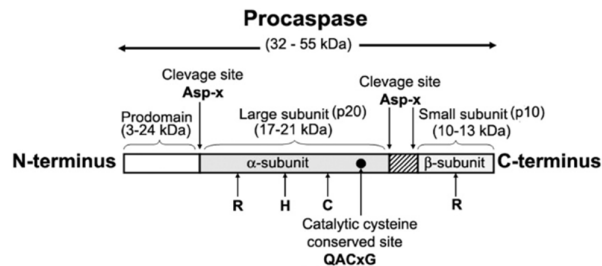


Figura 2. Estructura general de las procaspasas, donde R, H y C representan los residuos del sitio activo. Fuente: ⁵⁷

En cuanto a su estructura, presentan tres dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande (p20) donde se encuentra el centro activo, que presenta el residuo de cisteína que participa en el corte en aspártico, y una subunidad pequeña (p10) en el extremo C-terminal (Figura 2).²²⁻²⁴

Existen dos tipos de caspasas, las iniciadoras, cuya función es activar a las caspasas ejecutoras, y las ejecutoras, que son las que ejercen la función proteolítica sobre otros sustratos que participan en las distintas vías de la apoptosis.^{25,26} Ambas clases de caspasas se expresan en forma de precursores constitutivamente inactivos llamados zimógenos o pro-caspasas, por lo que deben sufrir un proceso de activación para ejercer su actividad. La activación se produce en ambos casos gracias al procesamiento en un residuo de aspártico que separa las subunidades grande y pequeña, pero se ejecuta de forma diferente en función del tipo de caspasas.²⁷ Las caspasas iniciadoras, que se expresan en forma de monómero, se activan por la unión a proteínas adaptadoras a través de un dominio efector de muerte (DED) o un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD). Esta unión a las proteínas adaptadoras forma un complejo activador que acerca las pro-caspasas, permitiendo su dimerización y activación por autocatálisis. Por su parte, en las caspasas ejecutoras, expresadas en forma de dímeros, la activación se lleva a cabo por proteólisis mediada por las caspasas iniciadoras.²⁸

3.3.2.2 Vía intrínseca

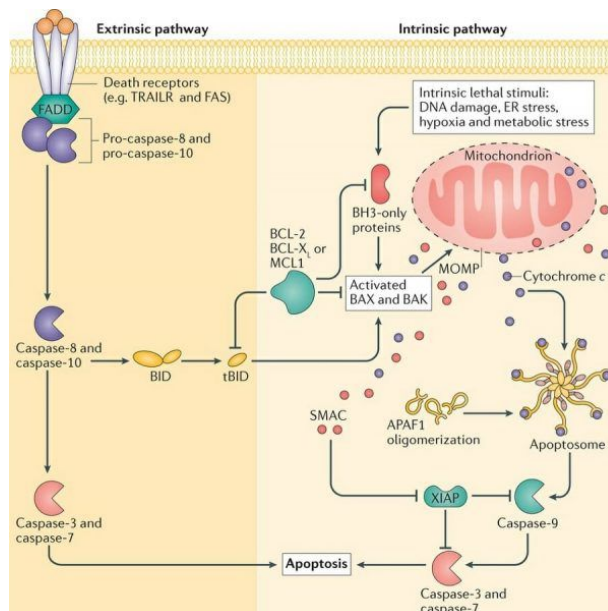


Figura 3. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Fuente:⁵⁸

Se encuentra regulada por las proteínas de la familia BCL-2 y la mitocondria. La familia de proteínas BCL-2 recoge a la proteína BCL-2 y otras proteínas con una estructura similar que se dividen en dos grupos principales: **anti-apoptóticas** (como BCL-2) y **pro-apoptóticas** (como Bax y Bak); dentro de estas últimas se encuentra un subgrupo denominado BH3-only.²⁹

Frente a una señal de estrés las proteínas BH3-only (BIM, BID y PUMA) liberan a las proteínas anti-apoptóticas, que en células sanas inhiben de manera constitutiva la acción de Bax y Bak en las células, lo que resulta en la activación de estas últimas

(Figura 3). Esto permite su oligomerización mediante un cambio alostérico y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), lo que resulta en la salida de factores apoptogénicos (citocromo C, SMAC/DIABLO, etc.) al citosol.²⁹

Estos factores participan en la ejecución de la apoptosis mediante varias vías. El citocromo C activa la cascada de las caspasas de forma directa mediante su unión a APAF-1, que recluta a la caspasa-9, formando un complejo proteico conocido como apoptosoma. Este complejo permite la activación de la caspasa-9, que a su vez activa a las caspasas-3, 6 y 7, que provocan la muerte celular.²⁹ Por su parte, SMAC/DIABLO neutraliza a las proteínas inhibidoras de las caspasas XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), liberando las caspasas-3, 7 y 9, que pueden entonces ejercer su acción **(Figura 3)**.¹⁸

La inhibición de BAX y BAK en diversos estudios ha demostrado la inhibición de la vía apoptótica intrínseca, lo que demuestra el papel esencial que tienen ambas proteínas en dicho proceso.³¹

3.3.2.3 Vía extrínseca

Esta vía se activa principalmente por la unión de ligandos a receptores de membrana, lo que lleva a la transducción de la señal de muerte donde actúan las proteínas adaptadoras y las caspasas. Esta transducción varía según el tipo celular.³²

En células de tipo I **(Figura 3)** FasL se une al receptor Fas-CD95, que se asocia con la proteína FADD, que se une a la pro-caspasa-8 a través de su dominio DED, formando el complejo de señalización inductora de muerte (DISC). La formación de este complejo resulta en la escisión autoproteolítica de la procaspasa-8, lo que induce su activación iniciando una cascada de señalización que desemboca en la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7, desencadenando la señal definitiva de apoptosis.³³

En células de tipo II (Figura 3) DISC presenta una baja expresión, por lo que las caspasas activan a BID, proteína pro-apoptótica BH3-only, formando tBID (BID truncado). Esto conecta con la vía mitocondrial mediante la activación de Bax y Bak, puesto que en este caso la vía extrínseca no resulta suficiente para desencadenar la apoptosis final.³³

3.3.2.4 Evasión de la apoptosis y cáncer

La evasión de la apoptosis provoca una alteración de la homeostasis que puede desencadenar la aparición de enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y, primordialmente, cáncer.¹⁸

Las células tumorales presentan diferentes vías para la evadir la apoptosis, pero las más empleadas son: la sobreexpresión y alta translocación a la membrana externa de la mitocondria desde el citosol de proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2, y la inactivación o reducción en los niveles de proteínas pro-apoptóticas.¹⁸ Por todo lo expuesto, este tipo de proteínas son dianas muy prometedoras en el desarrollo de tratamientos antitumorales, especialmente en neoplasias hematológicas, debido a que las alteraciones en las proteínas de la familia BCL-2 son muy frecuentes en este tipo de neoplasias.³⁴

3.4 FÁRMACOS ANTITUMORALES EN ANÁLISIS

En este trabajo se pretende evaluar la capacidad de fármacos con diferentes mecanismos de acción para inducir la muerte celular cuando la vía intrínseca se encuentra bloqueada. Se

ensayaron un total de cinco fármacos: silmitasertib, selinexor, doxorrubicina, sorafenib e iberdomide. A continuación, se detalla el mecanismo de acción de cada uno de ellos.

3.4.1 Silmitasertib o CX-4945

Se trata de un potente inhibidor competitivo del ATP de la caseína quinasa 2 (CK2), proteína que se encuentra sobreexpresada en numerosos cánceres de tipo hematológico, entre los que se encuentra el MM.³⁵

La CK2 es una serín/treonín quinasa que modula diferentes vías de señalización involucradas tanto en el funcionamiento como en la supervivencia de las células hematopoyéticas. Por todo ello se posiciona como una diana prometedora para los tratamientos contra este tipo de malignidades.³⁵

Se trata de una proteína expresada de forma constitutiva en numerosos tipos celulares que en humanos consta de dos subunidades catalíticas (α y α') y dos subunidades reguladoras (β).³⁶ Se cree que el mecanismo de acción del silmitasertib está basado en su capacidad para establecer fuertes interacciones polares con la subunidad catalítica CK2 α activa en el bolsillo de unión a ATP. Aunque se conoce que esta unión reduce la actividad enzimática y atenúa las vías de señalización reguladas por la CK2, la relación entre el silmitasertib y sus efectos sobre la supervivencia de las células tumorales todavía no ha sido totalmente elucidada.³⁵

3.4.2 Selinexor

Es un inhibidor de la exportación nuclear que inhibe la exportina 1 (XPO1), sobreexpresada en una gran variedad de cánceres, entre los que se encuentra el MM.³⁷ XPO1 es la responsable del transporte de 220 proteínas nucleares al citoplasma a través de los poros nucleares, entre las que se incluyen proteínas supresoras de tumores (TSPs),⁵ que dejan de tener actividad, lo que provoca una alteración de las señales de crecimiento y un aumento de las señales anti-apoptóticas.³⁸

Respecto al mecanismo de acción del selinexor, la inhibición de XPO1 afecta a las células tumorales a través de tres mecanismos principales: aumenta los niveles nucleares y la activación de las TSPs, reduce la expresión de ciertas oncoproteínas sobreexpresadas en MM, como c-MYC o MDM2, atrapando el mRNA de éstas en el núcleo, y contiene la actividad del receptor de glucocorticoides en el núcleo.^{37,38}

A través de estos mecanismos, el fármaco presenta actividad anti-MM, demostrada en ensayos preclínicos y clínicos, tanto en solitario como combinado con otras terapias.⁵ De hecho, el selinexor fue aprobado por la FDA como terapia para el tratamiento del MMRR en combinación sólo con dexametasona o con dexametasona y bortezomib en julio de 2019.³⁹

3.4.3 Doxorrubicina

La doxorrubicina es un antibiótico antraciclínico producido por *Streptomyces peucetius* var. *caesius* que se ha utilizado de forma rutinaria desde la década de 1960 para el tratamiento de una gran cantidad de cánceres, entre los que se encuentra el MM.⁴⁰

Se han propuesto dos mecanismos de acción por los que la doxorrubicina ejerce su acción antitumoral. Por un lado, mediante la intercalación en el DNA, interfiere con la replicación del DNA, la síntesis de RNA y el mecanismo de reparación del DNA mediado por la topoisomerasa II, lo que provoca daño en el DNA y la muerte celular. Por otro lado, mediante la generación de

especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar la peroxidación de lípidos, daño en la membrana, daño en el DNA, estrés oxidativo y puede inducir la apoptosis de las células tumorales.⁴¹

3.4.4 Sorafenib

Es un fármaco antitumoral aprobado para su uso como tratamiento de algunos tipos de cánceres como el carcinoma renal avanzado y el cáncer hepático.⁴² El sorafenib inhibe la proliferación tumoral y la angiogénesis a través de la inhibición de tirosín quinasas como la familia de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR 1,2,3) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), que tienen un rol primordial en la angiogénesis y progresión tumoral.^{42,43} Además, inhibe también a una serie de serín/treonín quinasas entre las que se encuentra RAF1, que interviene en la vía de las MAPK y es una quinasa clave en el control de una gran variedad de funciones celulares primordiales, como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la apoptosis^{44,45}, de manera que la inhibición de RAF1 conlleva la inhibición de la proliferación tumoral y de la apoptosis.⁴⁴

3.4.5 Iberdomide o CC-220

Es un fármaco con actividad antitumoral e inmunoestimuladora que se une a CRBN. Funciona como un fármaco inmunomodulador (**Apartado 3.2**), que cambia la especificidad de CRL4^{CRBN} haciendo que ubiquitine dos factores de transcripción asociados con la patogénesis del MM, IKZF1 e IKZF3, que serán degradados en el proteasoma.⁴⁶ Iberdomide presenta una mayor afinidad de unión al CRBN en comparación con la lenadomida y otros inmunomoduladores y una mayor potencia de degradación de IKZF1 e IKZF3, lo que podría permitir superar las resistencias a los inmunomoduladores en algunas líneas de MM.¹¹

4 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, pese a las terapias disponibles, el MM continúa siendo una enfermedad incurable con un alto riesgo de recaída en forma de MMRR.^{1,12} Sabiendo que los fármacos empleados en el tratamiento del MM inducen en su mayoría la muerte celular,¹¹ el conocimiento de los mecanismos moleculares por los que se regula podría ser de ayuda para predecir la respuesta al tratamiento y evitar la aparición de resistencias.

En trabajos anteriores del grupo se había observado que determinados fármacos como los inhibidores del proteasoma o el sorafenib pueden inducir muerte celular independiente de caspasas o de Bax y Bak, dependiendo del contexto celular. Por ejemplo, en células Jurkat-shBak (línea celular de leucemia linfocítica aguda que no expresa ni Bax ni Bak) se observó que el sorafenib inducía muerte celular.⁴⁷ Sin embargo, estas células son muy resistentes a la doxorrubicina.⁴⁸ En MM, por su parte, resultados previos mostraban que las células deficientes en Bax y Bak todavía son sensibles a los inhibidores del proteasoma como el ixazomib.⁴⁹ Además, también se han realizado ensayos con otros fármacos como el silmitasertib, que fue capaz de inducir apoptosis dependiente o independiente de caspasas sobre distintas líneas de MM,⁵⁰ y con el selinexor. En este trabajo se ha continuado con estos estudios y se ha evaluado el efecto de los fármacos silmitasertib, selinexor, doxorrubicina, sorafenib e iberdomide sobre las líneas MM.1S Bax/Bak KO y su correspondiente control, MM.1S LentiCRISPR Ø.

Este trabajo pretende aportar información nueva sobre el mecanismo por el que los fármacos evaluados actúan como antitumorales para completar la información obtenida de los ensayos previamente mencionados. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto de los fármacos antitumorales doxorubicina, iberdomide, silmitasertib, selinexor y sorafenib sobre la proliferación y supervivencia de las líneas MM.1S Bax/Bak KO y MM.1S LentiCRISPR Ø.
2. Conocer los mecanismos de muerte celular por los que actúan dichos fármacos a través de la comparación de sus efectos sobre ambas líneas celulares.
3. Estudiar el papel de las caspasas en el mecanismo de acción de estos fármacos antitumorales empleando inhibidores de caspasas, tanto generales como específicos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR

Durante la realización de este trabajo se usaron dos líneas celulares generadas en nuestro laboratorio por el Dr. Manuel Beltrán Visiedo y el Dr. Alfonso Serrano Del Valle a partir de la línea celular MM.1S (RRID:CVCL_8792).⁵¹ Ésta es una línea celular sensible a dexametasona derivada de la línea celular parental MM.1, que fue establecida a partir de sangre periférica de una paciente de 42 años que había desarrollado resistencia a la terapia basada en esteroides. Las líneas derivadas de ésta utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- **MM.1S Bax/Bak KO:** Se trata de una línea celular que no expresa ni Bax ni Bak, por lo que la vía intrínseca de la apoptosis en estas células se encuentra constitutivamente inhibida. A pesar de crecer en suspensión, presentan una leve adherencia a los frascos de cultivo, característica que se debe tener en cuenta durante su manejo.
- **MM.1S LentiCRISPR Ø:** Línea celular derivada de la línea MM.1S, transfectada de manera estable con el vector LentiCRISPR sin secuencias guía.

El cultivo de ambas líneas celulares se realizó en medio de cultivo RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco), suplementado con un 1% de una mezcla antibióticos (estreptomicina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml, Sigma-Aldrich) y con un 10 o un 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma Aldrich).

Las células en cultivo se mantuvieron a 37°C al 5% del CO₂ en un incubador termostatzado (Hareus Heracell 150i, Thermo) y su manipulación se llevó a cabo siempre en condiciones de esterilidad, lo que incluye tanto el espacio en el que se realizaban los procedimientos (campana de seguridad biológica de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P)), como el material usado durante el desarrollo de los mismos, utilizando siempre material de plástico estéril o material esterilizado con autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta).

Además, periódicamente se llevó a cabo la determinación de la densidad y viabilidad celular, necesaria tanto para la realización de experimentos como de subcultivos, con previa observación del estado de las células al microscopio invertido (Eclipse Ts2, Nikon).

5.1.1 Determinación de la densidad y viabilidad celular

Para determinar la densidad y viabilidad celular se empleó el colorante azul tripán (Sigma-Aldrich) y el conteo con la cámara de Neubauer (Brand). El azul tripán es un colorante que solamente penetra en las células con la membrana celular dañada, por lo que permite distinguir entre células viables (blancas, no teñidas) y no viables (azules, teñidas).

La tinción se realizó mezclando 50 μ l de azul trypan con 50 μ l de un cultivo previamente resuspendido con una pipeta serológica (Corning Inc.). En el caso de las células MM.1S Bax/Bak KO, antes de resuspender se rasó la superficie del frasco de cultivo con un rascador (TPP) para desprender las células adheridas. Tras la tinción se introdujeron aproximadamente 10 μ l de la mezcla del colorante y las células en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo con el microscopio óptico (Eclipse 50i, Nikon). Una vez obtenido el número de células viables y no viables se determinó la densidad y viabilidad de los cultivos utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad celular (cél/ml)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células viables} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

Donde el factor de dilución es 2, porque la mezcla entre la suspensión celular y el azul tripán se realizó en una proporción 1:1, y 10^4 corresponde con un factor de corrección de volumen de la cámara.

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

La determinación de la viabilidad y densidad celular precedió a todos los experimentos que aparecen en este trabajo y todos se realizaron partiendo de una viabilidad de los cultivos superior al 85%, para asegurar que los efectos observados sobre la proliferación y la muerte celular se debían al fármaco y no a condiciones propias del cultivo.

5.1.2 Criopreservación

Para poder disponer de las células sin mantenerlas continuamente en cultivo se llevó a cabo la criopreservación de viales de ambas líneas celulares. Se tomó el volumen de cultivo necesario para tener aproximadamente 6×10^6 células totales, se centrifugó 5 minutos a 149xg y el pellet se resuspendió en una mezcla de 900 μ l de SFB y 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), usado como agente crioprotector. Esta suspensión se introdujo en un criotubo (NUNC Cell Culture), que se llevó rápidamente al congelador de -80°C para evitar los efectos tóxicos del DMSO sobre las células. Tras mínimo 24 horas a -80°C , el criotubo se introdujo en nitrógeno líquido para mejorar la preservación.

Para establecer nuevos cultivos a partir de células criopreservadas, se extrajo un vial del nitrógeno líquido y una vez descongelado el contenido, las células se trasvasaron a un tubo que contenía 10 ml de medio RPMI 1640 + 10% SFB. Después, se centrifugó el tubo 5 minutos a 149xg y se resuspendió el pellet de células en un volumen adecuado de medio RPMI 1640 + 15% SFB, que al presentar un mayor porcentaje de SFB favorece la recuperación del cultivo. Finalmente, la suspensión celular se traspasó a un frasco de cultivo (TPP). Durante los días siguientes, se determinó periódicamente la densidad y viabilidad celular. Una vez ambos parámetros alcanzaron valores óptimos, se cambió el cultivo a medio suplementado con 10% de SFB y comenzaron los experimentos.

5.2 ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA MUERTE CELULAR MEDIANTE CURVAS DOSIS-RESPUESTA

5.2.1 Determinación de la proliferación celular mediante MTT

El método utilizado para determinar cómo afecta cada uno de los fármacos a la supervivencia y proliferación celular fue desarrollado originalmente por Mossman y modificado por Denizot y Lang.⁵² Este método se basa en la capacidad que presentan las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT), generando cristales de azul de formazán, que son insolubles en medio acuoso. Únicamente las células que presentan un metabolismo activo son capaces de transformar el MTT en azul de formazán, por lo que la cantidad de cristales generada es directamente proporcional al número de células viables y metabólicamente activas en un pocillo, pero este método no permite diferenciar entre el efecto citotóxico y el citostático que puedan tener los fármacos.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron por cuadruplicado para cada línea y dosis de fármaco 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l, en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning Inc.). Las dosis ensayadas de cada fármaco fueron las siguientes: doxorubicina (25, 50, 100, 150, 250, 500, 1000 nM), iberdomide (10, 20, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1000 nM), selinexor (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 nM), silmitasertib (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7,5, 10 μ M) y sorafenib (1, 2,5, 4, 5, 6, 7,5, 10, 15, 20 μ M). Se sembró también, a modo de control, una línea de pocillos con células y sin fármaco y una línea de pocillos sólo con medio de cultivo, que se utilizó como blanco en el análisis de resultados. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas en todos los casos menos con el iberdomide, donde la incubación fue de 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el revelado mediante la adición de 10 μ l de MTT (5 mg/ml) por pocillo usando una pipeta de repetición y se incubó la placa durante 2 horas a 37°C. Tras este tiempo los cristales de azul de formazán, visibles a simple vista, se disolvieron. Para ello, y dado que se trata de células en suspensión, en primer lugar, se centrifugó la placa a 3720xg durante 20 minutos para que las células se depositasen en el fondo de la misma. Posteriormente, se retiraron 50 μ l de medio de cada uno de los pocillos con la pipeta multicanal para reducir las interacciones entre el disolvente y el medio de cultivo y facilitar la disolución de los cristales, que se realizó añadiendo 100 μ l/pocillo de isopropanol/HCl 0,05 M y colocando la placa en un agitador de placas (Bioblock, Francia).

Finalmente, se llevó a cabo la medida de la absorbancia a 550 nm de cada pocillo en un lector de placas ELISA (EZ Read 400, Biochrom). Los resultados se representaron en forma de porcentaje de crecimiento respecto al control, al que se le asignó el valor del 100%. Dicha representación, además de la interpretación y análisis estadístico de los resultados obtenidos, se realizó con el programa GraphPad Prism 8.0.1.

5.2.2 Determinación de la muerte celular por citometría de flujo

La determinación de la muerte celular mediante el marcaje con Anexina V-FITC y 7-AAD o Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) y el posterior análisis por citometría de flujo ha tenido una gran importancia en la realización de este trabajo. Estos ensayos permitieron complementar la información obtenida con el MTT, que no permite distinguir el efecto citostático del efecto citotóxico, mientras que el análisis de la muerte celular por citometría de flujo sí que permite realizar esta distinción.

Para realizar las curvas dosis-respuesta, se sembraron por duplicado para cada línea celular y concentración de fármaco, además del control, 150.000 células/pocillo en un volumen de 500 μ l de medio completo en placas de 48 pocillos de fondo plano (Corning Inc.). Posteriormente, se añadieron los volúmenes de fármaco correspondientes para conseguir las dosis de interés, que fueron las siguientes para cada fármaco: doxorrubicina (500, 1000 nM), iberdomide (10, 250 nM), selinexor (1000 nM), silmitasertib (2, 5, 10 μ M) y sorafenib (1, 5, 10 μ M). Las placas se incubaron a 37°C al 5% CO₂ durante 24 horas en todos los casos menos con el iberdomide, con el que se incubaron 48 horas. Tras la incubación se llevó a cabo la cuantificación de la muerte celular por citometría de flujo.

Además, se realizaron curvas dosis-respuesta con células tratadas con inhibidores sintéticos de caspasas, generales (Z-VAD-fmk) o específicos de la caspasa 8 (Z-IETD-fmk), ambos de MedChemExpress. En este caso se prepararon dos suspensiones celulares de cada una de las líneas y a una de ellas se le añadió el volumen de inhibidor necesario para obtener una concentración de 50 μ M. Respecto a la siembra, se realizó de la misma manera que la indicada en el párrafo anterior, pero antes de añadir el volumen de fármaco las células se preincubaron durante 1 hora a 37°C al 5% de CO₂. Finalmente, se incubó la placa 24 horas en las mismas condiciones y se procedió a la cuantificación de la muerte celular por citometría de flujo.

La cuantificación de la muerte celular se llevó a cabo en los primeros experimentos mediante el marcaje con Anexina V conjugada con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) (λ_{ex} = 490 nm; λ_{em} = 525 nm) y 7- aminoactinomicina D (7-AAD, Biolegend) (λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 650 nm). La Anexina V es una molécula que se une con gran afinidad al fosfolípido fosfatidilserina (PS), que sufre un proceso de translocación de la hemicapa celular interna a la hemicapa celular externa durante la apoptosis, facilitando la fagocitosis de la célula muerta. La unión de la Anexina V conjugada con el fluoróforo FITC, que cuando se excita emite fluorescencia verde, nos permite determinar la cantidad de células que exponen PS, es decir, que son apoptóticas. Por otra parte, el 7-AAD es una sonda que se une al DNA y que sólo es capaz de entrar en las células que presentan la membrana plasmática dañada. Cuando se excita emite fluorescencia roja y se utiliza como marcador de necrosis celular, por lo que complementa la información obtenida mediante el marcaje con Anexina V-FITC.

Para llevar a cabo el marcaje con Anexina V-FITC y 7-AAD se preparó una mezcla de 50 μ l/muestra de ABB 1X (*Annexin Binding Buffer*; Hepes/NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM), 1 μ l/muestra de 7-AAD y 0,15 μ l/muestra de Anexina V-FITC (elaborada en el laboratorio usando el protocolo descrito por Logue⁵³). De esta mezcla se añadieron 50 μ l a cada uno de los pocillos sembrados y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo se resuspendió bien el contenido de cada uno de los pocillos, se pasó a tubos de citómetro (Falcon™) previamente rotulados y se analizó en el citómetro de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences).

En el caso de la doxorrubicina, el marcaje se realizó de una forma diferente, las longitudes de emisión del 7-AAD y del propio fármaco se superponen en el color rojo, por lo que se realizó el marcaje eliminando el medio de cultivo para reducir dichas interferencias. De esta manera, en los ensayos con este fármaco se pasó el contenido de los pocillos a tubos rotulados, que se centrifugaron durante 5 minutos a 335xg. Posteriormente se eliminó el sobrenadante mediante aspiración con bomba de vacío y se resuspendieron las células en 100 μ l de una mezcla de marcaje compuesta por 100 μ l/muestra de ABB 1X, 1 μ l/muestra de 7-AAD y 0,15 μ l/muestra de Anexina V-FITC. Finalmente se incubaron los tubos en oscuridad a temperatura ambiente durante 10

minutos, se añadieron 200 μ l PBS (Phosphate Buffered Saline) para aumentar el volumen de muestra y se analizaron en el citómetro.

Por otro lado, para las curvas dosis-respuesta con células tratadas con inhibidores de caspasas, se realizó un marcaje con DiOC₆(3) y Anexina-DY634 (también elaborada en el laboratorio). El DiOC₆(3) es una sonda lipofílica catiónica que difunde por el citosol y se acumula en la matriz mitocondrial debido a su potencial eléctrico negativo, producido como consecuencia del transporte de electrones en la cadena respiratoria. Cuando se produce la muerte celular, se interrumpe la fosforilación oxidativa, por lo que el potencial decae y, entonces, la sonda no se acumula. Como el DiOC₆(3) es un colorante verde la emisión se solaparía con la de la Anexina-FITC, así que se utilizó en su lugar Anexina V-DY634, que emite fluorescencia roja.

Para llevar a cabo este marcaje se añadió DiOC₆(3) a una concentración final de 10 nM en cada uno de los pocillos sembrados y se incubó la placa durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se resuspendió el contenido de cada uno de los pocillos y se pasó a tubos de citometría correctamente rotulados, se centrifugó 5 minutos a 335xg y se eliminó el sobrenadante mediante aspiración con bomba de vacío. Después, el pellet se resuspendió en 100 μ l de una mezcla de marcaje compuesta por 100 μ l/muestra de ABB 1X y 0,02 μ l/muestra de Anexina V-DY634. Finalmente, se incubaron los tubos 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ l de PBS y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

Los datos obtenidos de la citometría de flujo se analizaron usando el programa FlowJo, versión 7.6, y la representación, interpretación y análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism 8.0.1. En anexos se encuentra un ejemplo de la interpretación de los resultados de la citometría de flujo, tanto del marcaje realizado con Anexina V-FITC y 7-AAD, (**Figuras A1 y A2**) como del realizado con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) (**Figuras A3 y A4**).

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1. Se llevó a cabo un *test t de Student* despareado de dos colas considerando varianzas diferentes para determinar si existía una diferencia significativa entre las medias de los dos grupos comparados. Se asignaron diferentes valores de significancia en función del p-valor obtenido.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EFECTO DE LOS FÁRMACOS ENSAYADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Durante el desarrollo del presente trabajo se pretendía evaluar la actividad de los fármacos antitumorales ensayados sobre las líneas celulares MM.1S Bax/Bak KO y MM.1S LentiCRISPR \emptyset . Para ello, se realizó en primer lugar un cribado de los fármacos para determinar cuáles eran capaces de disminuir la proliferación celular. Los resultados demostraron que todos los fármacos son capaces de interrumpir la proliferación en ambas líneas celulares. Sin embargo, no todos producen el mismo efecto sobre el crecimiento de las células.

En el caso del **iberdomide (Figura 4)**, aunque las MM.1S Bax/Bak KO mantienen un mayor porcentaje de crecimiento que las MM.1S LentiCRISPR \emptyset a todas las concentraciones de fármaco ensayadas, en ambos casos se alcanza rápidamente una asíntota, es decir, dosis pequeñas de iberdomide (10 nM) son suficientes para detener el crecimiento celular de ambas líneas. Sin

embargo, tras la bajada inicial, el número de células viables se mantiene estable incluso con dosis altas, por lo que posiblemente se trate de un citostático, es decir, es capaz de inhibir el crecimiento, pero no de inducir la muerte celular.

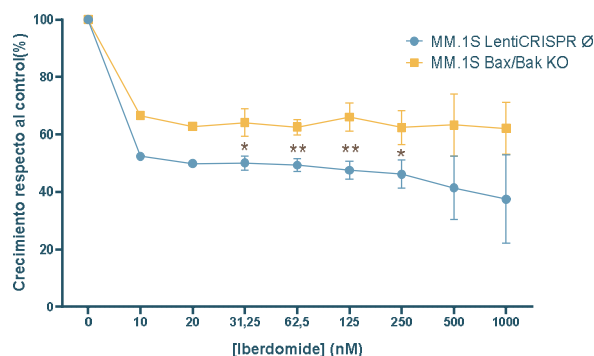


Figura 4. Determinación de la proliferación celular respecto al control tras el tratamiento con iberdomide. Las líneas MM.1S Bax/Bak KO (Naranja) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Azul) se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de iberdomide (0 a 1000 nM) durante 48 horas. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de iberdomide. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Respecto a la **doxorubicina (Figura 5)**, aunque en ambas líneas se puede ver un descenso del crecimiento respecto al control, hay ligeras diferencias en la forma de las curvas que muestran que las MM.1S Bax/Bak KO tienen una resistencia mayor al fármaco que las MM.1S LentiCRISPR Ø, de manera que a una concentración de doxorubicina de 1000 nM la proliferación de las primeras respecto al control se mantiene por encima del 40%, mientras que en las segundas es muy inferior al 20%. No obstante, es a partir de 250 nM cuando se hace especialmente notable la diferencia entre ambas líneas, puesto que en el caso de las MM.1S Bax/Bak KO a partir de dicha concentración no se observa una disminución adicional de la cantidad de células viables, pero en la línea control continúa bajando hasta llegar prácticamente a 0. Sin embargo, no es hasta que se alcanza la concentración de 500 nM que las diferencias se vuelven estadísticamente significativas.

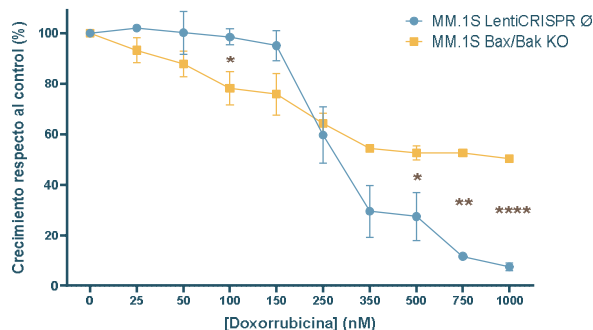


Figura 5. Determinación de la proliferación celular respecto al control tras el tratamiento con doxorubicina. Las líneas MM.1S Bax/Bak KO (Naranja) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Azul) se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de doxorubicina (0 a 1000 nM) durante 24 horas. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de doxorubicina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$.

Por su parte, el **Selinexor (Figura 6)** afecta considerablemente a las células de ambas líneas, puesto que a 1000 nM el porcentaje de crecimiento respecto al control se encuentra en torno al 40% para las MM.1S Bax/Bak KO y en torno al 20% para las MM.1S LentiCRISPR Ø. Sin embargo,

es importante mencionar que, en este caso, las MM.1S LentiCRISPR Ø sufren una caída de proliferación más lenta pero más pronunciada, es decir, dosis bajas de fármaco casi no tienen efecto sobre ellas, pero a partir de 125 nM sufren una importante disminución del crecimiento. Por su parte, las MM.1S Bax/Bak KO se ven más afectadas a concentraciones bajas de fármaco, pero se mantienen más estables conforme dicha concentración aumenta.

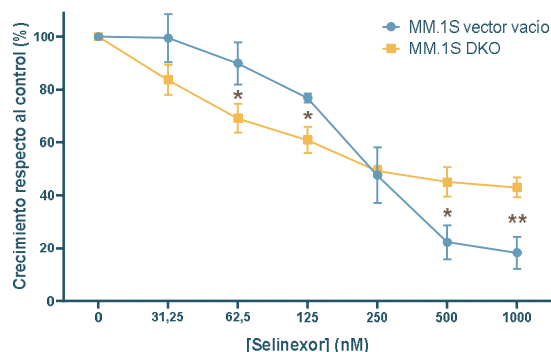


Figura 6. Determinación de la proliferación celular respecto al control tras el tratamiento con selinexor. Las líneas MM.1S Bax/Bak KO (Naranja) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Azul) se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de Selinexor (0 a 1000 nM) durante 24 horas. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de selinexor. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

En cuanto al **silmitasertib (Figura 7)** ocurre algo parecido a lo que ocurre con el selinexor, pero más marcado, y es que las MM.1S LentiCRISPR Ø no se ven afectadas hasta que se tratan con una dosis de fármaco mayor de 2 μ M, mientras que la proliferación en las MM.1S Bax/Bak KO ya se ve ligeramente afectada a concentraciones bajas. Sin embargo, una vez la proliferación de las primeras comienza a disminuir lo hace de manera más acentuada que la de las últimas, llegando a menos del 20% de crecimiento respecto al control a 10 μ M, por lo que en las MM.1S LentiCRISPR Ø sí que presenta un evidente efecto citotóxico, mientras que las MM.1S Bax/Bak KO, que se mantienen por encima del 40% a la misma concentración, dicho efecto no es tan evidente.

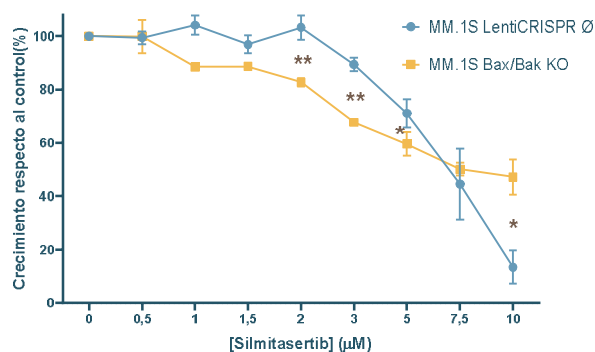


Figura 7. Determinación de la proliferación celular respecto al control tras el tratamiento con silmitasertib. Las líneas MM.1S Bax/Bak KO (Naranja) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Azul) se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de silmitasertib (0 a 10 μ M) durante 24 horas. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de silmitasertib. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Finalmente, el **sorafenib (Figura 8)** también mostró un gran efecto sobre la proliferación de ambas líneas, llegando prácticamente al 0% cuando se tratan con las dosis más altas (15 y 20 μ M). En este caso, aunque las MM.1S Bax/Bak KO parecen ligeramente más resistentes, pues la caída

más pronunciada del crecimiento en esta línea se produce a una concentración de sorafenib de 7,5 μM , mientras que en las MM.1S LentiCRISPR \emptyset se produce a 4 μM , a dosis altas de fármaco el crecimiento se ve afectado en la misma proporción. Esto se podría asociar íntegramente a un efecto citotóxico.

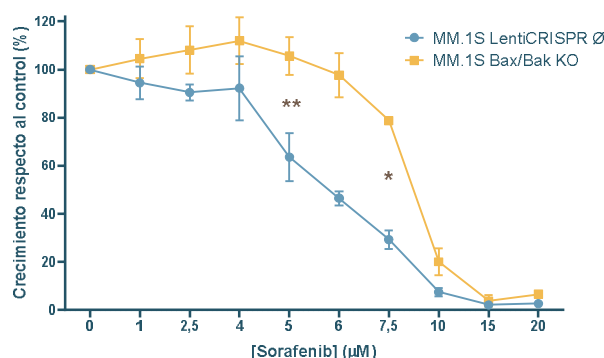


Figura 8. Determinación de la proliferación celular respecto al control tras el tratamiento con sorafenib. Las líneas MM.1S Bax/Bak KO (Naranja) y MM.1S LentiCRISPR \emptyset (Azul) se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y se trataron con concentraciones crecientes de sorafenib (0 a 20 μM) durante 24 horas. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR \emptyset a cada concentración de sorafenib. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

6.2 EFECTO DE LOS FÁRMACOS ENSAYADOS SOBRE LA MUERTE CELULAR

Tras el cribado primario se realizaron curvas dosis-respuesta y se realizó un análisis directo de la muerte celular con cada uno de los fármacos ensayados. De este modo se pretendía, por un lado, determinar si además de inhibir el crecimiento eran capaces de inducir la muerte celular y, en caso afirmativo, estudiar el tipo de muerte inducida. Los fármacos se probaron cada uno a unas concentraciones determinadas, escogidas en función de los resultados mostrados en la sección anterior.

Aunque los resultados del apartado anterior indican que todos los fármacos inhiben la proliferación celular en ambas líneas celulares, no todos fueron capaces de inducir la muerte celular. Cada uno de ellos tuvo un efecto diferente sobre ambas líneas celulares, relacionado tanto con su mecanismo de acción como con la propia naturaleza de las células sobre las que se ensayaron. Así, los resultados de las curvas permiten inferir en distinto grado el mecanismo por el que los fármacos ensayados ejercen su acción. Si el fármaco es capaz de inducir la muerte celular en las MM.1S Bax/Bak KO, entonces lo debe hacer por un mecanismo diferente a la apoptosis por vía intrínseca, debido a la ausencia de Bax/Bak que presentan estas células. En definitiva, en función del comportamiento de ambas líneas celulares ante las distintas dosis ensayadas de cada fármaco se pueden extraer distintas conclusiones sobre su mecanismo.

En el caso del **iberdomide**, los resultados obtenidos (**Figura 9**) concuerdan con lo supuesto en el apartado anterior sobre el carácter citostático del fármaco, y es que en las MM.1S Bax/Bak KO no es capaz de inducir la muerte celular a ninguna de las dosis ensayadas y en las MM.1S LentiCRISPR \emptyset , a pesar de que sí que la induce, lo hace en un porcentaje muy bajo de células, que no aumenta al incrementar la dosis. Esto podría estar relacionado con el efecto que tiene el iberdomide provocando la degradación de IKZF1 e IKZF3. Ambos son factores de transcripción anti-apoptóticos en las células MM y su pérdida provoca una reducción de la proliferación y la muerte celular. Como ya se explicó en el apartado 3.2, estos factores regulan el IFR4 y a c-MYC, oncogenes críticos que sostienen el crecimiento y supervivencia del MM.¹¹ Así, al provocar la degradación de

IKZF1 e IKZF3 el iberdomide interrumpe la proliferación celular ejerciendo sobre ambas líneas principalmente un efecto citostático. Sin embargo, en lo que respecta al leve efecto citotóxico visto en las MM.1S LentiCRISPR Ø, podría estar mediado por la vía intrínseca de la apoptosis, lo que explicaría por qué no se produce en las MM.1S Bax/Bak KO.

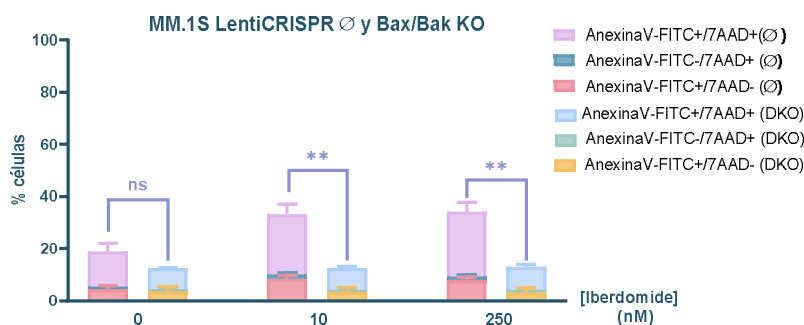


Figura 9. Efecto del iberdomide induciendo la muerte celular en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 48 horas con las dosis de iberdomide indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar, mediante citometría de flujo, apoptosis y necrosis. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de iberdomide. ns: no significativa y ** $p < 0,0064$

La **doxorubicina**, aunque en distinta medida, es capaz de inducir la muerte celular en ambas líneas (**Figura 10**). Esto concuerda tanto con el mecanismo explicado en el apartado 3.4.3 como con lo observado en otros trabajos del grupo, donde se observó que la doxorubicina era capaz de inducir la apoptosis en otras líneas celulares de MM.⁴⁸ Sin embargo, existe una diferencia significativa entre la muerte celular inducida por el fármaco en las dos líneas, siendo sustancialmente mayor en las MM.1S LentiCRISPR Ø que en las MM.1S Bax/Bak KO, lo que podría indicar que esta apoptosis está mediada principalmente por vía intrínseca. No obstante, cuando la vía intrínseca está bloqueada se pueden activar la extrínseca u otros mecanismos de muerte celular, porque las MM.1S Bax/Bak KO continúan muriendo, pese a tener inhibida la vía intrínseca. Para determinar cuál es la implicación de las caspasas en el mecanismo por el que el fármaco induce la muerte celular se realizó posteriormente un ensayo en presencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk, detallado en el apartado 6.3.

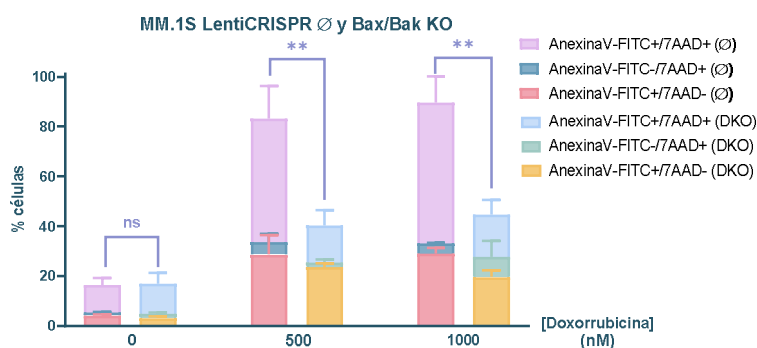


Figura 10. Efecto de la doxorubicina induciendo la muerte celular en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de doxorubicina indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar, mediante citometría de flujo, apoptosis y necrosis. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de doxorubicina. ns: no significativo y ** $p < 0,0043$

En cuanto al **silmitasertib** (**Figura 11**), mientras en las MM.1S LentiCRISPR Ø sí se observa un aumento en la muerte celular tras el tratamiento con el fármaco, sobre todo a dosis altas (10 μ M),

en las MM.1S Bax/Bak KO no se observan grandes diferencias entre el control y las células tratadas. Esto probablemente significa que este fármaco induce muerte celular principalmente por la vía apoptótica intrínseca, inhibida en las MM.1S Bax/Bak KO, sobre las que el silmitasertib no resulta citotóxico.

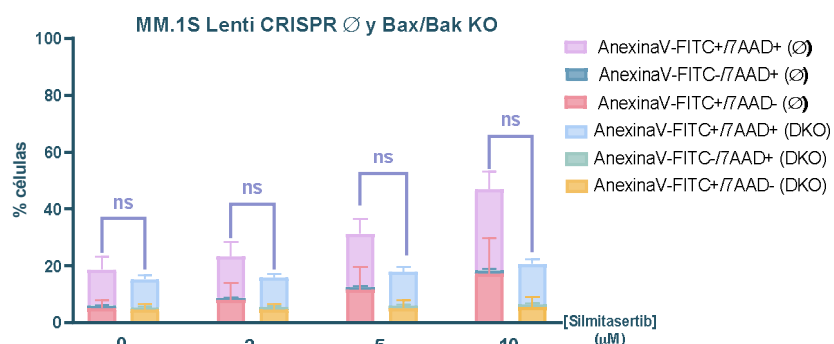


Figura 11. Efecto del silmitasertib induciendo la muerte celular en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de silmitasertib indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar, mediante citometría de flujo, apoptosis y necrosis. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de silmitasertib. ns: no significativa

Recordando el mecanismo de acción del fármaco, explicado en la sección 3.4.1, se trata de un inhibidor de la CK2. Esta quinasa tiene un rol importante tanto en la proliferación como en la supervivencia celular y, entre otras funciones, actúa sobre la vía extrínseca de la apoptosis, reduciendo su funcionalidad. La sobreexpresión de la CK2 provoca la supresión de la apoptosis mediada por TRAIL, TNF- α y FasL, es decir, de la vía extrínseca.⁵⁴ De manera que, al inhibir a la CK2, el silmitasertib libera la vía extrínseca, que vuelve a ser funcional. Además, la CK2 puede regular también la vía intrínseca por varios mecanismos, por ejemplo, mediante el aumento de los niveles de Bcl-xl, proteína anti-apoptótica, ocasionando una reducción de la apoptosis. La inhibición de la CK2 parece reducir la expresión de Bcl-xl, aumentando la sensibilidad a la apoptosis por vía intrínseca.⁵⁴ Los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados con el silmitasertib sugieren que, en este caso, predomina el efecto sobre la vía intrínseca porque las MM.1S Bax/Bak KO son prácticamente resistentes a este fármaco.

Como se ha comentado en el apartado 4, nuestro grupo había realizado ensayos anteriores con el silmitasertib y el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk sobre la línea celular MM.1S. Los resultados demostraron que el Z-VAD-fmk provocaba una inhibición muy leve de la muerte celular en esta línea.⁵⁰ Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en este trabajo, podrían demostrar que el silmitasertib actúa principalmente por la vía intrínseca en las células MM.1S, puesto que la muerte en las MM.1S Bax/Bak KO es muy baja. La permeabilización de las mitocondrias llevaría a la liberación de factores apoptogénicos, algunos de los cuales actúan de forma independiente de caspasas, lo que explicaría los resultados obtenidos en los ensayos previos.⁵⁰

En el caso del **sorafenib (Figura 12)**, se puede ver que es un potente inductor de la muerte celular, que es capaz de actuar por mecanismos de muerte alternativos a la vía intrínseca de la apoptosis porque la muerte inducida es prácticamente igual en ambas líneas celulares. Para determinar cuál es la implicación de las caspasas en la muerte inducida por el fármaco se realizó un ensayo en presencia del inhibidor inespecífico de caspasas Z-VAD-fmk (**ver apartado 6.3**).

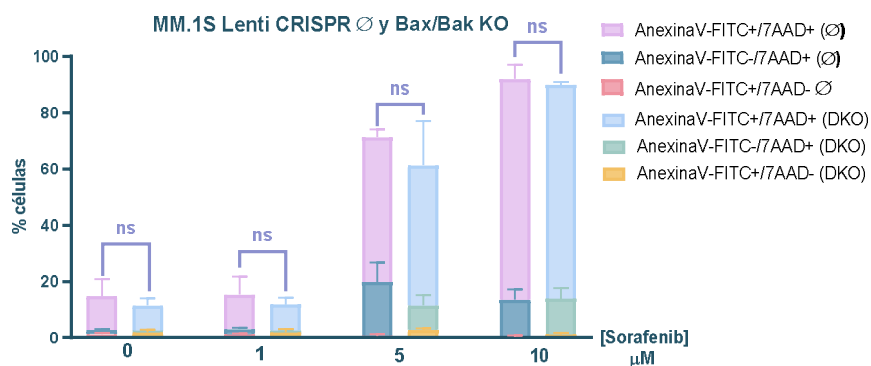


Figura 12. Efecto del sorafenib induciendo la muerte celular en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de sorafenib indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar, mediante citometría de flujo, apoptosis y necrosis. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de sorafenib. ns: no significativa.

6.3 EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE CASPASAS EN LA MUERTE INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS

Finalmente, con aquellos fármacos que sí fueron capaces de disminuir la viabilidad de las MM.1S Bax/Bak KO (doxorrubicina, sorafenib y selinexor) se realizaron curvas dosis-respuesta con los fármacos en presencia de inhibidores de caspasas, primero general (Z-VAD-fmk) y después, si éste era capaz de disminuir la muerte celular, con un inhibidor específico de la caspasa 8 (Z-IETD-fmk), principal caspasa iniciadora de la apoptosis por vía extrínseca (**Figura 3**).

La disminución de la muerte celular causada por un fármaco en presencia de un inhibidor general de caspasas determina que dicho fármaco actúa por una vía dependiente de caspasas. De manera que, si bajo esas condiciones el fármaco no es capaz de inducir la muerte celular en las MM.1S Bax/Bak KO, no sólo se puede inferir que actúa por un mecanismo dependiente de caspasas, si no que éste debe ser la vía extrínseca. Así, para comprobar esto, se debe realizar posteriormente el mismo ensayo con un inhibidor específico de la caspasa 8 (Z-IETD-fmk), principal iniciadora de la vía extrínseca. De esta forma, si tras el tratamiento con el Z-IETD-fmk se reduce la muerte celular inducida por el fármaco, significa que la vía extrínseca está efectivamente relacionada con el mecanismo de acción del mismo. Es importante mencionar que cuando hablamos de la vía extrínseca nos referimos a la activación de la caspasa-8 no sólo mediante la trimerización de receptores mortales, sino también a su activación no dependiente de estos. Se ha descrito que algunos inductores de muerte pueden producir la activación de la caspasa-8 independientemente de los receptores mortales, por ejemplo, a través de la formación de complejos con la maquinaria de la autofagia.⁵⁵ Para determinar si la caspasa-8 se activa a través de los receptores mortales o no, sería necesario realizar experimentos adicionales, por ejemplo, silenciando dichos receptores.

En el caso de la **doxorrubicina**, tras el tratamiento con el inhibidor inespecífico Z-VAD-fmk (**Figura 13**) se vio una disminución en la inducción de la muerte celular también en ambas líneas. Sin embargo, la protección ofrecida por Z-VAD-fmk en la línea control fue sólo parcial, sugiriendo, por tanto, la contribución de mecanismos independientes de caspasas, como se ha propuesto anteriormente en otras neoplasias hematológicas.⁴⁸ En el caso de las MM.1S Bax/Bak KO, la muerte celular inducida por la doxorrubicina se redujo a niveles equivalentes a los de los controles, indicando en este caso que la muerte celular es totalmente dependiente de caspasas, y

debido a lo explicado anteriormente, que seguramente se da a través de la vía extrínseca. No obstante, para ver qué papel tiene específicamente cada una de las caspasas y determinar qué implicación tiene la caspasa-8, y por tanto la vía extrínseca, deberían realizarse ensayos con el inhibidor específico Z-IETD-fmk.

Tampoco se pueden descartar, sin embargo, otros mecanismos alternativos de muerte celular como la necroptosis, que se puede producir debido a la presencia de los inhibidores de caspasas, o la ferroptosis, que es la muerte celular programada dependiente de hierro provocada por el aumento en la peroxidación de lípidos,⁵⁶ que podría estar provocada por la producción de ROS debida al propio mecanismo de acción de la doxorrubicina, explicado en el apartado 3.4.3.

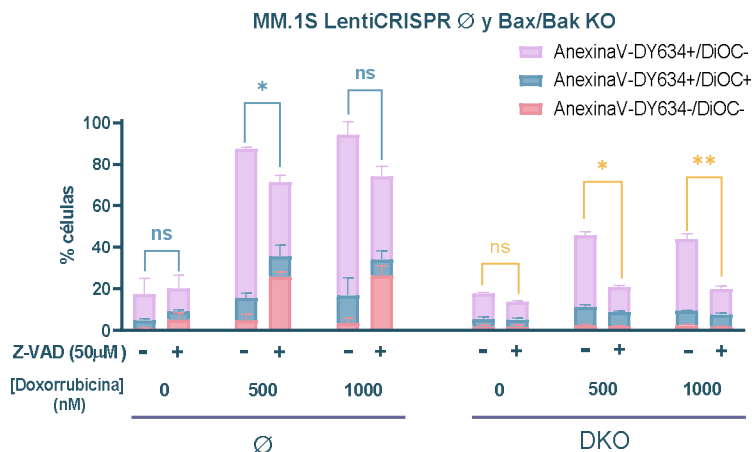


Figura 13. Efecto de Z-VAD-fmk en la muerte inducida por la doxorrubicina en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). La concentración de Z-VAD-fmk con la que se trataron ambas líneas es de 50 µM. Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de doxorrubicina indicadas se marcaron con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) para cuantificar, mediante citometría de flujo, muerte celular. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de dos experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las células tratadas con doxorrubicina en ausencia o en presencia de Z-VAD-fmk, para cada una de las líneas celulares y de las concentraciones de fármaco. ns: no significativa; * $p < 0,0394$ y ** $p = 0,0014$

En cuanto al **sorafenib (Figura 14)**, tras el tratamiento con el Z-VAD-fmk, en las MM.1S LentiCRISPR Ø sí que se ve una leve disminución de la muerte celular. Sin embargo, en el caso de las MM.1S Bax/Bak KO no sólo no disminuye, sino que parece aumentar. Esto indica que el fármaco puede actuar por mecanismos dependientes e independientes de caspasas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos.⁴⁷ Nuestros resultados sugieren que la vía dependiente de caspasas correspondería a la vía intrínseca, ya que las caspasas únicamente contribuyen a la muerte inducida por el sorafenib en la línea MM.1S LentiCRISPR Ø, mientras que en el caso de las MM.1S Bax/Bak KO, no disminuye tras el tratamiento con Z-VAD-fmk.

Respecto al mecanismo independiente de caspasas, se ha demostrado que el sorafenib es capaz de inducir muerte por necroptosis en la línea MM.1S en presencia de inhibidores de caspasas.⁴⁷ Esto podría explicar por qué se sigue produciendo la muerte celular en ambas líneas pese a la presencia del Z-VAD-fmk. En todo caso, es necesario continuar indagando en el mecanismo por el que el sorafenib es capaz de inducir la muerte celular.

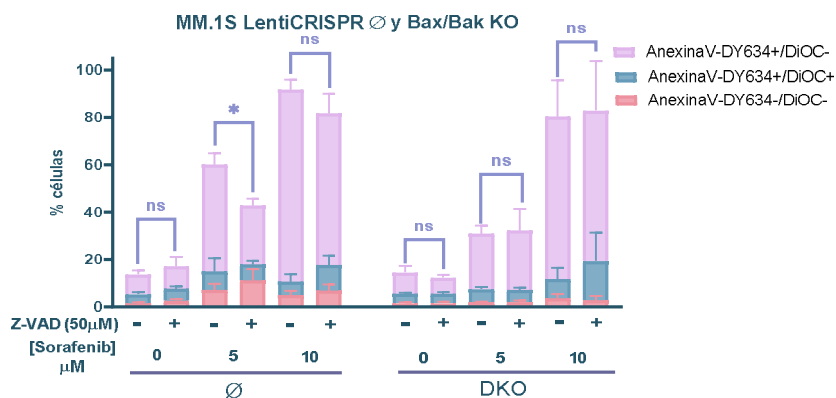


Figura 14. Efecto de Z-VAD-fmk en la muerte inducida por sorafenib en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de sorafenib y Z-VAD-fmk indicadas se marcaron con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) para cuantificar, mediante citometría de flujo, la muerte celular. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las células tratadas con sorafenib en ausencia o en presencia de Z-VAD-fmk, para cada una de las líneas celulares y de las concentraciones de fármaco. ns: no significativa y * $p=0,0461$.

Finalmente, respecto al **selinexor**, ensayos previos realizados por nuestro grupo han demostrado que es capaz de inducir la muerte celular en ambas líneas celulares, aunque existe una diferencia significativa entre la muerte inducida en las MM.1S LentiCRISPR Ø y en las MM.1S Bax/Bak KO, siendo notablemente mayor en las primeras (**Anexos, figura A5**). Además, se ha observado también que el tratamiento con el inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk es capaz de reducir la muerte celular en ambas líneas. Sin embargo, aunque en las MM.1S Bax/Bak KO reduce la muerte prácticamente a los niveles del control (del 50% al 16%), en las MM.1S LentiCRISPR Ø la reducción es muy leve (del 88% al 76%) (**Anexos, figura A6**), por lo que el selinexor ejerce su efecto como fármaco mediante mecanismos dependientes e independientes de caspasas. Es aquí donde comienza la aportación de este trabajo, se trataron ambas líneas con Z-IETD-fmk para determinar el papel que pueda ejercer la caspasa 8 en la muerte celular inducida por el selinexor.

Los resultados obtenidos (**Figura 15**) dejaron ver que el porcentaje de muerte celular era menor en ambas líneas cuando se trataban con Z-IETD-fmk. Sin embargo, al igual que ocurría con el Z-VAD-fmk, en el caso de las MM.1S Bax/Bak KO esta disminución fue mucho más marcada (del 40% al 8%) que en las MM.1S LentiCRISPR Ø (del 76% al 68%).

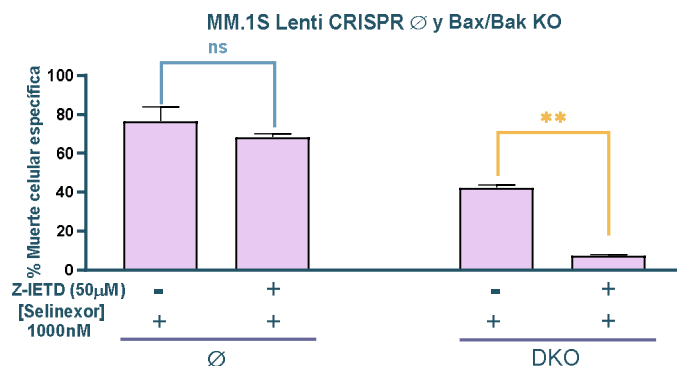


Figura 15. Efecto de Z-IETD-fmk en la muerte inducida por selinexor en las líneas MM.1S Bax/Bak KO (DKO) y MM.1S LentiCRISPR Ø (Ø). Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con una concentración de selinexor de 1000 nM y Z-IETD-fmk a una concentración de 50 µM, se marcaron con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) para cuantificar, mediante citometría de flujo, la muerte celular. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de dos experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las células tratadas con selinexor en ausencia o en presencia de Z-IETD-fmk, para cada una de las líneas celulares. ns: no significativa y ** $p=0,0012$.

De los resultados obtenidos tanto en este trabajo como en los trabajos previos podemos deducir que el selinexor actúa por un mecanismo de muerte celular diferente en ambas líneas celulares. En las MM.1S LentiCRISPR Ø se vio que la muerte inducida por el fármaco es significativamente mayor en esta línea que en la MM.1S Bax/Bak KO, lo que podría indicar que ejerce su efecto principalmente por la vía intrínseca de la apoptosis. Además, de los ensayos en presencia de Z-VAD-fmk, en los que se vio que, pese a que sí reducía la muerte celular en esta línea, lo hacía de forma muy leve, podemos deducir que el selinexor es capaz de inducir la apoptosis en las MM.1S LentiCRISPR Ø por mecanismos independientes y dependientes de caspasas, aunque los segundos presentan una contribución menor. Finalmente, los ensayos con Z-IETD-fmk realizados en este trabajo parecen indicar que el selinexor también es capaz de activar la vía extrínseca en las MM.1S LentiCRISPR Ø, pero esta tendría una contribución modesta en la muerte celular provocada por el fármaco, debido a que la inhibición de la caspasa-8 sólo reduce ligeramente la muerte celular en esta línea. De todo esto se extrae que el selinexor es capaz de activar la apoptosis en las MM.1S LentiCRISPR Ø por mecanismos independientes y dependientes de caspasas a través de la vía intrínseca y la vía extrínseca.

Respecto a las MM.1S Bax/Bak KO, que presentan la vía intrínseca inhibida, selinexor también es capaz de provocar la muerte celular, por lo que podría activar la vía extrínseca. Además, en este caso, al hacer los ensayos con Z-VAD-fmk sí se vio una reducción significativa de la muerte, llegando, como ya se ha mencionado, prácticamente a los niveles del control, por lo que parece ejercer su efecto por mecanismos dependientes de caspasas. En cuanto a los ensayos con Z-IETD-fmk, la reducción también significativa de la muerte celular al inhibir la caspasa-8 parece demostrar que la muerte celular que se produce en las MM.1S Bax/Bak KO se produce primordialmente a través de esta caspasa, principal iniciadora de la vía extrínseca.

7 CONCLUSIONES

- Todos los fármacos ensayados fueron capaces de inhibir el crecimiento tanto de las MM.1S LentiCRISPR Ø como de las MM.1S Bax/Bak KO.
- El tratamiento con doxorrubicina induce apoptosis dependiente e independiente de caspasas a través de las rutas intrínseca y extrínseca sobre las MM.1S LentiCRISPR Ø y apoptosis dependiente de caspasas sobre las MM.1S Bax/Bak KO.
- El iberdomide presenta efecto citostático sobre ambas líneas celulares, combinado con un leve efecto citotóxico sobre las MM.1S LentiCRISPR Ø mediado por la vía intrínseca de la apoptosis.
- El silmitasertib es capaz de inducir apoptosis independiente de caspasas a través de la ruta intrínseca.
- El selinexor induce apoptosis dependiente de caspasas en las células MM.1S Bax/Bak KO, primordialmente mediada por la caspasa-8, y apoptosis independiente y dependiente de caspasas a través de la vía intrínseca y, en menor medida, de la vía extrínseca, en las MM.1S LentiCRISPR Ø.
- El sorafenib puede ejercer su efecto por mecanismos dependientes e independientes de caspasas sobre las MM.1S LentiCRISPR Ø y mediante un mecanismo totalmente independiente de caspasas sobre las MM.1S Bax/Bak KO.

8 CONCLUSIONS

- All the drugs tested were able to inhibit the growth of both MM.1S LentiCRISPR Ø and MM.1S Bax/Bak KO.
- Doxorubicin treatment induces caspase-dependent and independent apoptosis via the intrinsic and extrinsic pathways on MM.1S LentiCRISPR Ø and caspase-dependent apoptosis on MM.1S Bax/Bak KO.
- Iberdomide has a cytostatic effect on both cell lines, combined with a mild cytotoxic effect on MM.1S LentiCRISPR Ø mediated by the intrinsic apoptosis pathway.
- Silmitasertib induces caspase-independent apoptosis via the intrinsic pathway.
- Selinexor induces caspase-dependent apoptosis in MM.1S Bax/Bak KO cells, mainly mediated by caspase-8, and triggers caspase-independent and dependent apoptosis through the intrinsic pathway and, to a lesser extent, the extrinsic pathway, in MM.1S LentiCRISPR Ø cells.
- Sorafenib can exert its effect by caspase-dependent and independent mechanisms on MM.1S LentiCRISPR Ø and by a fully caspase-independent mechanism on MM.1S Bax/Bak KO.

9 REFERENCIAS

1. Navarro-Almenzar B, Cabañas-Perianes V, Moreno Belmonte MJ. *Introducción Mieloma Múltiple*. Vol 13.; 2020.
2. González-Fernández ., Fernández Mastache E, Lorenzo Abalde S. Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2005;9(33):2162-2173. doi:10.1016/s0211-3449(05)73617-1
3. Mangan P. Instruya al paciente sobre el mieloma múltiple. *Nursing (Brux)*. 2007;25(5):31-33.
4. Las lesiones óseas en el mieloma múltiple - Fundación Carreras. Accessed March 19, 2024. <https://fcarreras.org/blog/lesionesoseasmielomamultiple/>
5. Mo CC, Yee AJ, Midha S, et al. Selinexor: Targeting a novel pathway in multiple myeloma. *EJHaem*. 2023;4(3):792-810. doi:10.1002/JHA2.709
6. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(7):1807-1819. doi:10.1681/ASN.2006010083
7. Qu J, Zou T, Lin Z. The roles of the ubiquitin-proteasome system in the endoplasmic reticulum stress pathway. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1-21. doi:10.3390/ijms22041526
8. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH, Lipper J. *Proteasome Inhibitors Disrupt the Unfolded Protein Response in Myeloma Cells*. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.1334037100
9. Costa BA, Mouhieddine TH, Richter J. What's Old is New: The Past, Present and Future Role of Thalidomide in the Modern-Day Management of Multiple Myeloma. *Target Oncol*. 2022;17(4):383-405. doi:10.1007/s11523-022-00897-8
10. Barankiewicz J, Salomon-Perzyński A, Misiewicz-Krzemińska I, Lech-Marańda E. CRL4CRBN E3 Ligase Complex as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(18). doi:10.3390/cancers14184492
11. Davis LN, Sherbenou DW. Emerging therapeutic strategies to overcome drug resistance in multiple myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7). doi:10.3390/cancers13071686
12. Cánovas Fernández A, Alonso Alonso JJ, Barreiro García JG, Aguirre Errasti C. Bortezomib en mieloma múltiple en recidiva o refractario: resultados en una cohorte de 39 pacientes. *Rev Clin Esp*. 2008;208(4):187-192. doi:https://doi.org/10.1157/13117040.
13. Multiple Myeloma Treatment Options | First Line Therapy. Accessed February 29, 2024. <https://www.myeloma.org/frontline-treatment-options>
14. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150
15. Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA. Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death Dis*. 2020;11(7). doi:10.1038/s41419-020-2724-5

16. Lee SY, Ju MK, Jeon HM, et al. Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/3537471
17. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 2006;20(1):1-15. doi:10.1101/gad.1376506
18. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175-193. doi:10.1038/s41580-018-0089-8
19. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-1916. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
20. Chi X, Kale J, Leber B, Andrews DW. Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2014;1843(9):2100-2113. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.06.002
21. Méry B, Guy JB, Vallard A, et al. In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death*. 2017;10. doi:10.1177/1179670717691251
22. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22(53 REV. ISS. 7):8543-8567. doi:10.1038/sj.onc.1207107
23. Chen H, Ning X, Jiang Z. Caspases control antiviral innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(9):736-747. doi:10.1038/cmi.2017.44
24. Nicholson DW. *Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function during Apoptotic Cell Death*. <http://www.stockton-press.co.uk/cdd>
25. Deveraux QL, Reed JC. *IAP Family Proteins-Suppressors of Apoptosis*.; 1999. www.genesdev.org
26. Fernández-Sánchez AP. Aspectos moleculares de la apoptosis y su inhibición en células infectadas con *Rickettsia rickettsii*. *Rev Colegio de Microb Quim Clin de Costa Rica*. 2018;24.
27. Shi Y. Review Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis Which Include Caspase-3,-6, and-7 (Figure 1). *An Initia-Tor Caspase Is Characterized by an Extended N-Terminal Prodomain (90 Amino Acids) Important for Its Function*. Vol 9.; 2002.
28. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):725-731. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.009
29. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47-59. doi:10.1038/nrm2308
30. Dhani S, Zhao Y, Zhivotovsky B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use. *Cell Death Dis*. 2021;12(10). doi:10.1038/s41419-021-04240-3
31. Niu X, Brahmabhatt H, Mergenthaler P, et al. A Small-Molecule Inhibitor of Bax and Bak Oligomerization Prevents Genotoxic Cell Death and Promotes Neuroprotection. *Cell Chem Biol*. 2017;24(4):493-506.e5. doi:10.1016/j.chembiol.2017.03.011
32. You Y, Cheng AC, Wang MS, et al. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death Dis*. 2017;8(4). doi:10.1038/cddis.2017.139
33. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(3-4):325-331. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.04.001
34. Khan N, Kahl B. Targeting BCL-2 in Hematologic Malignancies. *Target Oncol*. 2018;13(3):257-267. doi:10.1007/s11523-018-0560-7
35. Chon HJ, Bae KJ, Lee Y, Kim J. The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies. *Front Pharmacol*. 2015;6(MAR). doi:10.3389/fphar.2015.00070
36. Litchfield DW. *Protein Kinase CK2: Structure, Regulation and Role in Cellular Decisions of Life and Death*. Vol 369.; 2003.
37. Gandhi UH, Senapedis W, Baloglu E, et al. Clinical Implications of Targeting XPO1-mediated Nuclear Export in Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(5):335-345. doi:10.1016/j.clml.2018.03.003
38. Gravina GL, Senapedis W, McCauley D, Baloglu E, Shacham S, Festuccia C. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. *J Hematol Oncol*. 2014;7(1). doi:10.1186/s13045-014-0085-1
39. FDA approves new treatment for refractory multiple myeloma | FDA. Accessed June 4, 2024. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-refractory-multiple-myeloma>
40. Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E, Sanchez S. *Glucose Repression of Anthracycline Formation in Streptomyces Peucetius Var. Caesius*.
41. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(7):440-446. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56

42. Gong L, Giacomini MM, Giacomini C, Maitland ML, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: Sorafenib Pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2017;27(6):240. doi:10.1097/FPC.0000000000000279
43. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. *Methods Enzymol*. 2006;407:597-612. doi:10.1016/S0076-6879(05)07047-3
44. PharmGKB summary: Sorafenib Pathways - PMC. Accessed February 9, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5418090/>
45. Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(4):552-562. doi:10.1016/j.apsb.2018.01.008
46. Fuchs O. Iberdomide. Cereblon E3 ligase modulator (CELMoD), Treatment of systemic lupus erythematosus, Treatment of multiple myeloma. *Drugs Future*. 2021;46(2):115-127. doi:10.1358/DOF.2021.46.2.3223385
47. Ramírez-Labrada A, López-Royuela N, Jarauta V, et al. Two death pathways induced by sorafenib in myeloma cells: Puma-mediated apoptosis and necroptosis. *Clinical and Translational Oncology*. 2015;17(2):121-132. doi:10.1007/s12094-014-1201-y
48. López-Royuela N, Pérez-Galán P, Galán-Malo P, et al. Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(12):1746-1758. doi:10.1016/j.bcp.2010.02.010
49. Alduán NJ. *Estudio de La Apoptosis Inducida Por El Inhibidor de Proteasoma Ixazomib En Células de Mieloma. Evaluación de Factores de Resistencia y Análisis de Su Potenciación Por Agonistas BH3 / Nelia Jiménez Alduán*. <http://zaguan.unizar.es>
50. Aragón Aranda B, Naval J, Marzo I. *Análisis Del Mecanismo de Acción de Nuevos Fármacos Para El Posible Tratamiento de Neoplasias Hematológicas. Efecto Del Inhibidor de CK2, CX-4945, En Células de Mieloma Múltiple.*; 2013.
51. Beltrán-Visiedo M, Jiménez-Alduán N, Díez R, et al. Dinaciclib synergizes with BH3 mimetics targeting BCL-2 and BCL-XL in multiple myeloma cell lines partially dependent on MCL-1 and in plasma cells from patients. *Mol Oncol*. 2023;17(12):2507-2525. doi:10.1002/1878-0261.13522
52. Denizot F, Lang R. *Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability*. Vol 89.; 1986.
53. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1383-1395. doi:10.1038/nprot.2009.143
54. Firnau MB, Brieger A. CK2 and the Hallmarks of Cancer. *Biomedicines*. 2022;10(8). doi:10.3390/biomedicines10081987
55. Yan XY, Qu XZ, Xu L, et al. Insight into the role of p62 in the cisplatin resistant mechanisms of ovarian cancer. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1). doi:10.1186/s12935-020-01196-w
56. Cárdenas Vela CU. Ferroptosis. *Encuentros en la Biología*. XIV(182):17-20.
57. Chowdhury I, Tharakan B, K. Bhat G. Caspases- An update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;151(1):10-27.
58. Apoptosis: Definition, Pathway, Examples and Quiz | Biology Dictionary. Accessed June 26, 2024. <https://biologydictionary.net/apoptosis/>

10 ANEXOS

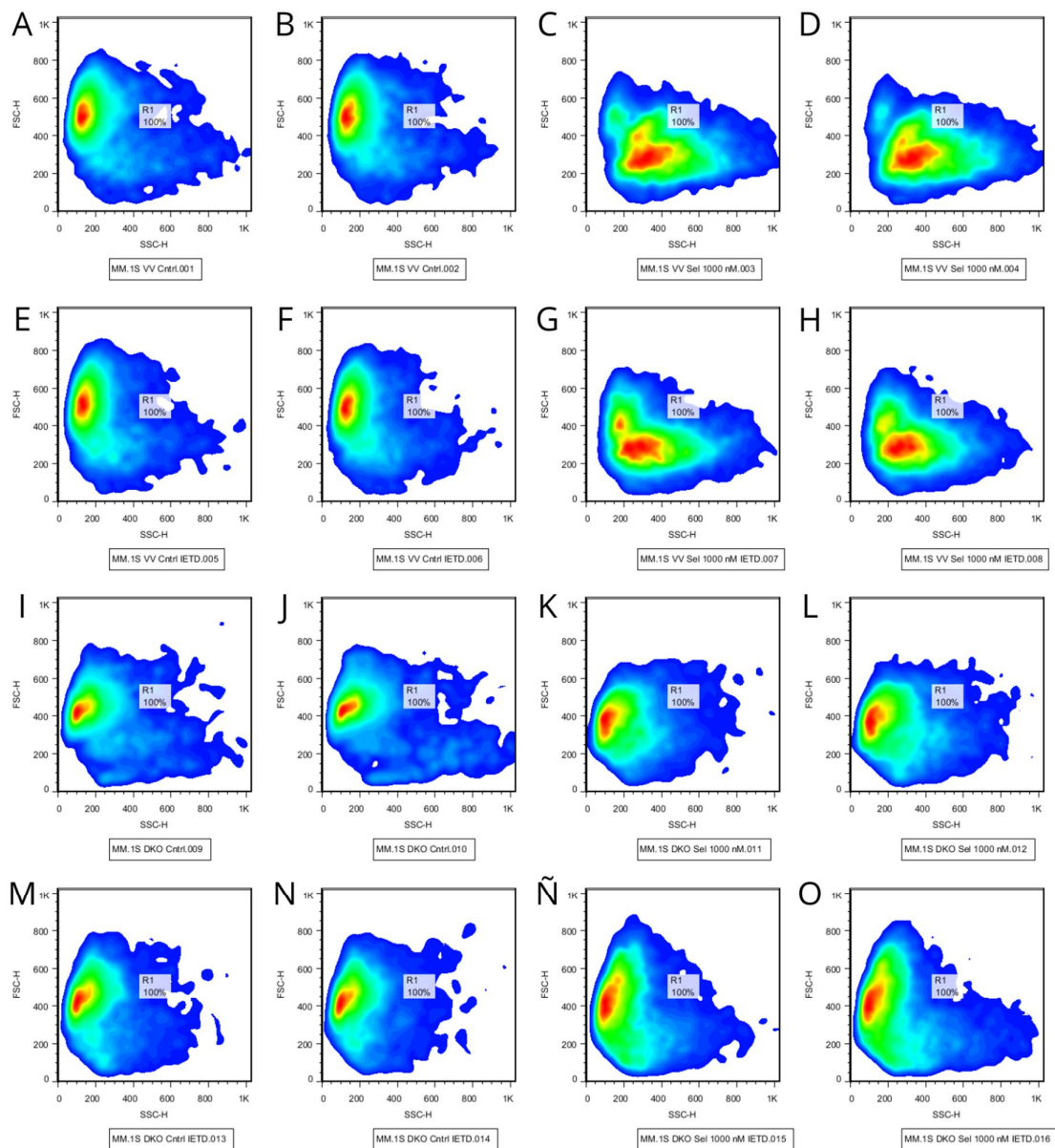


Figura A1. Diagramas de puntos de las líneas celulares MM.1S LentiCRISPR Ø (A-H) y MM.1S Bax/Bak KO (I-O) tras la exposición a distintas dosis de sorafenib. En la imagen se muestran los diagramas obtenidos para la línea MM.1S LentiCRISPR Ø a 0 μ M/Control (A-B), 1 μ M (C-D), 5 μ M (E-F), 10 μ M (G-H) y los obtenidos para la línea MM.1S Bax/Bak KO a 0 μ M/Control (I-J), 1 μ M (K-L), 5 μ M (M-N), 10 μ M (Ñ-O). En cada uno de los diagramas se muestra en el eje de abscisas la complejidad celular (granulosidad) (*Side Scatter*: SSC-H) y en el eje de ordenadas el tamaño celular (*Forward Scatter*: FSC-H).

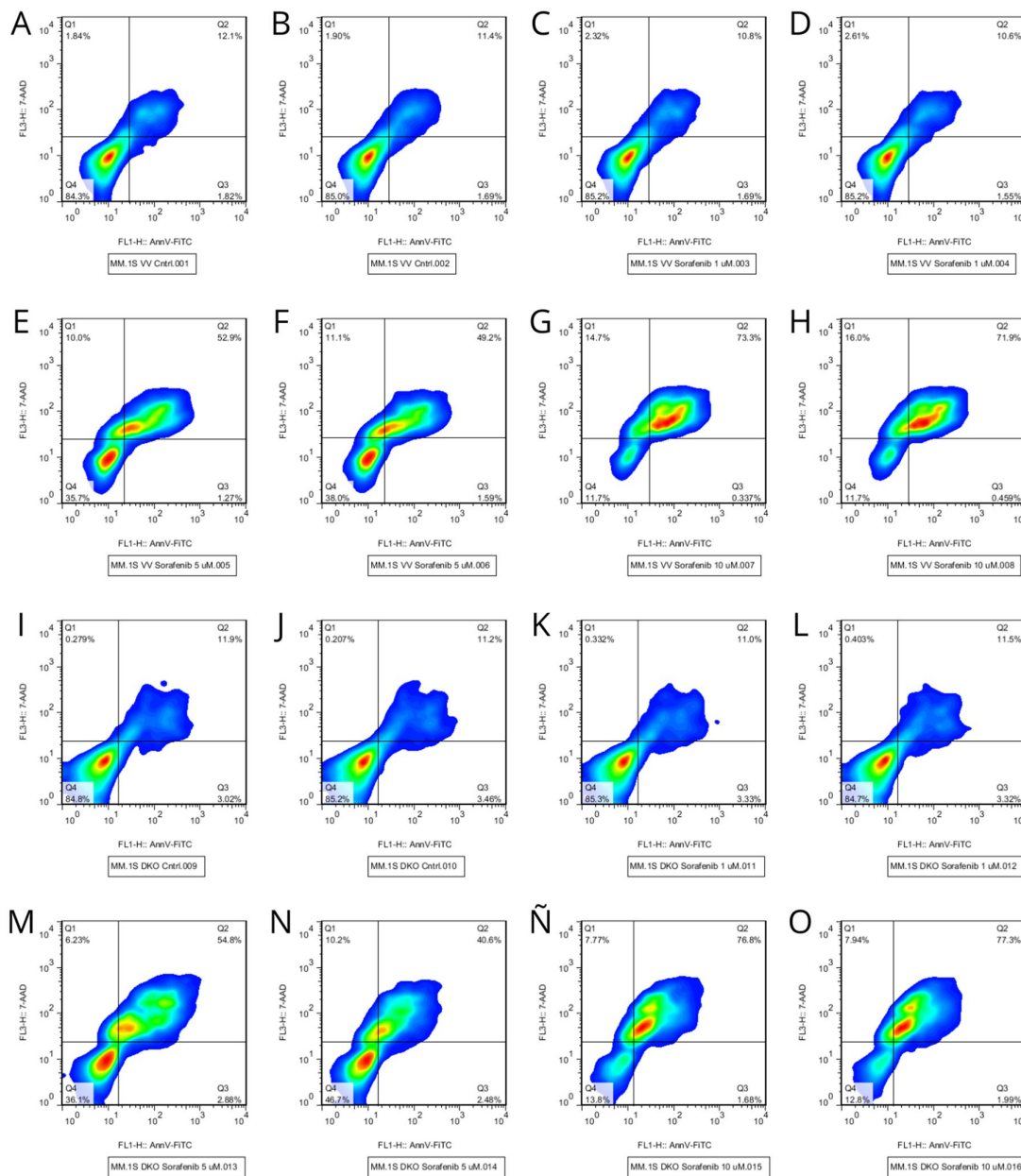


Figura A2. Diagramas de puntos de las líneas celulares MM.1S LentiCRISPR Ø (A-H) y MM.1S Bax/Bak KO (I-O) tras la exposición a distintas dosis de sorafenib. En la imagen se muestran los diagramas obtenidos para la línea MM.1S LentiCRISPR Ø a 0 µM/Control (A-B), 1 µM (C-D), 5 µM (E-F), 10 µM (G-H) y los obtenidos para la línea MM.1S Bax/Bak KO a 0 µM/Control (I-J), 1 µM (K-L), 5 µM (M-N), 10 µM (Ñ-O). En cada uno de los diagramas en el eje de ordenadas se muestra el resultado del marcaje con 7-AAD (FL3-H) y en el eje de abscisas el resultado del marcaje con Anexina V-FITC (FL1-H). Los diagramas se encuentran divididos por cuadrantes, donde Q1 (Sup. Izq.) comprende las células necróticas (AnnV-FiTC-/7-AAD+); Q2 (Sup. Dcha.): células en apoptosis tardía o necrótica (AnnV-FiTC+/7-AAD+), Q3 (Inf. Dcha.): células apoptóticas tempranas (AnnV-FiTC+/7-AAD-) y Q4 (Inf. Izq.): células viables (AnnV-FiTC-/7-AAD-).

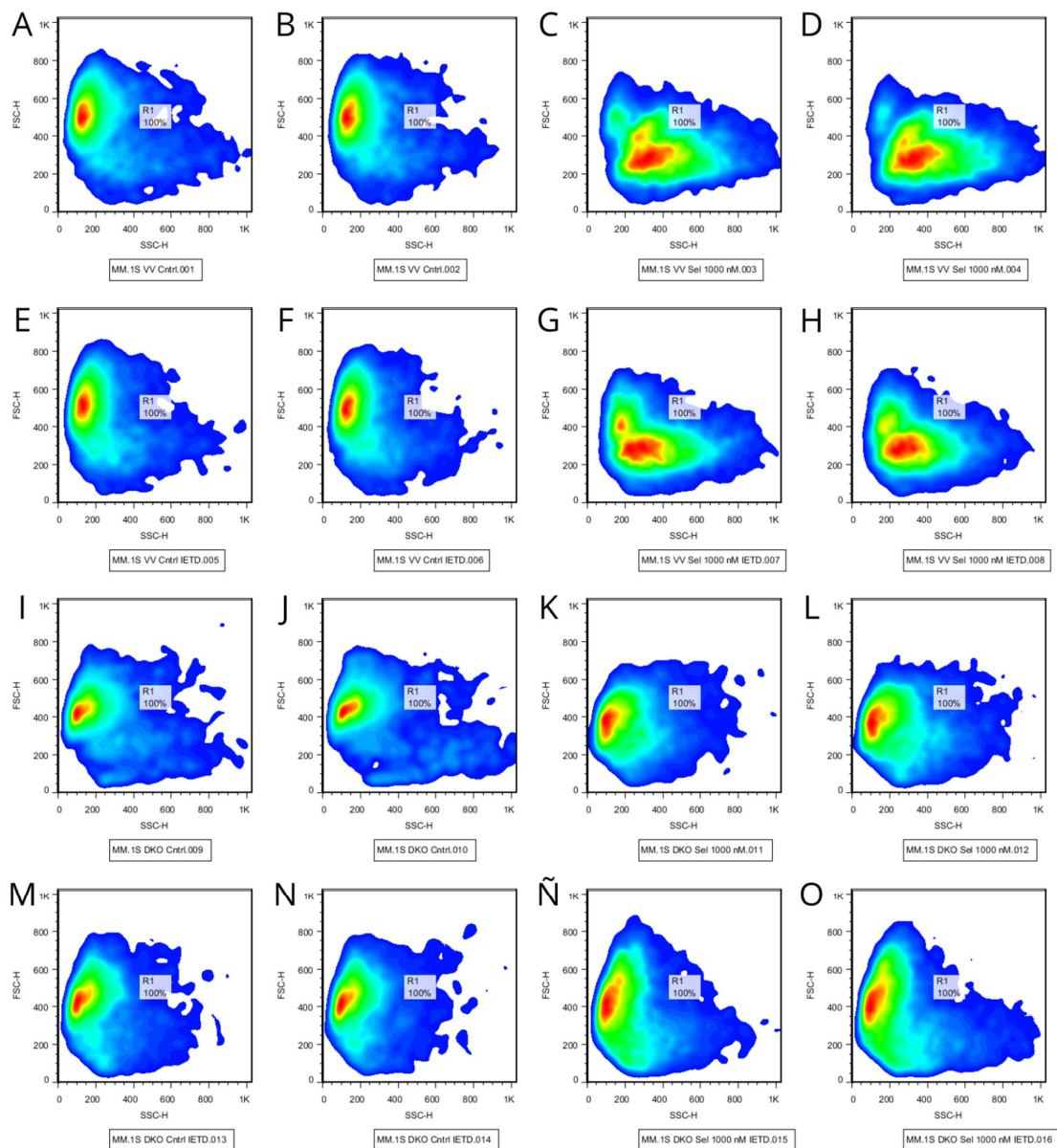


Figura A3. Diagramas de puntos de las líneas celulares MM.1S LentiCRISPR Ø (A-H) y MM.1S Bax/Bak KO (I-O) no tratadas y tratadas con IETD (inhibidor específico de la caspasa 8) tras la exposición a distintas dosis de selinexor. En la imagen se muestran los diagramas obtenidos para las células de la línea MM.1S LentiCRISPR Ø no tratadas con IETD (A-D) a 0 μ M/Control (A-B) y 1000 nM (C-D) y tratadas con IETD (E-H) a 0 μ M/Control (E-F) y 1000 nM (G-H) y los obtenidos para las células de la línea MM.1S Bax/Bak KO no tratadas con IETD (I-L) a 0 μ M/Control (I-J) y 1000 nM (K-L) y tratadas con IETD (M-O) a 0 μ M/Control (M-N) y 1000 nM (Ñ-O). En cada uno de los diagramas se muestra en el eje de abscisas la complejidad celular (granulosidad) (SSC-H) y en el eje de ordenadas el tamaño celular (FSC-H).

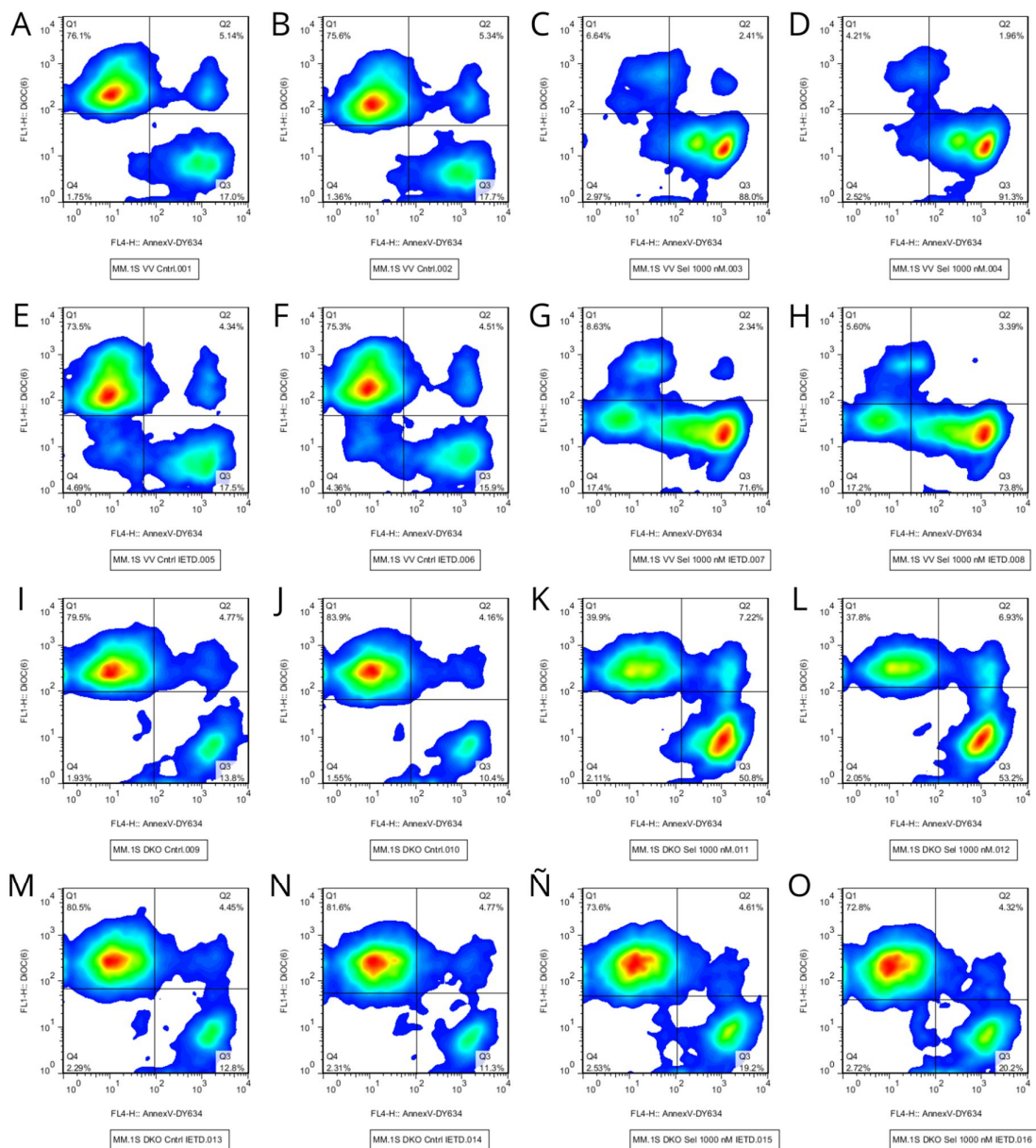


Figura A4. Diagramas de puntos de las líneas celulares MM.1S LentiCRISPR Ø (A-H) y MM.1S Bax/Bak KO (I-O) no tratadas y tratadas con IETD (inhibidor específico de la caspasa 8) tras la exposición a distintas dosis de selinexor. En la imagen se muestran los diagramas obtenidos para las células de la línea MM.1S LentiCRISPR Ø no tratadas con IETD (A-D) a 0 μM/Control (A-B) y 1000 nM (C-D) y tratadas con IETD (E-H) a 0 μM/Control (E-F) y 1000 nM (G-H) y los obtenidos para las células de la línea MM.1S Bax/Bak KO no tratadas con IETD (I-L) a 0 μM/Control (I-J) y 1000 nM (K-L) y tratadas con IETD (M-O) a 0 μM/Control (M-N) y 1000 nM (Ñ-O). En cada uno de los diagramas en el eje de ordenadas se muestra el resultado del marcaje con DiOC6(3) (FL1-H) y en el eje de abscisas el resultado del marcaje con Anexina V-DY634 (FL4-H). Los diagramas se encuentran divididos por cuadrantes, donde Q1 (Sup. Izq.) comprende las células viables (AnnV-DY634-/DiOC6(3)+); Q2 (Sup. Dcha.): células en apoptosis temprana (AnnV-DY634+/DiOC6(3)+); Q3 (Inf. Dcha.): células apoptóticas tardías (AnnV-DY634+/DiOC6(3)-) y Q4 (Inf. Izq.): células no viables no apoptóticas (AnnV-DY634-/DiOC6(3)-)

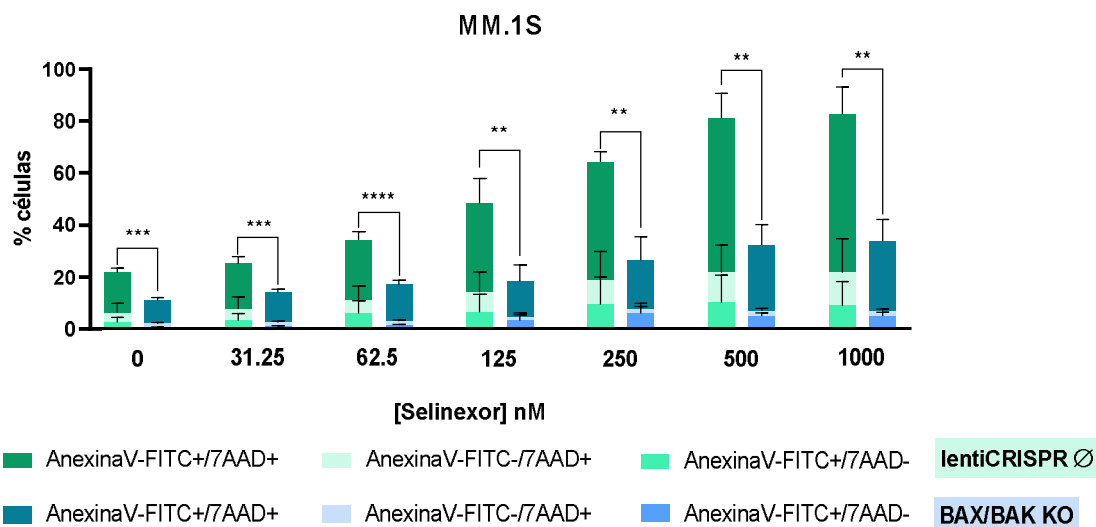


Figura A5. Efecto de selinexor induciendo la muerte celular en las líneas MM.1S Bax/Bak KO y MM.1S LentiCRISPR Ø. Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con las dosis de selinexor indicadas se marcaron con Anexina V-FITC y 7-AAD para cuantificar, mediante citometría de flujo, la muerte celular. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* de las MM.1S Bax/Bak KO y las MM.1S LentiCRISPR Ø a cada concentración de selinexor. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ (Imagen cedida por Laura Cambronero Arregui)

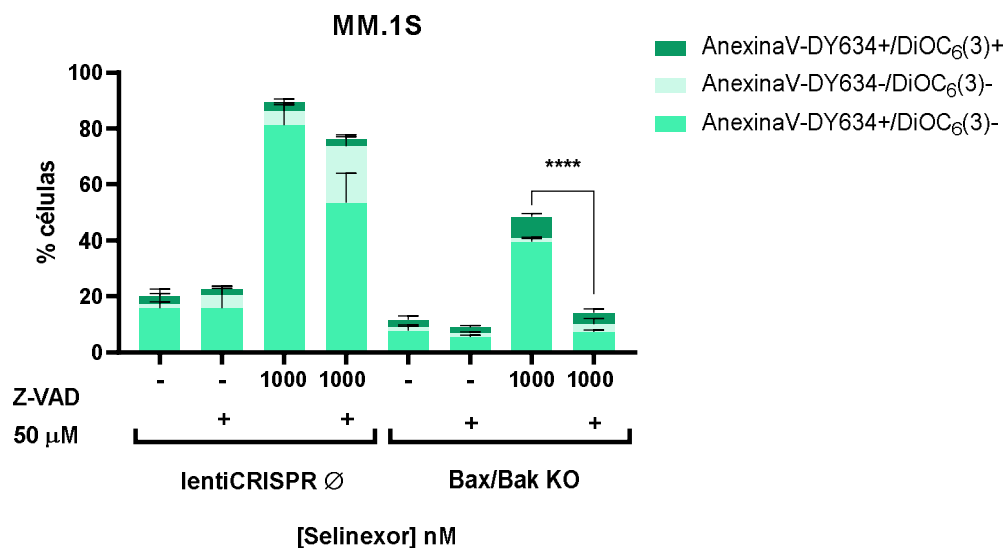


Figura A6. Efecto de Z-VAD-fmk en la muerte inducida por selinexor en las líneas MM.1S Bax/Bak KO y MM.1S LentiCRISPR Ø. Se sembraron a 3×10^5 células/ml por condición y tras 24 horas con una concentración de selinexor de 1000 nM y Z-VAD-fmk a una concentración de 50 µM, se marcaron con Anexina V-DY634 y DiOC₆(3) para cuantificar, mediante citometría de flujo, la muerte celular. Los resultados representados corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes y su significancia, obtenida mediante el análisis estadístico de *t-test* entre las células tratadas con selinexor en ausencia o en presencia de Z-VAD-fmk, para cada una de las líneas celulares y de las concentraciones de fármaco. **** $p < 0,0001$ (Imagen cedida por Laura Cambronero Arregui)