

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Evaluación *in vitro* de la respuesta
de células de mieloma
múltiple al inhibidor de la cadena
de transporte de
electrones IACS-010759

Pablo Monge Martínez
2024

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 0. Resumen/Abstract | 1 |
| 0.1 Abreviaturas..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Fisiopatología | 1 |
| 1.2 Factores genéticos y proceso de evolución de la enfermedad | 2 |
| 1.3 Metabolismo energético en MM | 3 |
| 1.4 Tratamiento | 3 |
| 1.5 Fármacos en estudio. | 4 |
| 2. Materiales y métodos | 7 |
| 2.1 Fármacos..... | 7 |
| 2.2 Líneas celulares | 7 |
| 2.3 Determinación de densidad y viabilidad. | 7 |
| 2.4 Ensayo MTT..... | 7 |
| 2.5 Citometría: ANEXINA V FITC – 7AAD..... | 9 |
| 2.6 Determinación de la sinergia con S63845 | 10 |
| 3. Resultados | 11 |
| 3.1 Efecto sobre la proliferación celular y la viabilidad metabólica. | 11 |
| 3.2 Efecto sobre la muerte celular..... | 13 |
| 3.3 Sinergia con S63845. | 16 |
| 4. Discusión..... | 20 |
| 5. Conclusiones/Conclusions | 22 |
| 6. Bibliografía..... | 22 |
| ANEXOS..... | 26 |

0. Resumen

IACS-010759 es un fármaco que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, provocando un aumento de la glucólisis en las células y favoreciendo su posterior muerte. Nuestro estudio se ha basado en comprobar si este fármaco era eficaz para el tratamiento del mieloma múltiple, un cáncer incurable. Nuestros experimentos han determinado que, para la gran mayoría de variantes de esta enfermedad, IACS-010759 es capaz de reducir bastante la viabilidad celular a bajas dosis. Adicionalmente, se ha visto que el inhibidor de Mcl-1, S63845, sinergiza con IACS-010759, reduciendo la viabilidad celular y la acidosis producida inicialmente por IACS-010759.

Abstract

IACS-010759 is an inhibitor of the Complex I of the respiratory chain, causing an increase in glycolysis in cells and promoting their subsequent death. Our study was based on determining whether this drug was effective for the treatment of multiple myeloma, an incurable cancer. Our experiments have determined that for the vast majority of variants of this disease, IACS-010759 is able to significantly reduce cell viability at low doses. Additionally, it has been observed that the Mcl-1 inhibitor S6385 synergizes in some cases with IACS-010759, reducing cell viability and the acidosis initially caused by IACS-010759.

0.1 Abreviaturas

MM: Mieloma múltiple.

MGUS: Gammopathía monoclonal de significancia indeterminada.

SFB: Suero fetal bovino.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

7AAD: 7-amino-actinomicina D.

ABB: Annexin-Binding-Buffer

IC50: Inhibitory Concentration 50

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

1. Introducción

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de desorden clonal proliferativo de células plasmáticas derivadas de linfocitos B, caracterizado por un incremento anormal en la producción de anticuerpos monoclonales. Estas circunstancias provocan que pueda generar disfunción renal, hipercalcemia, anemia, así como dolor óseo provocado por lesiones líticas. Constituye el segundo cáncer hematopoyético en número de pacientes y afecta, sobre todo, a la población de avanzada edad, con una media de edad de aparición de 65 años y una esperanza de vida de 5 años. Es una enfermedad actualmente incurable (1).

1.1 Fisiopatología

El MM tiene dos fases previas, MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) o Gammopathía monoclonal de significado indeterminado y SMM (Smoldering Multiple Myeloma) o Mieloma Múltiple Latente (2)

La MGUS (o GMSI) se define clínicamente por la presencia de inmunoglobulinas monoclonales (Proteína M) en sangre u orina, la presencia de menos de un 10% de células plasmáticas (CP) en la médula ósea y la no existencia de daño en órganos debido al mieloma. La MGUS se da en el 3% de las personas con más de 50 años, pero solo el 1% de estas desarrolla MM. Una pequeña parte de los pacientes experimentan una etapa intermedia denominada SMM (2).

El SMM (o MML) se caracteriza por presentar una concentración de proteína M mayor a 30 g/L, con más de un 10% de CP en la médula ósea, pero sin daño en órganos asociado a mieloma. El 10% de los pacientes de SMM desarrollan MM en los 5 años posteriores al diagnóstico (2).

1.2 Factores genéticos y proceso de evolución de la enfermedad.

Se han determinado dos causas por las que las CP comienzan a proliferar. La primera sería una hiperdiploidía, presente en el 50% de los pacientes con MGUS y MM; produciéndose esto, generalmente, en los cromosomas impares (3). La segunda consiste en translocaciones en el cromosoma 14 que afectan al gen de la cadena pesada de las Ig. Algunas de estas translocaciones también influyen en la expresión de ciclinas D, factores de transcripción MAF y algunos oncogenes (4). La sobreexpresión de la ciclina D es un paso común que facilita el paso de MGUS a MM (5), pero esta sobreexpresión por sí sola no da lugar a MM. Se requiere de la mutación y/o sobreexpresión de otros oncogenes para que se produzca (4).

-Ciclina D1. Está codificada por el gen *CCDN1*. Esta proteína permite a la célula pasar del estadio G1 del ciclo celular al S, regulando el factor de transcripción E2F-1 (6). La translocación más común en la que está involucrado este gen es t(11;14)(q13;q32), en la cual los potenciadores o “enhancers” del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina potencian la expresión de la ciclina D1 (7). En algunos estudios se ha visto que su sobreexpresión empeora el pronóstico de la enfermedad (8) y en otros en los que la mejora (9).

Por ejemplo, una translocación de alto riesgo es la delección 17p, que produce la eliminación del gen *TP53*. Este codifica la proteína p53 (10), que actúa como regulador de la división celular y controla la respuesta a la gran mayoría de tipos de estrés (11). No obstante, aún se discute si *TP53* es la diana principal de la delección. Así mismo, se ha observado que el 40% de los pacientes con esta delección, también, presentan mutaciones del mencionado gen, en el alelo no deletreado (10).

Otra translocación bastante frecuente es la (4;14), que supone principalmente la sobreexpresión de los genes *FGFR3* y *MMSET*. *FGFR3* codifica un receptor de crecimiento de fibroblastos, aunque no se ha relacionado con la evolución de la enfermedad al perderse en el 33% de las translocaciones. *MMSET* codifica una metil transferasa que produce cambios en la cromatina y su desregulación. También, se puede producir la fusión de los “enhancers” de la inmunoglobulina con el gen *MMSET*, lo que conduce a su sobreexpresión (10).

Otra de las alteraciones más habituales en el MM es la delección 1p32, que afecta a los genes *FAF1* y *CDKN2C*. El primero, codifica una proteína que actúa favoreciendo la apoptosis en los linfocitos y, el segundo, produce un inhibidor de ciclinas que reduce la tasa de duplicación. Esta mutación se ha visto que es tan agresiva como la delección 17p (10).

La ganancia del cromosoma 1q se ha visto que puede ser otra translocación de interés, aunque no se sabe qué genes son los más importantes para la patología del MM. Un gen implicado puede ser el *CKS1B*. Este codifica una proteína reguladora de ciclinas, interviniendo así en el ciclo celular. También, se piensa que pueden estar implicados el gen *ADAR1*, que codifica una desaminasa de RNA, y *MCL-1*, que codifica una proteína anti-apoptótica de la familia BCL-2 (12).

También, se han identificado otras translocaciones que afectan a los oncogenes *MAF*, pero no se han estudiado adecuadamente debido a la baja incidencia de estas (1-3% de los pacientes) (10).

Respecto a los oncogenes que se han encontrado mutados individualmente al analizar a los pacientes de MM, hay mucha heterogeneidad. Las isoformas de RAS, KRAS y NRAS, son las más abundantes (en el 20 - 25% de los pacientes). También, aparecen otras proteínas de la ruta de MAPK, como BRAF. Además, se han visto mutaciones en *TP53* y, como ocurría con la translocación, esto es indicativo de mala evolución de la enfermedad. Otras mutaciones observadas son las del gen *DIS3*, que interviene en el procesamiento del RNA, y *FAM46C*, que está involucrado en la mejora de la estabilidad del mRNA (10).

1.3 Metabolismo energético en MM

En MM, se observa el efecto Warburg. Este consiste en que las células obtienen la mayor parte de la energía de la glucólisis, convirtiendo mayoritariamente el piruvato en lactato. Este efecto se da en células normales cuando se produce hipoxia, pero en células tumorales se da incluso cuando hay concentraciones altas de oxígeno (13, 14). En este proceso también influye el efecto Warburg reversible, donde otras células cancerosas transforman el lactato de forma aerobia en energía a través de la cadena respiratoria, y el ciclo de Krebs. Además, se ha visto que para estas células es muy importante el metabolismo energético de la glutamina. Todos estos cambios en el metabolismo de las células de MM se deben a la gran plasticidad que tienen estas para adaptarse al ambiente (14).

1.4 Tratamiento

Además del uso de quimioterápicos más clásicos como el melfalán, otras terapias han supuesto una revolución en el tratamiento del MM, elevando su tasa de supervivencia a los 5 años hasta el 40%. Estos tratamientos se han basado principalmente en la utilización de fármacos inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales e inhibidores del proteasoma (15).

-Fármacos inmunomoduladores.

Entre estos encontramos la Talidomida, la Lenalidomida y la Pomalidomida. Se usan en conjunto con la dexametasona, un potente glucocorticoide inhibidor de NF- κ B e IRF4. Favorecen la apoptosis aumentando los factores pro-apoptóticos y reducen la angiogénesis inhibiendo algunas de las moléculas que la favorecen, como VEGF e IL-6. Por otro lado, se sintetizan otras citoquinas anti-tumorales. Uno de los efectos descubiertos más recientemente es la degradación de los factores de la familia Ikaros, por la cual se producen algunos de los efectos antes mencionados. También, se inhibe CK1 α , que promueve la supervivencia de las células de MM. Esta secreción de interleucinas favorece la regulación del ratio de linfocitos Th1/Th2, que en MM se encuentra desregulado (15).

-Anticuerpos monoclonales.

En la actualidad los dos anticuerpos aprobados y más utilizados son Daratumumab y Elotuzumab.

Daratumumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD38. CD38 es un receptor expresado, sobre todo, en células de mieloma. Este anticuerpo monoclonal es capaz de destruir estas células favoreciendo la fagocitosis, la opsonización, el ataque del complemento y el ataque de otras células del sistema inmune. Además, se ha visto que provoca un aumento en el porcentaje de los linfocitos “helper” y los linfocitos citotóxicos (16). También, se desarrolló Isatuximab, anticuerpo monoclonal de la familia anti-CD38, que además de los efectos del daratumumab provoca el crecimiento del lisosoma, incrementa la porosidad de la membrana lisosomal y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, favorece la liberación de la catepsina B del lisosoma, activando la vía de muerte celular dependiente del lisosoma (15).

Elotuzumab: Es un anticuerpo monoclonal anti-SLAMF7. SLAMF7 es un receptor que se expresa, prácticamente, solo en las células hematopoyéticas, especialmente en linfocitos y células de MM. De este receptor todavía no se conoce muy bien su función, pero se piensa que actúa a modo de unión con las células estromales de la médula ósea. Tiene dos funciones: se encarga de activar a las células “Natural killer” (NK) a través de sus receptores de Fc, fracción cristalizable, y de marcar con anticuerpos las células de MM (17).

Todo esto conlleva que se produzca la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), el ataque del complemento mediado por el anticuerpo (CDC), así como la fagocitosis celular mediada por anticuerpo (ADCP) y la opsonización (17).

-Inhibidores del proteasoma.

La primera generación de estos fármacos comienza con Bortezomib. En la segunda aparecen Carfilzomib y Ixazomib. Bortezomib puede producir neuropatías transitorias y Carfilzomib puede ocasionar cardiopatías, por lo que la selección entre ellos se basa en sus diversos efectos secundarios (15). Estos fármacos actúan inhibiendo a NF-kB tanto por la vía canónica como la no canónica. Esto se consigue al inhibir al proteasoma, impidiendo que se degraden proteínas fundamentales para estas vías como I κ B α , p100 y p105 (18). Los efectos producidos por NF-kB son derivados de sus propiedades anti-apoptóticas: regulando las proteínas Bcl-2, regulando la liberación del citocromo c de la mitocondria, favoreciendo la apoptosis y regulando la producción de citoquinas (15).

Otro de los mecanismos de acción de los inhibidores del proteasoma es la acumulación de proteínas mal plegadas, que activa la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, induciendo la apoptosis (15, 19).

1.5 Fármacos en estudio.

- Miméticos BH3:

La familia Bcl-2 está formada por proteínas, tanto anti-apoptóticas como pro-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Puma, Bax... Estas presentan al menos uno de los dominios de homología BH. En el caso de las proteínas anti-apoptóticas, suelen tener los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4. Las proteínas proapoptóticas multidominio (Bax y Bak) contienen los dominios BH1, BH2 y BH3 y son las proteínas efectoras de la permeabilización mitocondrial. Finalmente, las proteínas del grupo "solo-BH3" (Noxa, Bim, Puma, etc.) contienen únicamente ese dominio y actúan neutralizando a las proteínas antiapoptóticas y/o activando directamente a Bax y Bak. (20). Los miméticos BH3 simulan la estructura de dicho dominio y actúan inhibiendo a las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2.

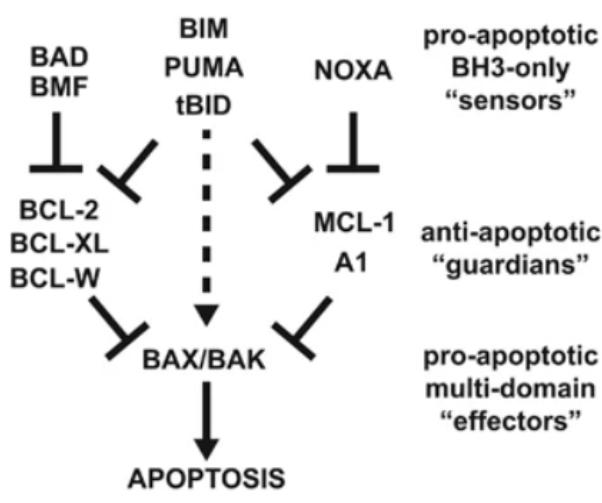


Figura 1. Interrelaciones entre las distintas proteínas de la familia BCL-2. Se indica (arriba) las proteínas que inhiben a las proteínas anti-apoptóticas (medio) y estas a su vez inhiben a las proteínas pro-apoptóticas efectoras (abajo) (21).

Estas proteínas anti-apoptóticas se encargan de evitar que las proteínas BAX/BAK se unan, evitando así que se produzca la activación de la vía intrínseca de caspasas y evitando la muerte por apoptosis (20).

-S63845.

Este fármaco inhibe a la proteína anti-apoptótica Mcl-1, que se encuentra sobreexpresada en muchos cánceres, como el MM, leucemia linfoblástica aguda o cáncer de mama. Se encarga de unirse al dominio BH3 impidiendo la unión de Mcl-1 con las proteínas pro-apoptóticas, favoreciendo la muerte de las células. En los estudios se suele combinar con Venetoclax (22). Está en ensayos clínicos.

-Venetoclax.

Este fármaco es un inhibidor de la proteína anti-apoptótica BCL-2, que se encuentra sobreexpresada en las células de MM con la translocación (11;14). Es por esto que los pacientes con una alta expresión de esta proteína responden mejor al fármaco. Se ha visto que un tratamiento conjunto de Venetoclax con Bortezomib y Dexametasona alarga la supervivencia del paciente (23). Está aprobado por la FDA y la EMA para ciertos tipos de cáncer.

- Inhibidores metabólicos:

Los inhibidores metabólicos llevan usándose décadas, teniendo como antecedentes a los fármacos antimetabolitos, como por ejemplo, el metotrexato. En los últimos años han vuelto a ganar relevancia, pero, esta vez, se están desarrollando fármacos cuyas dianas participan en

diversas rutas metabólicas. Algunos inhiben la formación de ciertos aminoácidos esenciales, otros inhiben selectivamente el ciclo de Krebs, e incluso los hay que inhiben la síntesis de lípidos. En este caso se ha trabajado con un inhibidor de la cadena de transporte de electrones (24).

1.5.1 IACS-010759

Este fármaco es derivado de BAY 87-2243. IACS-010759 es un inhibidor metabólico que inhibe al complejo I de la cadena de transporte de electrones.

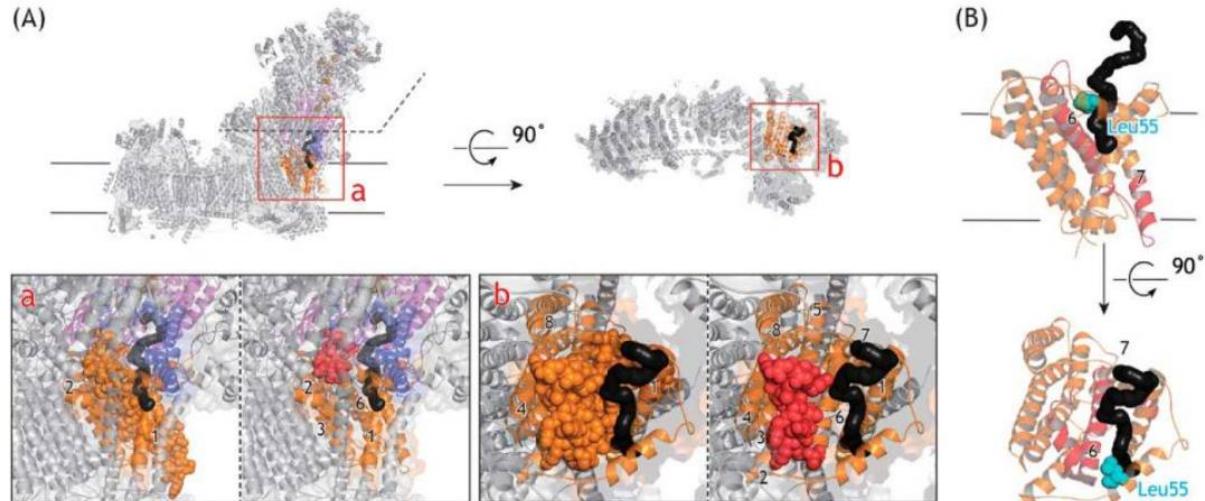


Figura 2. Región de la subunidad ND1 del complejo I, sitio de unión de IACS-010759. El modelo es del complejo I ovino (5LNK) (A) Las esferas marrones indican la región Asp199-Lys262 en la subunidad ND1. El bucle de unión formado por Asp199-Ala217 se marca en rojo. Se muestra el canal de las quinonas en negro, determinado mediante el programa MOLE. (B) Posición de la Leu55 (azul) junto al canal de paso de las quinonas (negro), sobre la región ND1 (marrón) y el bucle de unión (rojo) (25).

Al contrario que otros fármacos más tóxicos que se unen directamente a la Leu55 en el canal de quinonas (**Figura 2**), se ha visto que este fármaco puede interaccionar por debajo del dominio ND1 con los bucles formados por Asp199-Ala217. Esto implica que no interactúa directamente con la Leu55 y su actividad es menos tóxica (25). Se produce una inhibición parcial de la cadena de transporte de electrones, lo que conlleva que no se puedan regenerar los cofactores NADH correctamente. Así, se acaba bloqueando el ciclo de Krebs y favoreciendo la glucólisis. Debido a esto, como subproducto se generan grandes cantidades de ácido láctico. Además, esta desregulación de la cadena de transporte de electrones conlleva un aumento en la concentración de ROS que son muy dañinas para las células (26, 27).

In vivo se ha visto que inhibe fuertemente el crecimiento de tumores sólidos, como el de mama, y que la sensibilidad de estas células puede estar relacionada con mutaciones en la ruta PIK3CA/AKT1 (28). En linfomas de células B con sobreexpresión del factor de transcripción MYC, se ha observado que es capaz de inhibir la expresión de este factor de transcripción y matar a las células al desregular la homeostasis de las moléculas oxidorreductoras (29).

En líneas tumorales de leucemia linfoblástica aguda de células T, la concentración mínima inhibitoria que mata al 50% de las células (IC₅₀) se encuentra entre 0,1 y 10 nM; y en células derivadas de pacientes se encuentra entre 13-60 nM (26).

A pesar de todo esto, los estudios clínicos en tumores sólidos y leucemia mieloide crónica, tuvieron que parar por una excesiva cantidad de lactato en sangre y neurotoxicidad (27).

2. Materiales y métodos

2.1 Fármacos.

El fármaco principal con el que se ha trabajado es el IACS-010759. Este está alicuotado a una concentración de 1064,8 µM, diluido en DMSO. También, se ha utilizado el fármaco S63845, alicuotado a una concentración de 1 mM, diluido en DMSO. Ambos se almacenan a -80°C.

2.2 Líneas celulares

En este trabajo se han empleado 7 líneas diferentes de MM (MM1S, U266, RPMI 8226, KMS-12-BM, KMS-34, OPM-2 y NCI-H929) cada una con diferentes alteraciones genéticas características de la enfermedad. Para cultivarlas se ha utilizado medio RPMI 1640 con SFB (10% para todas las líneas utilizadas, salvo las KMS-12-BM que requieren un 15%), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, excepto en el caso del medio utilizado para las células RPMI 8226, que no lleva antibióticos. Además, este último lleva el SFB descomplementado para lo cual se deja 30 min en una estufa a unos 60°C. Para el cultivo celular se ha tenido en cuenta que las células MM1S son una línea celular semi-adherente que necesita la utilización de un raspador o “scraper” para poder separar todas las células del frasco de cultivo. Las células RPMI tienen un crecimiento rápido y un metabolismo que acidifica el medio, lo que puede afectar a su viabilidad, por lo que se siembran a una densidad más baja y en frascos T75.

2.3 Determinación de densidad y viabilidad.

Para esto, primero se resuspenden las células en sus frascos de cultivos. Luego, se mezclan 50 µL de cultivo celular con otros 50 µL de Azul tripán (Azul tripán al 0,4% disuelto en NaCl 0,15 M), y se carga la cámara de Neubauer que nos permite determinar la cantidad de células vivas y muertas, al visualizarlas al microscopio óptico. Esto se hace contando todas las células que hay en los cuatro cuadrantes de la cámara. Luego, se restan todas aquellas células teñidas de azul. El Azul tripán solo entra a la célula cuando se ha visto afectada la integridad de la membrana y, por lo tanto, la célula está muerta o en proceso de morir. Esto nos indica la cantidad de células vivas que hay en los cuatro cuadrantes. Para determinar la densidad se utiliza esta fórmula: (Células vivas*dilución*10⁴)/número de cuadrantes contados = número de células viables/mL. El porcentaje de células viables sobre el total de células contadas es la viabilidad.

2.4 Ensayo MTT

Esta técnica se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio (MTT) en formazán insoluble por las reductasas mitocondriales (30). La disolución de MTT es de 5 mg/ml en tampón fosfato salino (PBS). Esta técnica nos permite medir la viabilidad metabólica de la célula.

Para obtener valores de absorbancia adecuados se ajusta la densidad de siembra en función del tamaño y velocidad de crecimiento de las células. Las líneas MM1S y RPMI 8226, se siembran a una densidad de $4 \cdot 10^5$ células/mL y $1,5 \cdot 10^5$ células/mL, respectivamente. El resto de células se siembran a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células/mL.

Para cada experimento se determina la densidad y viabilidad de los cultivos según lo indicado en el apartado 2.3, y únicamente se continua con el experimento cuando la viabilidad es superior al 85%. Después, se trasvaza el volumen necesario a un tubo de centrífuga. En nuestro caso, se requieren $3,9 \cdot 10^5$ células vivas de RPMI 8226; de MM1S, $1,04 \cdot 10^6$ y, de cada una del resto de líneas, $7,8 \cdot 10^5$ células vivas. Luego, se centrifugan a 1000 rpm durante 5 min, excepto la línea RPMI 8226 que se centrifuga a 800 rpm durante 5 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en 2,6 mL, para así conseguir las densidades de células antes mencionadas. Estas se siembran en una placa de 96 pocillos de fondo plano marca Corning®. En cada pocillo se añaden 100 μ L de las suspensiones celulares preparadas. En una de las columnas de pocillos de la placa se ponen los “blancos”, pocillos sólo con medio de cultivo.

Para conseguir las concentraciones de fármaco deseadas a partir de la solución stock, se preparan varias diluciones intermedias a concentraciones 2 μ M y 0,25 μ M, utilizando medio completo para diluir.

En la placa de 96 pocillos, por cada línea se ponen varias condiciones: control y células tratadas a distintas concentraciones del fármaco (5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM y 80 nM). Para cada una de estas condiciones se utilizan 4 pocillos o réplicas técnicas. Para la concentración de 5 nM se añaden 2 μ L de la disolución 0,25 μ M al pocillo; para la de 10nM, se añaden 4 μ L de la misma dilución; y para la de 20 nM, 8 μ L. En el caso de las concentraciones de 40 nM y 80 nM, se añaden 2 y 4 μ L, respectivamente, de la dilución de 2 μ M. El volumen añadido no debe superar el 10% del volumen final del pocillo para que la concentración sea la deseada.

Una vez se siembra la placa, se incuban las células con el fármaco durante 72h en el incubador, a 37°C y un 5% de CO₂. Este periodo de tiempo se ha elegido en base a la bibliografía y a experimentos realizados para optimizar el protocolo que aparecen al principio del apartado 3.

Pasadas las 72h, se añaden 10 μ L de MTT a cada uno de los pocillos utilizados de la placa. Se incuba la placa con el MTT durante 3 horas en el incubador y luego, se disuelven los cristales de formazán añadiendo 100 μ L de isopropanol con HCl (disolución que contiene 417 μ L de HCl al 37% (0,05 M) por cada 100 mL de isopropanol) a cada pocillo. Una vez hecho esto, se coloca la placa en un agitador de placas durante 10 minutos para asegurarnos de que todos los cristales se hayan disuelto bien. Finalmente, se realiza la medición de la reacción colorimétrica a 550 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro Biochrom EZ Read 400.

Para el análisis de estos datos se utiliza el programa Excel y el programa GraphPad para la realizar las gráficas y el análisis estadístico. Primero, se hace la media de cada una de las 4 réplicas de la línea celular, a las cuales se les ha quitado la media de los blancos. Con estos datos se calcula la desviación estándar y los normalizamos. El proceso de normalización de los datos se basa en

asignar al control un valor de viabilidad del 100%, ya que es el que presenta un mayor valor de absorbancia, y el resto de los valores se comparan con respecto a este. Se realizan 3 réplicas biológicas en distintos días. También, se calcula la desviación estándar normalizada (31).

2.5 Citometría: ANEXINA V FITC – 7AAD

Para esta técnica se ha realizado un marcate con Anexina V unida a FITC (fluorescencia verde) y 7-AAD (fluorescencia roja), que permite distinguir las células muertas por apoptosis y por necrosis. La Anexina V-FITC marca sólo las células apoptóticas, ya que se une a la fosfatidilserina, molécula que las células solo exponen en la superficie cuando han entrado en apoptosis. En el caso del 7-AAD, este actúa como agente intercalante entre las bases de citosina y guanina. Sólo puede entrar a las células cuando la membrana celular está rota, indicando un proceso de necrosis.

En este caso las densidades celulares que se necesitan para los experimentos son de $1,5 \cdot 10^5$ células vivas/mL en el caso de la línea RPMI 8226 y de $2 \cdot 10^5$ células vivas/mL en el caso del resto de líneas. El volumen final de cada pocillo será de 0,5 mL. Por cada experimento se necesitan $7,5 \cdot 10^5$ células RPMI 8226 vivas y 10^6 células vivas para el resto de las líneas. Para ello, se determina la densidad inicial del cultivo y se deposita el volumen necesario en un tubo de fondo cónico. Se centrifugan, y una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspenden en 5 mL de medio. Se usa el mismo que se ha utilizado para el crecimiento de las respectivas líneas celulares.

En el caso de la línea RPMI 8226, se siembran 8 pocillos en una placa de 24 pocillos. En el caso del resto de líneas, se siembran los 8 pocillos en una placa de 48 pocillos. Se siembran 500 μ L por cada pocillo con las densidades antes indicadas.

Para preparar el fármaco, se hace una dilución 1:200. Donde se coge 1 μ L de la alícuota del fármaco y se lleva a 200 μ L utilizando el medio como diluyente, obteniendo una disolución de concentración 5,324 μ M.

Las células se trataron con concentraciones de 20, 40 y 80 nM de IACS-010759. Para ello se siembran 2 pocillos a modo de control y 2 pocillos por cada concentración del fármaco. En los pocillos de 20 nM se añaden 1,9 μ L de la disolución del fármaco, en los de 40 nM, 3,76 μ L y en los de 80 nM, 7,5 μ L. Se deja la placa incubar durante 72h en el incubador.

Para la citometría, se realiza una mezcla en la que por cada pocillo se añaden 50 μ L de ABB (Annexin Binding Buffer, HEPES, CaCl₂ 25 mM y NaCl 1,4 M; ajustado a un pH de 7,4), 0,1 μ L de Anexina V-FITC y 1 μ L de 7AAD. De esta mezcla se añade a cada pocillo 50 μ L y se dejan incubar durante 15 minutos.

Posteriormente, se pasa el contenido a tubos de citometría y se analizan en un citómetro, modelo BD FACSCalibur. El software empleado durante la adquisición de las muestras es el Cellquest Pro. Una vez obtenidos los datos, se analizan manualmente con FlowJo, un programa de análisis para citometría. Luego, se representan y se lleva a cabo el análisis estadístico con GraphPad. Se usa un test t de Student no emparejado con corrección de Welch's, donde se asume distribución Gaussiana.

2.6 Determinación de la sinergia con S63845

Esta prueba trata de encontrar sinergia entre el fármaco IACS-010759 y el mimético BH3 que inhibe a Mcl-1, S63845. Este experimento se basó en el análisis de la viabilidad celular a través de la técnica de marcaje de Anexina V-FITC con 7-AAD explicado en el punto anterior.

En base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se escogieron 3 líneas celulares: KMS-34, OPM-2 y RPMI 8226. KMS-34 se escoge debido a que en los experimentos realizados anteriormente se ha observado que era resistente al fármaco IACS-010759. OPM-2 se ha elegido porque presenta unas características intermedias con respecto al resto de líneas celulares estudiadas. Por último, se ha escogido a RPMI 8226, ya que esta es la línea que más rápido se duplica de las 7 estudiadas.

Como se ha explicado anteriormente, la densidad de la línea RPMI 8226 en el pocillo tiene que ser de $1,5 \cdot 10^5$ células vivas/mL y para el resto de líneas, $2 \cdot 10^5$ células vivas/mL. El volumen final del pocillo son 0,5 mL.

Para estudiar la sinergia, se utilizaron varias concentraciones de S63845 determinadas en experimentos previos del grupo de investigación (32) y una concentración de IACS-010759 que reduzca la viabilidad a menos del 70%. Elegimos 40 nM.

En el caso de la línea RPMI 8226 se utiliza una placa de 24 pocillos. En esta, se siembran células control, células tratadas con las concentraciones de fármacos individuales (IACS-010759 40 nM; S63845 10, 25 y 50 nM) y células tratadas con las combinaciones de fármacos (S63845 10 nM+IACS-010759 40 nM, S63845 25 nM+IACS-010759 40 nM y S63845 50 nM+IACS-010759 40 nM). Cada condición está por duplicado en la placa.

Por otro lado, para la línea KMS-34 se utiliza una placa de 48 pocillos. En esta, se siembran los pocillos de forma parecida a la anterior línea. Pero esta vez las concentraciones de S63845 usadas son 100 nM y 500 nM. En la misma placa, sembramos de igual forma la línea OPM-2. En este caso solo usamos una concentración de 2,5 nM de S63845. La distribución de todas las placas está detallada en el **ANEXO I**.

Las alícuotas de S63845 se encuentran muy concentradas, 1mM, porque es un fármaco que tolera mal las fases de descongelación. Por esto se cambia de alícuota a partir de la segunda descongelación. Para obtener las concentraciones de S63845 específicas de RPMI 8226, se hace una dilución 1/250. De esta, se añade en los pocillos el volumen necesario para obtener una concentración final del fármaco en el pocillo de 10, 25 y 50 nM. Para las concentraciones de S63845 para KMS-34, se hace una dilución 2/40. De esta, se añaden los volúmenes específicos para obtener una concentración final del fármaco en el pocillo de 100 y 500 nM. En el caso de OPM-2, se hace una dilución 1/1000. De esta se administra a cada pocillo un volumen fijo para obtener una concentración final del fármaco en el pocillo de 2,5 nM. Para preparar IACS-010759 40 nM para todas las líneas celulares se realiza el procedimiento descrito en el apartado 2.5.

Posteriormente, se utiliza el mismo protocolo de marcaje con Anexina V-FITC y 7-AAD utilizado en el punto 2.5. Para analizar la sinergia de las diversas concentraciones de fármacos, se utiliza el índice de Bliss.

En este, se calcula de la siguiente forma:

$$E_a + E_b - ((E_a * E_b) / 100) = E_{esp} \quad E_{obs} - E_{esp} = \text{Índice de Bliss}$$

Figura 3. Fórmula para el cálculo del índice de Bliss para combinaciones de fármacos. Donde E_{esp} es la muerte esperada teóricamente, E_a es la muerte producida por el efecto únicamente de IACS-010759, E_b es la muerte producida por el efecto de S63845 a una concentración determinada. E_{obs} es la muerte observada, es la que se obtiene en el experimento al medir el efecto que tiene la combinación de fármacos cuando actúan a la vez, se hace para cada concentración distinta (33).

Se considera que cuando hay una diferencia de 10 entre los porcentajes de muerte observada y esperada se considera que puede haber un efecto significativo. Si el índice de Bliss es positivo indica posible sinergia, pero si es negativo indica posible antagonismo (33).

3. Resultados

3.1 Efecto sobre la proliferación celular y la viabilidad metabólica.

Para determinar, previamente, las horas de incubación del fármaco necesarias para observar sus efectos, se hicieron varias pruebas a distintos tiempos con las 7 líneas de MM.

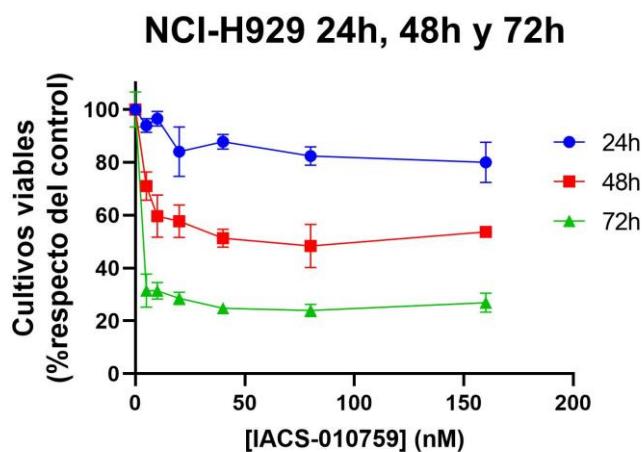
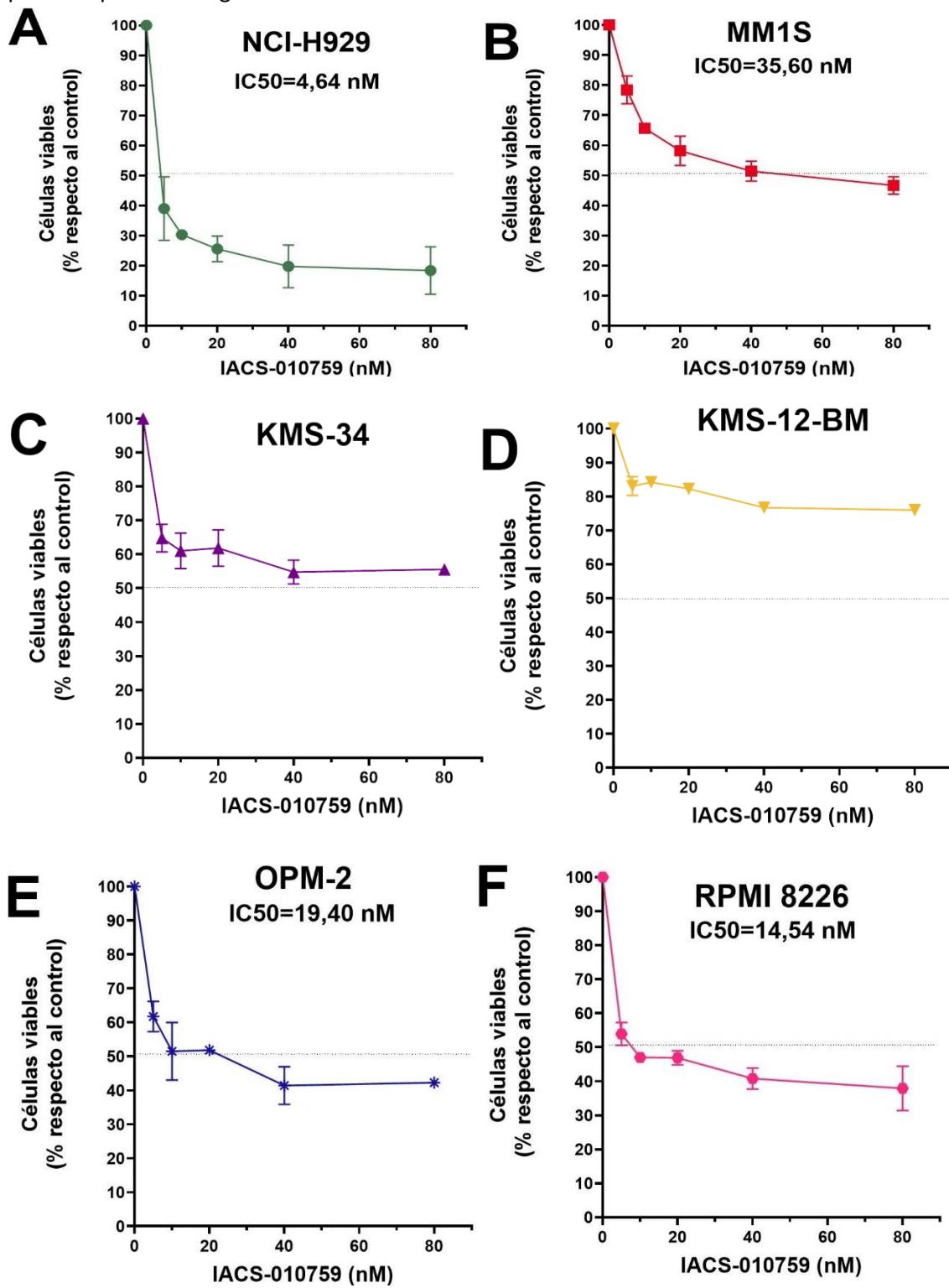


Figura 4. Viabilidad celular de la línea NCI-H929 a diferentes concentraciones de IACS-010759 a 24, 48 y 72 horas. En esta se indica el porcentaje normalizado de células viables respecto al control a una concentración de IACS-010759 determinada y a un tiempo de incubación específico. Se realizó un solo experimento independiente por cada tiempo de incubación, incluyendo entre 4 y 8 réplicas de la misma concentración de IACS-010759 para así determinar la desviación estándar. El resto de gráficas se pueden consultar en el **ANEXO II**.

Respecto a las gráficas iniciales se ha visto que un tiempo idóneo de incubación puede ser de 72h, como ya indican otros estudios (27). Esto es debido a que si se hace a tiempos de incubación menores, el IC50 de la mayoría de las líneas es bastante mayor al rango de concentraciones que estamos empleando.

En vista de los resultados anteriores, se decidió evaluar la sensibilidad de todas las líneas a 72 h. Para determinar la variabilidad entre los experimentos, se han realizado 3 réplicas del mismo por cada punto de la gráfica. La desviación estándar se indica con una barra de error.



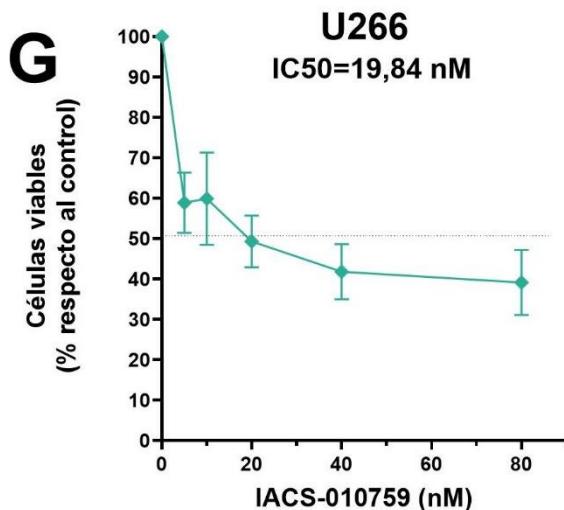


Figura 5. Efecto de IACS-010759 sobre la viabilidad metabólica en células de MM. Se indica el porcentaje de células viables metabólicamente respecto del control (eje de ordenadas) frente a la concentración de IACS-010759 (eje horizontal). La viabilidad se estudia en las distintas líneas celulares de MM: NCI-H929 (**A**), MM1S(**B**), KMS-34 (**C**), KMS-12-BM (**D**), OPM-2 (**E**), RPMI 8226 (**F**) y U266 (**G**). También, se indica la desviación estándar en forma de barras de error. Cada punto se ha calculado a partir de 3 experimentos, en cada uno de los cuales se han hecho 4 réplicas para el mismo punto. La desviación estándar está indicada por una barra de error. Para el cálculo del IC₅₀ se ha utilizado una regresión no lineal generada mediante el programa GraphPad.

Los resultados de los ensayos MTT con el fármaco IACS-010759 han sido heterogéneos. En base a ellos, se pueden clasificar las distintas líneas celulares en tres grupos: resistentes, sensibles y muy sensibles.

Resistentes: Aquí se han incluido aquellas líneas que no han pasado el 50% de células viables respecto del control, es decir, su IC₅₀ no se encuentra en el rango planteado en el experimento. En este grupo se encuentran las KMS-12-BM (**Figura 5D**) y las KMS-34 (**Figura 5C**). Especialmente en el caso de la línea KMS-12-BM, el IACS-010759 no produjo una reducción más allá del 20% en el número de células viables respecto al control, incluso a las concentraciones más altas.

Sensibles: En este grupo se engloban aquellas líneas que han alcanzado porcentajes de viabilidad celular menores del 50% respecto del control, es decir, se ha podido determinar su IC₅₀. En este grupo se encuentran las MM1S (**Figura 5B**), las OPM-2 (**Figura 5E**), las RPMI 8226 (**Figura 5F**) y las U266 (**Figura 5G**).

Muy sensible: En esta categoría se encuentran aquellas líneas cuyos porcentajes de viabilidad no sólo se sitúan por debajo del 50%, sino que, también, han bajado del 25%. En este grupo se encuentran las NCI-H929 (**Figura 5A**), que presenta la menor IC₅₀ de todas las líneas estudiadas.

3.2 Efecto sobre la muerte celular.

Una vez determinada la sensibilidad mediante el test MTT, se decidió analizar si el compuesto induce muerte celular en alguna de las líneas. Para ello se trataron con tres concentraciones

diferentes (20, 40 y 80 nM) durante 72 horas y se analizó la muerte celular por citometría de flujo tras el marcaje con Anexina V-FITC y 7-AAD, según lo descrito en el apartado 2.5. Para cada línea se han realizado 3 réplicas biológicas del mismo experimento, calculándose de estas la desviación estándar para cada punto. También, se indica la diferencia significativa de los distintos pocos respecto del control. Para ello se ha usado un test t de Student no emparejado con corrección de Welch's, donde se ha asumido distribución Gaussiana.

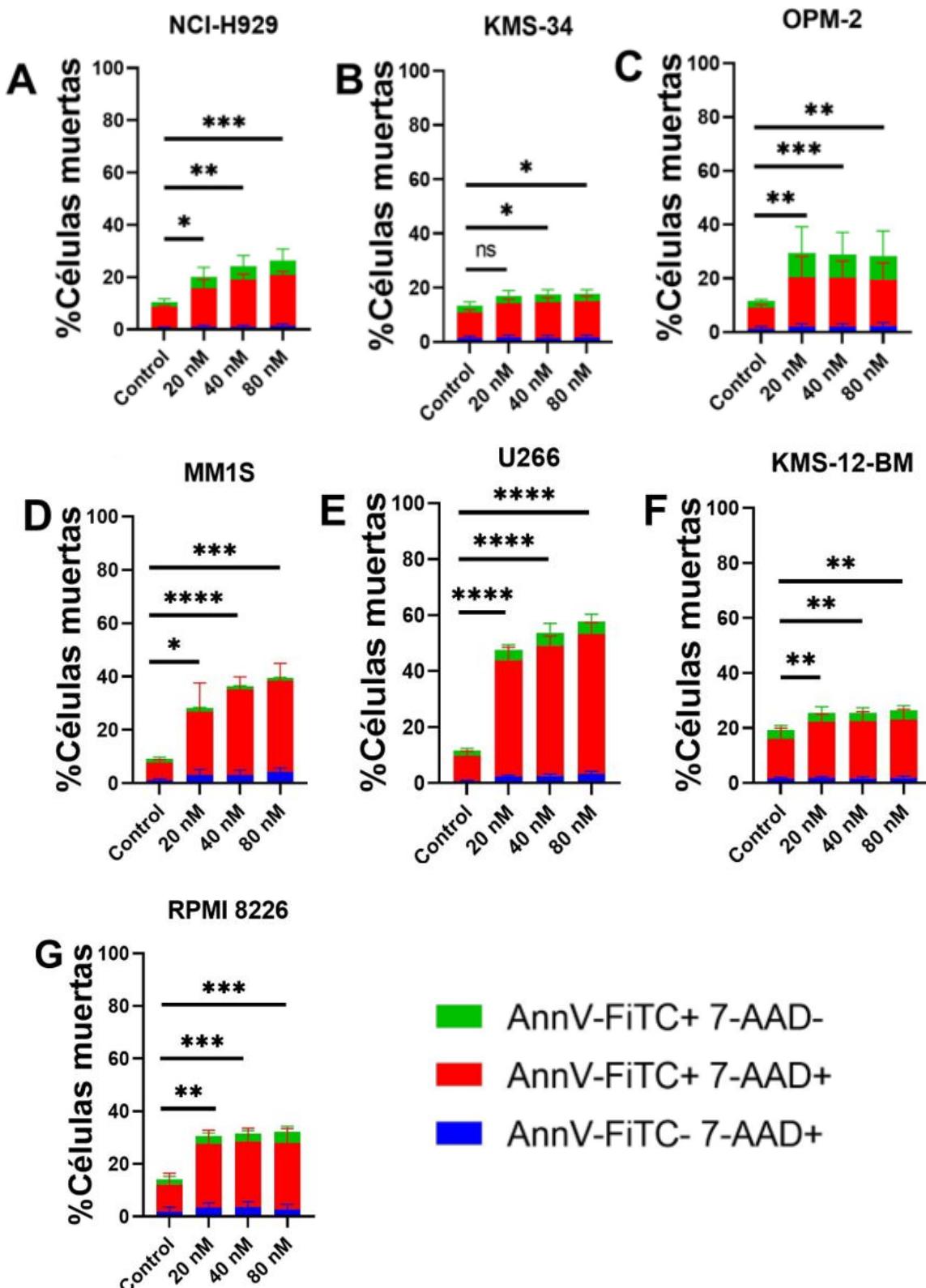


Figura 6. Efecto de IACS-010759 sobre la viabilidad celular en líneas de MM. Se indica el porcentaje de células muertas (eje de ordenadas) frente a la concentración de IACS-010759 (eje horizontal) en las siete líneas celulares de MM estudiadas: NCI-H929 (**A**), KMS-34 (**B**), OPM-2 (**C**), MM1S (**D**), U266 (**E**), KMS-12-BM (**F**) y RPMI 8226 (**G**). En cada barra del gráfico se indica qué fracción de esas células muertas ha sido marcada por Anexina V-FITC y por 7-AAD (rojo), cuál ha sido marcada solo por el 7-AAD (azul) y cuál ha sido solo marcada por Anexina V-FITC (Verde). También, se indica la desviación estándar en forma de barras de error. Cada punto se ha calculado a partir de 3 experimentos, en cada uno de los cuales se han hecho 2 réplicas para el mismo punto. Para el análisis estadístico se ha usado un test t de Student no apareado con corrección de Welch's, donde se ha asumido distribución Gaussiana. El análisis estadístico se ha realizado con el programa GraphPad Prism. La significancia se ha indicado de esta forma: Pvalor>0,05 (ns) no hay diferencia significativa; 0,01<Pvalor<0,05 (*); 0,001<Pvalor<0,01 (**); 0,0001<Pvalor<0,001(***); Pvalor <0,0001 (****).

Los resultados de las citometrías indican que hay bastante heterogeneidad entre líneas, siendo las más sensibles las líneas U266 y MM1S. Por otra parte, se observa que las células marcadas solo con Anexina V-FITC, generalmente, representan un mayor porcentaje que las marcadas únicamente con 7-AAD o AnexinaV-FITC+. Este doble marcaje indica que las células han expuesto su fosfatidilserina en su superficie, pero también presentan membranas celulares rotas. Podría tratarse de apoptosis tardías, apoptosis normales que con el paso del tiempo acaban rompiendo su membrana celular. El marcaje 7-AAD+/Anexina V-FITC corresponde a células que han muerto por necrosis y sus membranas están rotas, pero parece que este mecanismo de muerte celular es muy minoritario con este tratamiento.

Se ha podido ver que respecto al control, las líneas que más han sufrido muerte celular son la MM1S (**Figura 6D**) y U266 (**Figura 6E**). En estas dos líneas, se ha observado que el porcentaje de necrosis es algo mayor que en el resto de líneas, disminuyendo el porcentaje de células muertas por apoptosis. Aunque el porcentaje que más ha subido es el de células muertas por apoptosis tardía. También, se ve cómo la mortalidad aumenta conforme se aumenta la concentración del fármaco. Se observa que la mortalidad ha sido bastante más importante en la línea U266, alcanzando un 60% con la dosis de 80 nM.

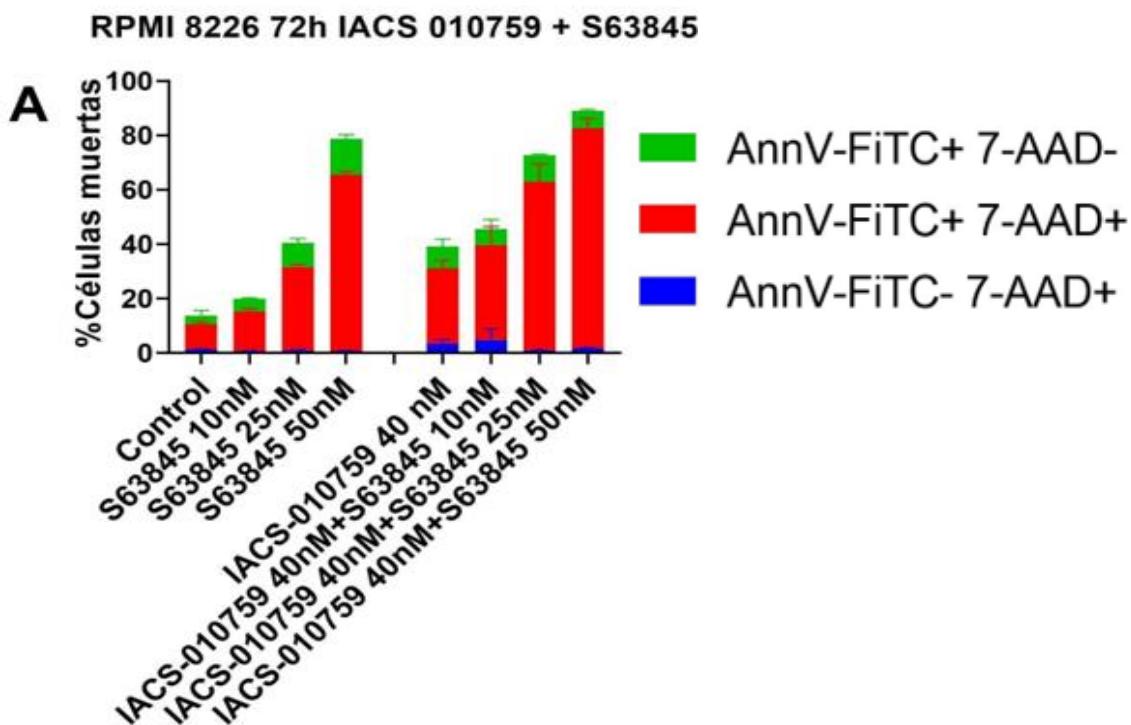
Por otro lado, las líneas que han tenido un menor aumento de la mortalidad respecto del control son las líneas KMS-34 (**Figura 6B**) y KMS-12-BM (**Figura 6F**), lo que concuerda con lo observado en los experimentos del apartado 3.1. En estas el porcentaje de células muertas por apoptosis tardía es el mayoritario. Una diferencia con el grupo anterior es que estas ya parten de una mortalidad basal algo más elevada, aunque no lo suficientemente grande para afectar a los resultados. Se observa que estas líneas no responden con una mayor mortalidad conforme aumentamos el fármaco. Estas presentan un efecto de meseta, donde solo se nota un cambio inicial cuando se exponen al fármaco.

Las líneas NCI-H929 (**Figura 6A**), OPM-2 (**Figura 6C**) y RPMI 8226 (**Figura 6G**), presentan una sensibilidad intermedia entre los dos grupos anteriores.

En resumen, se ha podido ver que la línea celular en la que la viabilidad metabólica bajaba más cuando se la exponía al fármaco, NCI-H929 (**Figura 5A**), no coincide con aquellas en las que la viabilidad por citometría ha disminuido más, MM1S (**Figura 6D**) y U266 (**Figura 6E**).

3.3 Sinergia con S63845.

Dado que la sensibilidad de las líneas de mieloma al IACS-010759, no era muy elevada en casi ningún caso, se decidió evaluar la posible sinergia con otros fármacos. En concreto con el inhibidor de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Las células se trataron con diferentes concentraciones de S63845 y con IACS-010759, solos o combinados. Al cabo de 72 h se determinó el porcentaje de muerte celular mediante marcaje con Anexina V-FITC/7-AAD, como se ha indicado anteriormente. Para realizar estas gráficas se han hecho 3 experimentos distintos por cada gráfica, con dos réplicas en cada punto. A partir de estos datos se ha calculado la desviación estándar, indicada en forma de barras de error.



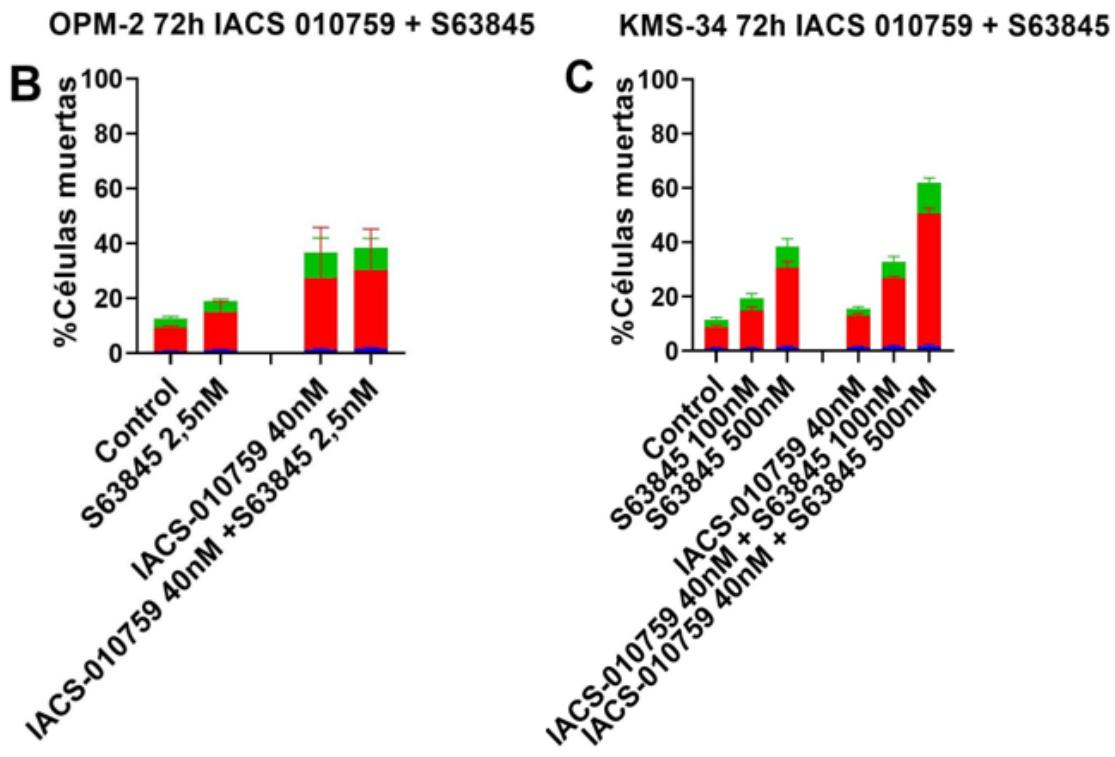


Figura 7. Efecto de la combinación simultánea de IACS-010759 y varias concentraciones de S63845 sobre la viabilidad celular en líneas de MM. Se indica el porcentaje de células muertas (eje de ordenadas) frente a la concentración de IACS-010759 40 nM, varias concentraciones de S63845 y las respectivas combinaciones de ambos fármacos (eje horizontal) en las líneas celulares de MM estudiadas: RPMI 8226 (**A**), OPM-2 (**B**) y KMS-34 (**C**). En cada barra se indica qué fracción de esas células muertas ha sido marcada por Anexina V-FITC y por 7-AAD (rojo), cuál ha sido marcada solo por el 7-AAD (azul) y cuál ha sido solo marcada por Anexina V-FITC (Verde). Cada punto se ha calculado a partir de 3 experimentos (OPM-2 y RPMI 8226) o a partir de 2 experimentos (KMS-34), en cada uno de los cuales se han hecho 2 réplicas para el mismo punto. Se han eliminado dos valores atípicos de la gráfica de la línea RPMI 8226, en la combinación S63845 50 nM + IACS-010759 40 nM.

Respecto a los resultados obtenidos en los experimentos para analizar si hay sinergias entre IACS-010759 y S63845 (**Figura 7**) se observa como la muerte celular provocada solo por IACS-010759 se corresponde a la obtenida en la **Figura 6**. Por otro lado, se ha podido ver que la línea que presenta mayor sensibilidad al S63845 respecto de la concentración utilizada, es OPM-2, luego, le siguen RPMI 8226 y KMS-34. Respecto a RPMI 8226, el valor producido por la administración sola de S63845 50 nM es muy elevado, rozando el 80%. Además, en estas células se aprecia un mayor porcentaje de necrosis que en las otras líneas. Por otro lado, también se observa que las OPM-2 presentan bastante desviación estándar, probablemente debido a la variabilidad en el efecto del IACS-010759, mostrando poca variación entre la muerte producida solo por IACS-010759 y la producida por la combinación de fármacos. Por último, se aprecia cómo el efecto de los fármacos en las KMS-34 es menor que la combinación de ambos, especialmente cuando el IACS-010759 se combina con 500 nM de S63845, produciéndose lo que parece un efecto sinérgico. Para determinar cuantitativamente la posible sinergia entre los dos fármacos, se aplicó el método de Bliss, como se ha indicado en el apartado 2.6.

Para el cálculo del índice de Bliss se han utilizado los valores obtenidos en la **Figura 7** y la fórmula indicada en la **Figura 3**.

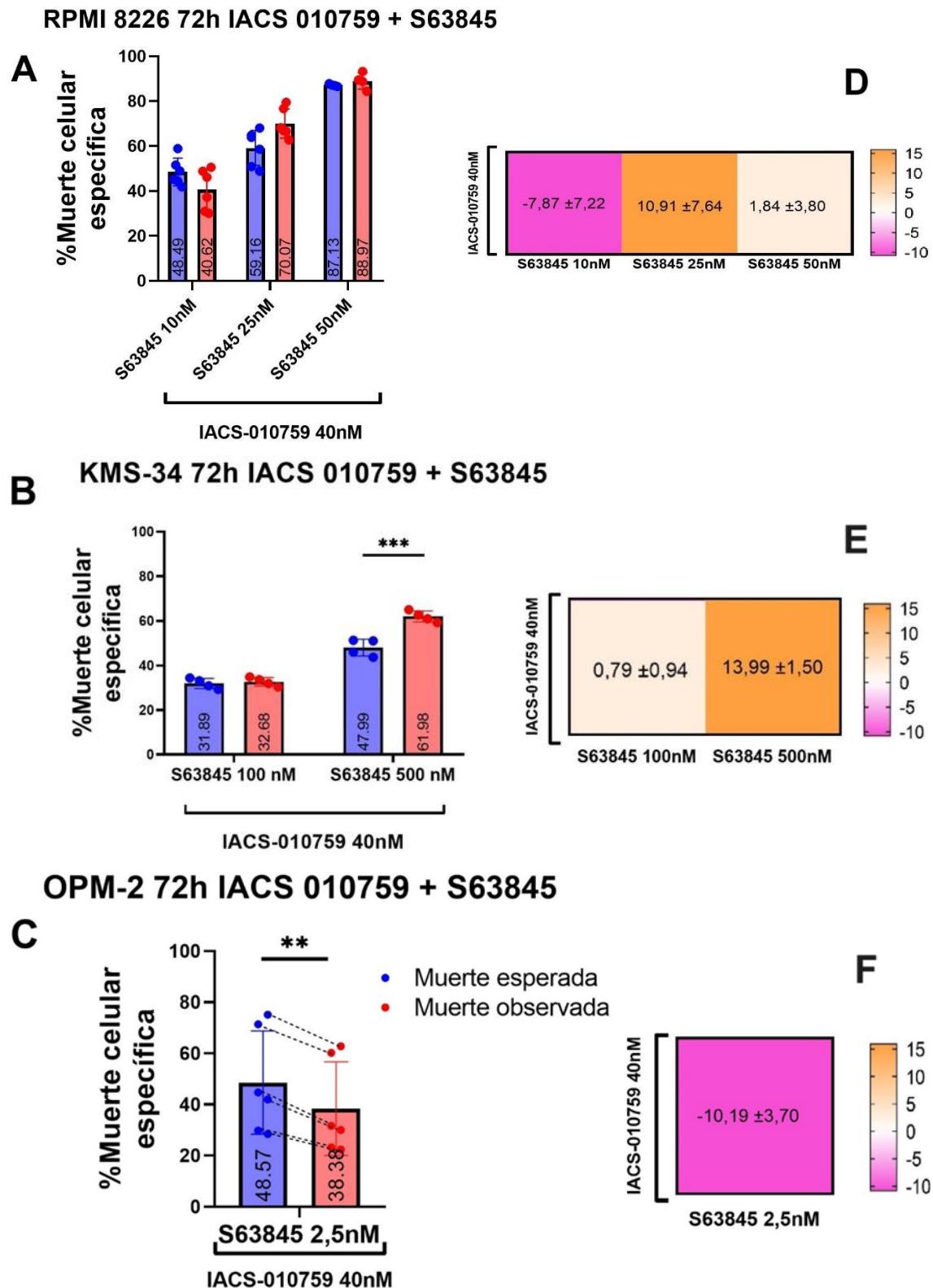


Figura 8. Análisis del efecto combinado de IACS-010759 y S63845 sobre células de MM (A-C)
Las líneas celulares RPMI 8226 (**A**), KMS-34 (**B**) y OPM-2 (**C**), se trataron con las concentraciones indicadas de cada fármaco durante 72h y el porcentaje de muerte celular se determinó mediante citometría de flujo tras el marcaje con Anexina V-FITC/7-AAD. (**D-E**) Índice de Bliss de las combinaciones analizadas en A-C. Las gráficas comparan la muerte específica esperada (ESP), calculada mediante la fórmula de la **Figura 3**, frente a la observada experimentalmente (OBS). Estas derivan de la combinación de IACS-010759 40nM con diferentes concentraciones de S63845. Las tablas recogen la media de la diferencia (OBS - ESP) y la desviación estándar de los valores para las líneas RPMI 8226 (tabla **D**); KMS-34 (tabla **E**) y OPM-2 (tabla **F**). Los resultados vienen de n=2 experimentos independientes en el caso de KMS-34; y de n=3 experimentos en el caso de OPM-2 y RPMI 8226. Se han eliminado dos valores atípicos de la gráfica de la línea RPMI 8226 en el caso de la concentración S63845 50 nM. Para su análisis se usó el test t de Student apareado de dos colas asumiendo distribución Gaussiana, donde se compara la muerte esperada y la observada.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Se observa que los datos del índice de Bliss son relevantes en el caso de OPM-2, ya que se ha sobrepasado la barrera del 10% de diferencia entre lo esperado y lo observado. En su caso se ha sobrepasado por el lado negativo, es decir, la combinación de IACS-010759 y S63845 tiende a producir efectos antagónicos, no sinérgicos. En la **Figura 8C** se puede ver que todos los experimentos realizados tienen tendencia hacia un efecto antagónico. Esto se corrobora con la tabla de la **Figura 8F**, donde el índice de Bliss es más negativo que -10, indicando esto un posible efecto antagónico. También, presenta una diferencia estadística significativa (**). En estos resultados puede afectar que, inicialmente, esta línea es bastante susceptible a S63845, por lo que se utilizó únicamente una concentración muy baja del mismo. A pesar de esto, no se puede descartar que en otras concentraciones de IACS-010759 o de S63845 se pueda producir un efecto sinérgico.

En el caso de KMS-34 (**Figura 8B y 8E**), se aprecia que no hay diferencias significativas entre la muerte esperada y observada a concentración 100 nM de S63845. Por otro lado, en la combinación de concentración 500 nM de S63845, sí que se ha podido observar un efecto sinérgico. En este caso presenta una diferencia de 14% entre la esperada y la observada. Como se alcanza un porcentaje mayor al 10% de diferencia, se considera una posible sinergia. Además, presenta una diferencia significativa (**). Para próximos estudios sería adecuado realizar más experimentos para confirmar la reproducibilidad de los resultados.

Por otro lado, en el caso de RPMI 8226 (**Figura 8A y 8D**), se observa como a la concentración de 10 nM de S63845 hay una tendencia hacia un efecto antagónico, pero sin sobrepasar el -10% establecido para considerarse como tal. En el caso de la concentración 25 nM, se aprecia que tiene tendencia a producir un efecto sinérgico superando el umbral del +10%, aunque ligeramente, e indicando que hay un efecto sinérgico. En el caso de 50 nM, los valores esperados y observados son prácticamente los mismos, por lo que solo habría un efecto aditivo. En este último resultado también ha influido que, como se observa en la **Figura 7A**, la muerte celular solo con S63845 en algunos casos ya supera el 80%, por lo que si hay sinergia, esta puede que

no se haya identificado por el pequeño margen hasta el 100%. En próximos experimentos se recomienda trabajar con concentraciones más bajas de S63845 y realizar un mayor número de experimentos para verificar la reproducibilidad.

Por otra parte, se observó que había una variación significativa en el pH de los pocillos donde se administró la combinación de fármacos. Estos eran más básicos que los pocillos donde solo había IACS-010759, salvo en el caso de OPM-2. Esto se pudo determinar gracias al colorante rojo fenol que llevan los medios de cultivo. Se puede ver en el **ANEXO III**.

4. Discusión

En la gran mayoría de cánceres, tanto sólidos como hematológicos, el efecto Warburg es muy importante en su desarrollo y es considerado una de las señas de identidad de las células tumorales (REF) (34). Con este efecto se simula una ausencia de oxígeno, por lo que la gran mayoría de la energía se consigue de manera anaerobia, gracias a la glucólisis. Además, este aumento de la glucólisis aumenta la secreción del lactato al microambiente tumoral (TME). Esto modifica el metabolismo de las células de alrededor, donde se favorece el efecto Warburg reversible y, además, se reduce la actividad del sistema inmune (13, 35).

En MM, este proceso está estrechamente regulado mediante diversos genes, entre ellos, el más importante es el que codifica el factor de transcripción HIF1 α . Este se encarga de regular numerosos genes relacionados con la glucólisis, la angiogénesis, la regulación del pH, la metástasis o la proliferación celular, entre otras funciones (36). En lo que respecta a la glucólisis, HIF1 α incrementa la síntesis de enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa. En una situación normal, la proteína Beclina 1 se encuentra unida a Bcl-2 y Bcl-XL, inhibiendo la autofagia de las mitocondrias. Pero cuando se activa HIF-1, se sintetizan BNIP3 y BNIP3L, que desplazan a Bcl-2 y Bcl-XL, favoreciéndola. Esto sucede así porque en una situación de hipoxia se produce un aumento de las ROS, que son muy dañinas para la célula, en la mitocondria. Por lo tanto, reduciendo el número de mitocondrias, disminuirá la concentración de ROS. También, HIF1 α redirige el flujo de glucosa a la formación de ácidos grasos, en vez de ir al ciclo de Krebs (37). El conjunto de funciones de esta proteína se puede ver en el **ANEXO IV**. Se han desarrollado diferentes fármacos que son capaces de inhibir selectivamente este gen. También, se ha visto que diversos inhibidores del complejo I de la cadena de transporte de electrones son capaces de reducir su activación, como la metformina o el fármaco con el que se ha trabajado, IACS-010759 (38). HIF1 α junto a MYC, favorece, además, la sobreexpresión de los diferentes transportadores y enzimas que actúan en la glucólisis, como la lactato deshidrogenasa A (LDHA) (39).

Otro punto importante del metabolismo del MM es la dependencia de la glutamina. Este aminoácido es captado en grandes cantidades por las células de MM y es usado como combustible, en sustitución de la glucosa, para que funcione el ciclo de Krebs. Para ello, se transforma en α -cetoglutarato (37).

Respecto al fármaco en estudio, IACS-010759, se ha visto que, en cánceres de mama positivos para el receptor de estrógenos, es capaz de reducir el tamaño del tumor, al contrario que otros inhibidores del complejo 1, como la metformina. En estos estudios se ha visto que el fármaco inhibe genes relacionados con la replicación, la mitosis y con los puntos de no retorno del ciclo

celular. Además, se activan genes relacionados con la muerte celular (28). En estudios llevados a cabo en tumores cerebrales y modelos de leucemia mieloide aguda (AML) se ha visto una fuerte inhibición del crecimiento y un aumento de la apoptosis (38). Estos resultados se corresponden con algunos de los observados en nuestras líneas, como se muestra en la **Figura 5 y 6**. En nuestros experimentos, se observa que las células de MM tienden a ralentizar su crecimiento, efecto citostático, y solo en algunas líneas se ha visto que produzca un efecto citotóxico, como se ve en la **Figura 6 D y E**.

Por otro lado, se ha visto que este fármaco reduce la presencia de ácidos grasos de cadena larga; este hecho también coincide con la inhibición de HIF1 α (37, 28). Así mismo, se ha observado que aquellas células con más glutatión presentan una mayor resistencia al fármaco. Esto es debido a que el glutatión se encarga de neutralizar las ROS producidas, siendo esto otra posible explicación para la existencia de líneas de MM resistentes al IACS-010759 (37). Por otro lado, se ha demostrado que este fármaco reduce la formación de aspartato, lo que conlleva una reducción en la producción de nucleótidos púricos (38).

En nuestros experimentos se observa que aquellas líneas en las que la viabilidad metabólica se ha reducido menos, KMS-12-BM (**Figura 5D**) y KMS-34 (**Figura 5C**), se ha podido ver también que estas presentan un menor porcentaje de células muertas. Nuestros resultados parecen indicar que aquellas líneas en las que los procesos metabólicos no se ven excesivamente afectados, tienen una mayor supervivencia frente al fármaco. Un dato adicional a destacar es que, estas células resistentes, a la hora de cultivarse tienden a acidificar el medio antes que otras líneas. A partir de esta observación podríamos hipotetizar que estas células de forma intrínseca tienen un metabolismo más dirigido hacia la glucólisis y la fermentación láctica y, por lo tanto, cuando se inhibe la cadena de electrones y el ciclo de Krebs por acción del fármaco, esto no supone un cambio tan brusco con respecto a las otras líneas. Además, si estas son menos dependientes de la obtención de energía a través de la cadena transportadora de electrones, habrá menos ROS inducidas por el fármaco y podrían sobrevivir mejor. En estudios realizados sobre células de AML se ha visto que las células más sensibles al fármaco son las que tienen una menor capacidad para compensar la inhibición de la cadena de transporte de electrones con la glucólisis (38). En otros estudios se vio que en el caso de KMS-12-BM la actividad de su complejo I está muy inhibida de forma natural, dependiendo energéticamente más de la glucólisis (40).

En investigaciones con células de AML, se ha visto que la proteína Mcl-1, a la cual inhibimos con S63845, regula el metabolismo al unirse directamente a la hexoquinasa 2 (HK2) (41). HK2 se encarga de realizar la primera etapa de la glucólisis y se encuentra sobreexpresada en la mayoría de cánceres que presentan el efecto Warburg. Esta se encuentra en la membrana externa mitocondrial, favoreciendo la capacitación del ATP recién producido, y favoreciendo así la glucólisis (35). Esta proteína se encuentra especialmente sobreexpresada en las células de MM (42). La inhibición por parte de S63845 de Mcl-1 produce una inhibición de la actividad de HK2. Esta inhibición de la glucólisis, junto a la inhibición del complejo I por IACS-010759 y a la propia acción de inhibir una proteína anti-apoptótica (22), podría ser la explicación de por qué se han producido las distintas sinergias en las **Figuras 7 y 8**. No obstante, no explicaría por qué se produce el antagonismo en la línea OPM-2.

Un proceso parecido ocurre con el inhibidor de Bcl-2, Venetoclax. Las células más sensibles a este fármaco son aquellas que tienen menor actividad de los complejos I y II de la cadena de electrones, viéndose que el uso de inhibidores como IACS-010759 sensibiliza las células resistentes al Venetoclax (40).

Por último, a través del análisis visual del color del medio, que indica un cambio en su pH, se ha podido observar un fenómeno importante. Como se puede ver en la línea RPMI 8226 en el **ANEXO III**, tanto el control como los pocillos con IACS-010759 presentan una coloración amarillenta, indicando una bajada del pH. Este color es habitual en el control debido al propio crecimiento de las células, pero, en el caso del IACS-010759, es un efecto secundario de inhibir la cadena transportadora de electrones. Como se ha dicho anteriormente, al favorecer la glucólisis, se emite más ácido láctico al exterior de la célula, acidificando el medio. Sin embargo, si nos fijamos en los pocillos con S63845 en el **ANEXO III**, indicados como iMLC o MLC, se observa que presentan un pH más básico, probablemente debido a que se ha reducido la producción de lactato al inhibir la HK2 (35). En las combinaciones, se aprecia que a bajas concentraciones de S63845 todavía se produce acidificación del medio, pero a concentraciones más altas, se inhibe dicho proceso. Esto parece indicar que aparte del efecto sinérgico sobre la reducción de la viabilidad celular, también se produce una mayor protección frente a la acidificación. Este hecho es muy importante, ya que los estudios clínicos con IACS-010759 se pararon debido a la elevada acidosis que producía (27). Algo similar se puede ver en el **ANEXO II** con la línea KMS-34. Curiosamente, en el caso de las OPM-2, además de producirse un posible antagonismo en la reducción de la viabilidad celular, tampoco se observa este fenómeno. Como perspectivas futuras, se recomendaría analizar este efecto con métodos más específicos y sensibles.

5. Conclusiones

-El fármaco IACS-010759 presenta una actividad citostática en las líneas RPMI 8226, NCI-H929, OPM-2, KMS-34, KMS-12-BM; y citotóxica en U266 y MM.1S.

- Las líneas KMS-34 y KMS-12-BM son resistentes al fármaco.

-En algunas líneas celulares se produce sinergia entre IACS-010759 y S63845, observándose en estas una disminución de la viabilidad celular y una reducción en la acidificación del medio. Se necesitan estudios más amplios y técnicas más sensibles para verificar estos datos.

Conclusions

- The drug IACS-010759 exhibits cytostatic activity in the RPMI 8226, NCI-H929, OPM-2, KMS-34, and KMS-12-BM lines, and cytotoxic activity in U266 and MM.1S.

- The KMS-34 and KMS-12-BM lines are resistant to the drug.

- In some cell lines, synergy between IACS-010759 and S63845 has been observed, resulting in decreased cell viability and reduced medium acidification. More extensive studies and more sensitive techniques are needed to verify these findings.

6. Bibliografía

1. Brigle K, Rogers B. PATHOBIOLOGY AND DIAGNOSIS OF MULTIPLE MYELOMA. 2017

2. van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to multiple myeloma, a paradigm for clonal evolution of premalignant cells. Vol. 78, *Cancer Research*. 2018.
3. Smadja N V., Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia*. 1998;12(6):960–9.
4. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2562–7.
5. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):296–303.
6. He S, Yang S, Niu M, Zhong Y, Gao D, Zhang Y, et al. HMG-box transcription factor 1: a positive regulator of the G1/S transition through the Cyclin-CDK-CDKI molecular network in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 1;9(2).
7. Jiang Y, Zhang C, Lu L, Wang X, Liu H, Jiang Y, et al. The Prognostic Role of Cyclin D1 in Multiple Myeloma: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 21, *Technology in Cancer Research and Treatment*. SAGE Publications Inc.; 2022.
8. Tasidou A, Roussou M, Terpos E, Kastritis E, Gkotzamanidou M, Gavriatopoulou M, et al. Increased expression of cyclin-D1 on trephine bone marrow biopsies independently predicts for shorter overall survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Am J Hematol*. 2012 Jul;87(7):734–6.
9. Cook JR, Hsi ED, Worley S, Tubbs RR, Hussein M. Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. *Am J Clin Pathol*. 2006 Apr 1;125(4):615–24.
10. Perrot A, Corre J, Avet-Loiseau H. Risk Stratification and Targets in Multiple Myeloma: From Genomics to the Bedside. American Society of Clinical Oncology Educational Book. 2018;(38).
11. Voskarides K, Giannopoulou N. The Role of TP53 in Adaptation and Evolution. *Cells*. 2023 Feb 1;12(3).
12. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, Heffner LT, Hofmeister CC, Bernal L, et al. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer Journal* 2019 9:12. 2019 Nov 25;9(12):1–13.
13. Warburg O. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science* (1979). 1956 Aug 10;124(3215):269–70.
14. Jia D, Lu M, Jung KH, Park JH, Yu L, Onuchic JN, et al. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Feb 26;116(9):3909–18.
15. Bhatt P, Kloock C, Comenzo R. Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: A Review of Available Therapies and Clinical Scenarios Encountered in Myeloma Relapse. Vol. 30, *Current Oncology*. MDPI; 2023. p. 2322–47.
16. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3).

17. Magen H, Muchtar E. Elotuzumab: the first approved monoclonal antibody for multiple myeloma treatment. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(4).
18. Sun SC. The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. 2017.
19. Gandolfi S, Laubach JP, Hidemitsu T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2017;36(4).
20. Marie Hardwick J, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Feb;5(2).
21. Carrington EM, Zhan Y, Brady JL, Zhang JG, Sutherland RM, Anstee NS, et al. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ*. 2017 ;24:878–88.
22. Townsend PA, Kozhevnikova M V., Cexus ONF, Zamyatnin AA, Soond SM. BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2021 40:1. 2021 Nov 9;40(1):1–33.
23. Sidiqi MH, Al Saleh AS, Kumar SK, Leung N, Jevremovic D, Muchtar E, et al. Venetoclax for the treatment of multiple myeloma: Outcomes outside of clinical trials. *Am J Hematol*. 2021;96(9).
24. Lemberg KM, Gori SS, Tsukamoto T, Rais R, Slusher BS. Clinical development of metabolic inhibitors for oncology. *Journal of Clinical Investigation*. 2022 Jan 4;132(1).
25. Tsuji A, Akao T, Masuya T, Murai M, Miyoshi H. IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(21).
26. Baran N, Lodi A, Dhungana Y, Herbrich S, Collins M, Sweeney S, et al. Inhibition of mitochondrial complex I reverses NOTCH1-driven metabolic reprogramming in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
27. Yap TA, Daver N, Mahendra M, Zhang J, Kamiya-Matsuoka C, Meric-Bernstam F, et al. Complex I inhibitor of oxidative phosphorylation in advanced solid tumors and acute myeloid leukemia: phase I trials. *Nat Med*. 2023;29(1).
28. El-Botty R, Morisset L, Montaudon E, Tariq Z, Schnitzler A, Bacci M, et al. Oxidative phosphorylation is a metabolic vulnerability of endocrine therapy and palbociclib resistant metastatic breast cancers. *Nat Commun*. 2023;14(1).
29. Donati G, Nicoli P, Verrecchia A, Vallelonga V, Croci O, Rodighiero S, et al. Oxidative stress enhances the therapeutic action of a respiratory inhibitor in MYC -driven lymphoma . *EMBO Mol Med*. 2023;15(6).
30. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6):469–71.
31. Normalized Function, Normalized Data and Normalization - Statistics How To.
32. Benedí Visiedo A. Miméticos BH3 e inhibidores de aurora quinasa y de HSP90: Estudio de su mecanismo de acción y búsqueda de combinaciones potencialmente sinérgicas en células de tumores sólidos y de mieloma múltiple. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2024.
33. Janevski A, He L, Aittokallio T, Tang J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics*. 2017 Aug 1;33(15):2413–5.
34. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 1;12(1):31–46.

35. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy ☆. *Semin Cancer Biol.* 2009;19(1):17–24.
36. Blau O, Nogai A, Blau IW, Kühnel A, Nogai KA. The Warburg effect in Multiple Myeloma and its microenvironment. *Med Res Arch.* 2017;5(9).
37. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. Hif-1-independent mechanisms regulating metabolic adaptation in hypoxic cancer cells. Vol. 10, *Cells.* 2021.
38. Molina JR, Sun Y, Jones P, Emilia Di Francesco M, Marszalek JR, Protopopova M, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability.;
39. Dong Y, Tu R, Liu H, Qing G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Dec 1;5(1).
40. Bajpai R, Sharma A, Achreja A, Edgar CL, Wei C, Siddiq AA, et al. Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma.;
41. Catalano G, Zaza A, Banella C, Pelosi E, Castelli G, de Marinis E, et al. MCL1 regulates AML cells metabolism via direct interaction with HK2. Metabolic signature at onset predicts overall survival in AMLs' patients. *Leukemia* 2023 37:8. 2023 Jun 22;37(8):1600–10.
42. Nakano A, Miki H, Nakamura S, Harada T, Oda A, Amou H, et al. Up-regulation of hexokinase II in myeloma cells: Targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate. *J Bioenerg Biomembr.* 2012 Feb 2;44(1):31–8.
43. Davis G. Phenol Red - pH Indicator. 2024.

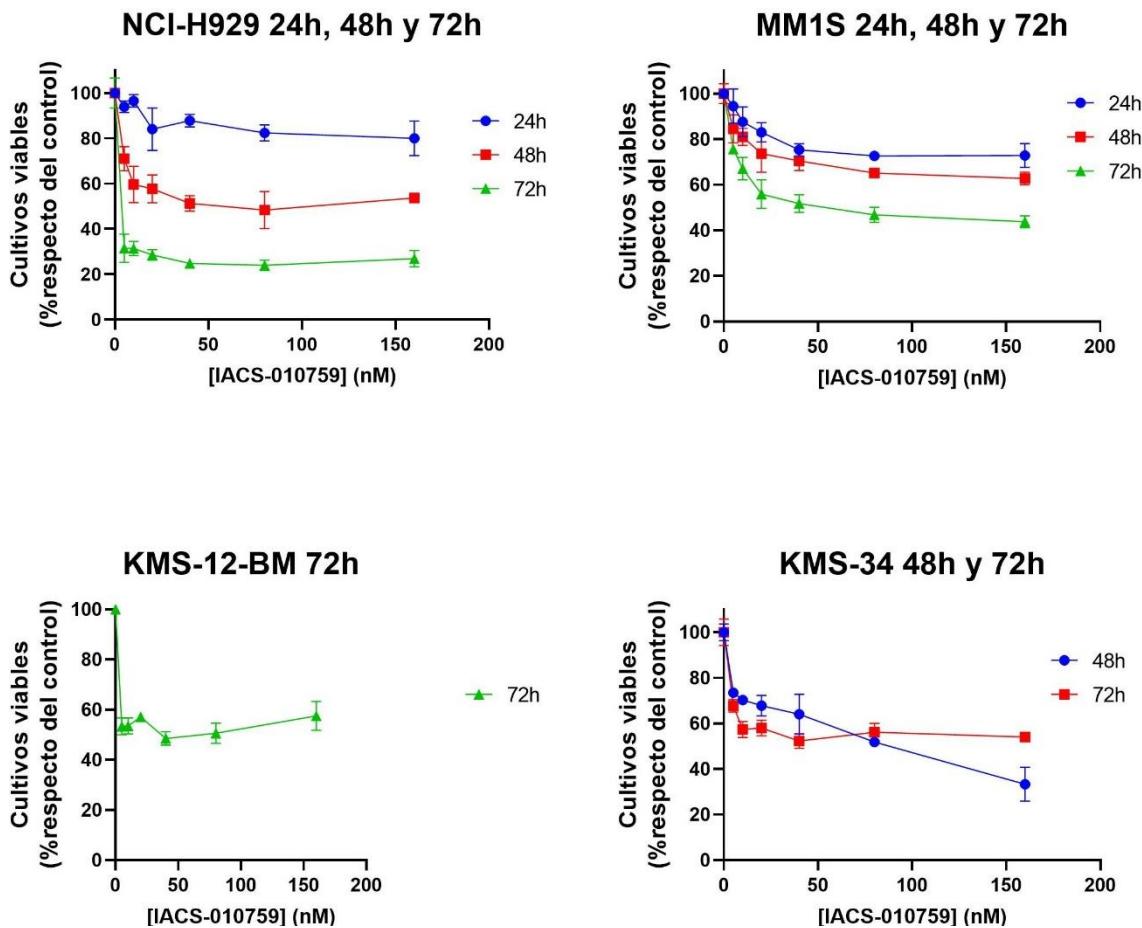
ANEXOS

| | | | | | |
|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 10 nM | S63845 25 nM | S63845 50 nM | S63845 10 nM+IACS-10759 40nM |
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 10 nM | S63845 25 nM | S63845 50 nM | S63845 10 nM+IACS-10759 40nM |
| S63845 25nM+IACS-10759 40nM | S63845 50 nM+IACS-10759 40nM | | | | |
| S63845 25 nM+IACS-10759 40nM | S63845 50 nM+IACS-10759 40nM | | | | |

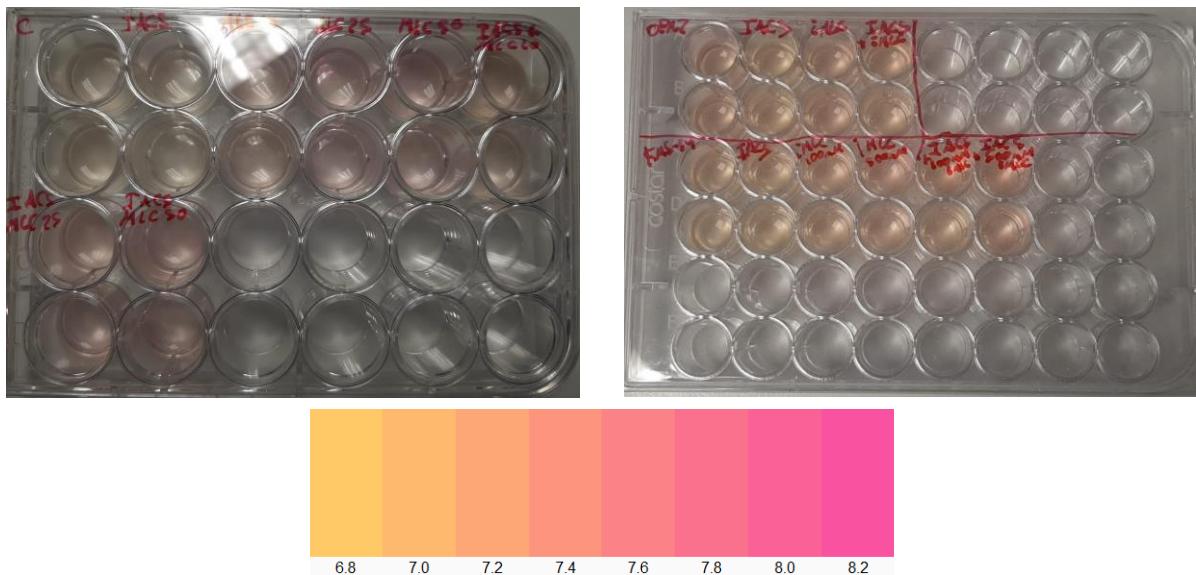
| | | | | | | |
|---------|------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 2,5 nM | S63845 2,5 nM+IACS-10759 40nM | | | |
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 2,5 nM | S63845 2,5 nM+IACS-10759 40nM | | | |
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 100 nM | S63845 500 nM | S63845 100 nM+IACS-10759 40nM | S63845 500 nM+IACS-10759 40nM | |
| Control | IACS-010759 40nM | S63845 100 nM | S63845 500 nM | S63845 100 nM+IACS-10759 40nM | S63845 500 nM+IACS-10759 40nM | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

ANEXO I. Distribución de las concentraciones de IACS-010759 y S63845 en las placas.

(Arriba) Distribución de las concentraciones utilizadas en el experimento de sinergia de RPMI 8226. (Abajo) Distribución de las concentraciones utilizadas en el experimento de sinergia de OPM-2, las dos primeras filas, y de KMS-34, las tercera y cuarta fila. Cada concentración se pone por duplicado. En rojo se marcan los pocillos que no se usan.

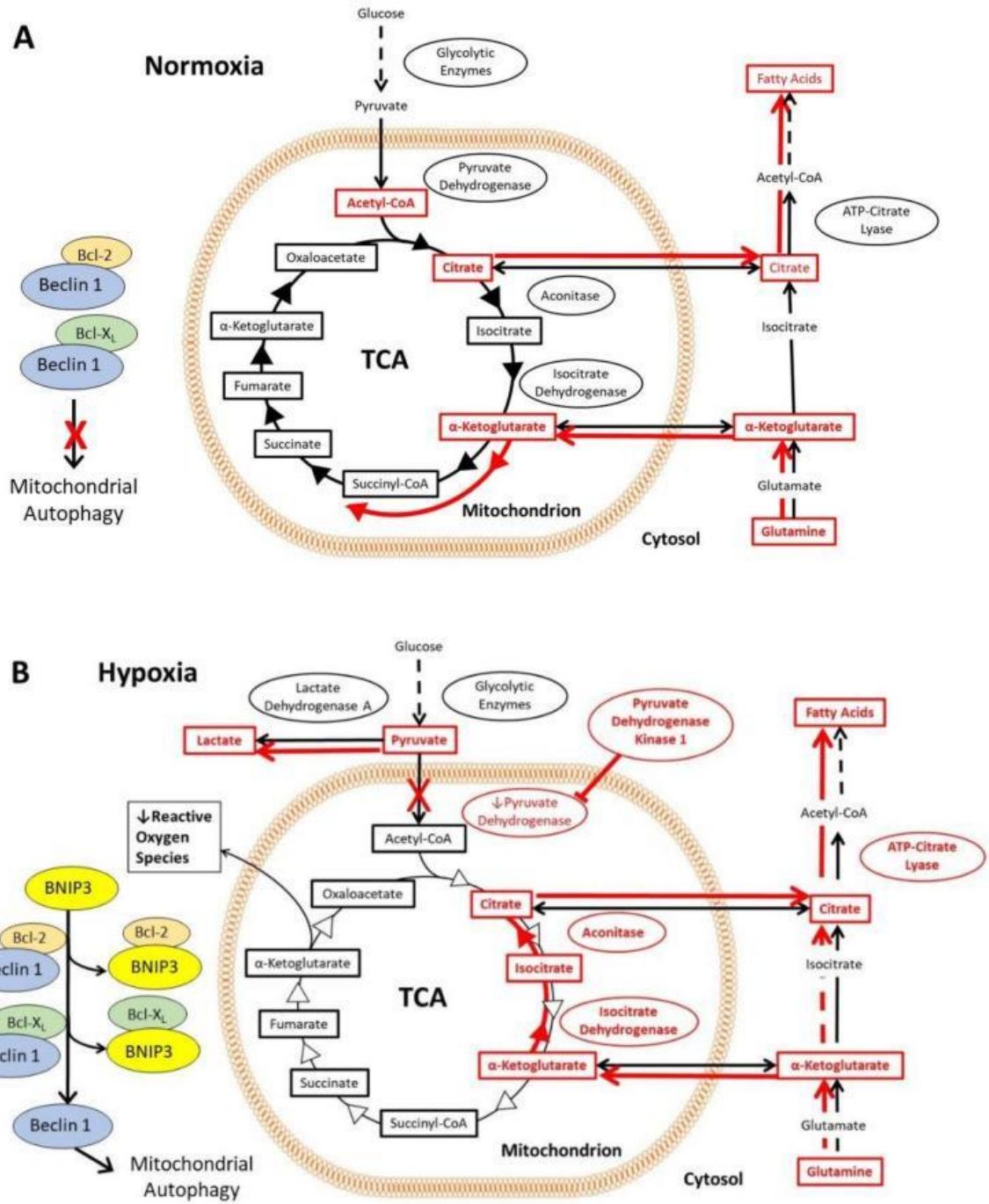


ANEXO II. Viabilidad celular de diferentes células a diferentes concentraciones de IACS-010759 a 24, 48 y 72 horas. Aparecen gráficas de las líneas NCI-H929, MM1S, KMS-12-BM y KMS-34. En esta se indica el porcentaje normalizado de células viables respecto al control a una concentración de IACS-010759 determinada y a un tiempo de incubación específico. Se realizó un solo experimento independiente por cada tiempo de incubación, incluyendo entre 4 y 8 réplicas de la misma concentración de IACS-010759 para así determinar la desviación estándar. Los valores extraños de KMS-34 a partir de 50 nM, pueden ser atribuidos a la poca diferencia de los resultados entre los dos tiempos o a que se puede haber producido algún error en la manipulación de las concentraciones.



ANEXO III. Variación del pH en las placas de cultivo donde se han realizado las combinaciones.

Imagen de placa de cultivo de RPMI 8226 (izquierda), de OMP2 y KMS-34 (derecha); tras 72h de incubación con las distintas concentraciones de los fármacos. Se indica también un patrón de coloración del rojo fenol dependiendo del pH (43). La distribución de las concentraciones está explicada en el **ANEXO I**.



ANEXO IV. Representación de los cambios producidos en el metabolismo por acción de HIF-1 en estado fisiológico (A) y en estado de hipoxia (B). Se observa que enzimas se sobreexpresan (en rojo) y en rojo se señalan las vías preferenciales de metabolización de los distintos compuestos. También, se indica el proceso de autofagia de la mitocondria dependiente de BNIP3 (37).