



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

2013-2014

**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

Directores:

Dr. Javier Naval

Dra. Isabel Marzo

Autora:

Beatriz Aragón Aranda

ÍNDICE

1.1	Muerte celular	4
1.1.1	Apoptosis o muerte celular programada.....	6
1.1.1.1	Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis: efectores intracelulares.....	7
1.1.1.2	Vía extrínseca	11
1.1.1.3	Vía intrínseca o mitocondrial.....	13
1.1.2	Necrosis programada	14
1.2	Mieloma múltiple	16
1.2.1	Definición, incidencia y epidemiología.....	16
1.2.2	Biología del mieloma múltiple	17
1.2.2.1	Estadios del mieloma múltiple.....	17
1.2.2.2	Inmunofenotipo.....	17
1.2.2.3	Alteraciones genéticas en el mieloma.....	18
1.2.2.4	Microambiente medular en el mieloma	18
1.2.3	Fisiopatología del mieloma múltiple	19
1.2.4	Farmacoterapia del mieloma múltiple humano	19
1.2.5	CX-4945 (Silmitasertib)	20
1.2.6	Inhibidores de mTOR	22
2.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Cultivos celulares	24
3.1.1	Materiales y medios de cultivo celulares.....	24
3.1.2	Líneas celulares utilizadas	24
3.1.3	Mantenimiento de cultivos celulares	24
3.1.4	Congelación y descongelación de líneas celulares	25
3.1.5	Aislamiento de células vivas mediante centrifugación en gradiente de densidad	26
3.2	Estudios de proliferación, citotoxicidad, apoptosis y necrosis celular	26
3.2.1	Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad.....	26
3.2.2	Fármacos citotóxicos y citostáticos	27
3.2.3	Contaje y determinación de la viabilidad celular	27

3.2.4	Determinación de la proliferación celular	28
3.2.5	Citómetro de flujo.....	28
3.2.5.1	Análisis de la expresión de proteínas de membrana	29
3.2.5.2	Determinación simultánea del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la translocación de fosfatidilserina.	30
3.3	Análisis de la expresión de la fragmentación del ADN mediante tinción nuclear con Hoechst 33342	31
3.4	Análisis de la expresión de proteínas	32
3.4.1	Materiales y reactivos	32
3.4.1.1	Reactivos para la extracción e inmunoprecipitación de proteínas	32
3.4.1.2	Materiales y reactivos para la electroforesis de proteínas y transferencia a membranas.	32
3.4.1.3	Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos utilizados en Western-blot .	33
3.4.2	Métodos de análisis de proteínas por Western-Blot	34
3.4.2.1	Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes	34
3.4.2.2	Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	34
3.4.2.3	Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF	35
3.4.2.4	Análisis de proteínas por inmunotransferencia.....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1	Estudio del mecanismo de apoptosis inducido por CX-4945.	37
4.1.1	Determinación de la IC50 del CX-4945 en líneas de mieloma múltiple..	37
4.1.2	Efecto de CX-4945 en la apoptosis en las diferentes líneas celulares.....	38
4.1.3	Efecto de los inhibidores de los diferentes tipos de muerte.	40
4.2	Estudio del efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 y Bcl-xL en mieloma en la sensibilidad de apoptosis	43
4.3	Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por CX-4945	45
4.3.1	Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la apoptosis inducida por CX-4945.....	45
4.3.2	Análisis de la activación de caspasas inducida por CX-4945	48
4.3.3	Análisis de la secuencia de activación de las caspasas inducidas por CX-4945.....	50
4.4	Implicación de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por CX-4945	51

4.4.1	Análisis de la expresión de Apo2L/TRAIL y FasL inducida por CX-4945.	51
4.4.2	Expresión de DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en la membrana plasmática de las células de mieloma.....	52
4.4.3	Contribución de DR4 y DR5 a la señal apoptótica por Cx-4945.	53
4.5	Análisis del uso potencial del CX-4945 en terapia combinada	54
5.	CONCLUSIONES.....	56
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Las células de un organismo no viven indefinidamente y la duración de su vida depende del tipo celular. Hay células cuyo periodo de vida es largo, como las musculares y las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales. El número de células en un organismo adulto permanece constante gracias a la existencia de un balance entre la pérdida, la renovación y la diferenciación. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre la proliferación y la muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento (Xiao-Fang Tian 2013).

1.1 Muerte celular

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado no solo con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos, sino también, con mecanismos de defensa de varios tipos de enfermedades. Según el comité de nomenclatura de muerte celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*) se habla de muerte celular cuando una célula ha perdido la integridad de membrana plasmática, cuando el núcleo se ha fragmentado o cuando los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados (Kroemer G 2009).

La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a sus características morfológicas (apoptosis, necrosis, muerte celular autofágica o muerte celular asociada con mitosis), de acuerdo a criterios enzimáticos (con o sin participación de nucleasas o de diferentes tipos de proteasas como caspasas, calpainas o catepsinas), de acuerdo a aspectos funcionales (muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica) o de acuerdo a características inmunológicas (inmunogénicas o no inmunogénicas). Es por ello, que el NCCD ha propuesto una clasificación y definición actualizada de las diferentes modalidades de muerte celular que se han descrito hasta el momento y que, brevemente, se describen a continuación (L Galluzzi 2012).

- Apoptosis: muerte celular programada caracterizada por el redondeamiento de las células, la retracción de pseudópodos, la reducción del volumen celular y nuclear (pínosis), fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, sin la pérdida de la integridad de la membrana plasmática.
- Necrosis: muerte celular caracterizada por un aumento del volumen de los orgánulos y del citoplasma, moderada condensación de la cromatina y rotura de la membrana plasmática, con la consecuencia pérdida del contenido intracelular.

- Autofagia: es un tipo celular que ocurre en ausencia de condensación de la cromatina, pero que va acompañada de una vacuolización masiva autofágica del citoplasma.

Otras modalidades de muerte-:

- Catástrofe mitótica: muerte celular que ocurre durante o justamente después de una mitosis fallada. Se acompaña de alteraciones morfológicas como micronúcleo (cromosomas o fragmentos de cromosomas que no han sido bien repartidos entre las células hijas) o multinucleación (presencia de dos o más núcleos con tamaños heterogéneos, debido a una deficiente separación durante la citocinesis).
- Cornificación: es una muerte celular programada, específica de la epidermis, morfológica y bioquímicamente diferente a la apoptosis. Este proceso permite la formación de corneocitos, que son queranocitos muertos con una mezcla de proteínas y lípidos necesarios para la resistencia mecánica, elasticidad y estabilidad estructural de la epidermis.
- Anoikis: apoptosis inducida por la pérdida de adhesión al sustrato o a otras células.
- Entosis: define una modalidad de muerte celular en la que una célula es internalizada por otra célula vecina, y posteriormente, desaparece mediante degradación lisosomal.
- Partanatos: muerte celular particular con la participación de las enzimas poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), responsables del daño en DNA.
- Piroptosis: esta forma de muerte ha sido descrita principalmente en macrófagos, los cuales presentan características morfológicas tanto de la apoptosis como de la necrosis.
- Netosis: tipo de muerte celular llevada a cabo por neutrófilos y eosinófilos, los cuales en respuesta a varios estímulos, pueden ejercer funciones antiinfecciosas, a través de la generación de trampas extracelulares (NETs, *neutrophil extracellular traps*) que están compuestos por cromatina nuclear y proteínas, tanto nucleares como citoplasmáticas.

Como se aprecia, existen muchos tipos de muerte celular, pero solo algunos de ellos tienen importancia desde el punto de vista farmacológico, a la hora de inducir muerte celular en células tumorales. Por lo que este proyecto, se centra fundamentalmente en los mecanismos de muerte celular por apoptosis y necrosis, específicamente necroptosis.

1.1.1 Apoptosis o muerte celular programada

La muerte celular programada es el principal mecanismo de supresión tumoral, es un proceso de protección para eliminar células dañadas que pueden ser perjudiciales para el organismo. El término apoptosis proviene del griego antiguo *apo-TOE-sis*, que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. Kerr y Wyllie, en 1972, (Kerr J. F. R. 1972), retomaron el término y lo aplicaron a la pérdida de las células por los tejidos para la supervivencia del huésped. Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular (Mueller 2003) porque cuando se altera, se produce enfermedades degenerativas como la enfermedad del Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer.

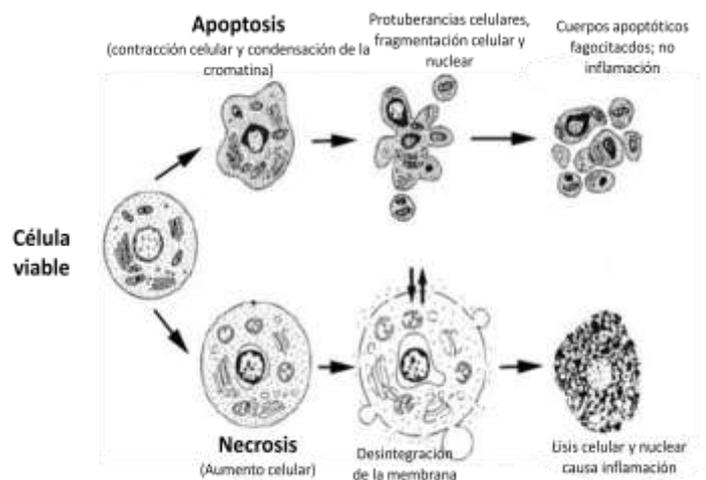


Figura 1.1. Esquema representativo de dos vías de muerte, la necrosis y la apoptosis.

La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que definen el proceso (Figura 1.1). La adhesión celular y los contactos intercelulares disminuyen y se producen una pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular. En la membrana plasmática, que inicialmente se mantiene íntegra, se producen cambios en la distribución de los fosfolípidos (externalización de la fosfatidilserina) y se forman protrusiones, proceso conocido como burbujeo. El volumen celular disminuye y el citoplasma se condensa. El núcleo se reduce y la cromatina se compacta, adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, con agregación de poros nucleares y disolución focal de la lámina nuclear. Las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente, la célula colapsa, produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior ya que, a diferencia de la muerte celular

por necrosis, no se produce rotura de la membrana plasmática. En el ámbito fisiológico, los cuerpos apoptóticos son retirados del espacio extracelular por células fagocitarias, y por tanto, no cursa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación (Savill J 2000).

La apoptosis puede activarse a través de dos vías de señalización:

- La vía intrínseca o mitocondrial, se desencadena en respuesta a una amplia variedad de estímulos de muerte que son generados dentro de la célula, como activación de oncogenes, daño del DNA, niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS) o infecciones virales (Conradt B 2005). La mitocondria es el principal orgánulo implicado en esta vía apoptótica.
- La vía extrínseca es mediada por la unión ligandos mortales, como FasL, Apo2L/TRAIL, TNF- α , a sus receptores específicos en la membrana plasmática, como Fas, TRAILR o TNFR, respectivamente.

Ambas vías de activación de la apoptosis eventualmente convergen en la activación de enzimas proteolíticas llamadas caspasas que median rápidamente el desmantelamiento de las proteínas celulares y la estructura de la célula.

1.1.1.1 Moléculas implicadas en el proceso de apoptosis: efectores intracelulares.

La apoptosis es un proceso controlado estrictamente y regulado por la interacción de un gran número de proteínas, entre las que se distinguen dos grupos o familias ampliamente estudiadas: las proteínas de la familia Bcl-2 (anti-apoptóticas, pro-apoptóticas y “solo BH-3”) y las caspasas.

Familia de proteínas Bcl-2

Los miembros de esta familia tienen actividades opuestas que median la muerte celular y también están implicados en otros procesos como tumorigénesis y respuesta celular a la terapia antitumoral. En dependencia de cómo afecta al proceso de muerte celular, se describen dos tipos de proteínas: anti-apoptóticas, si lo bloquean (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-B), y pro-apoptóticas, entre las que se incluyen Bax, Bak y también aquellas que contienen solo el dominio BH3 (Figura 1.2).

Una característica estructural común a los miembros de esta familia es la presencia de regiones homólogas a la proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) denominadas BH (*Bcl-2 Homology*;

BH1-BH4). Los dominios BH carecen de actividad enzimática y están implicadas en los procesos de asociación de cadenas polipeptídicas.

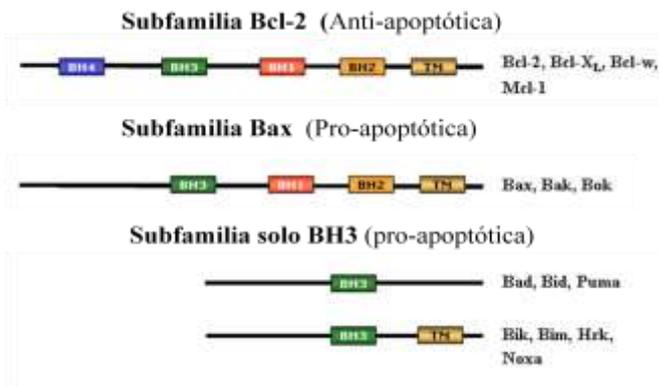


Figura 1.2. Familia de las proteínas Bcl-2. Se subdividen en tres grupos: antia-poptóticas, pro-apoptóticas y “sólo BH3”. Modificación de (Roset Ramon 2007).

Las proteínas anti-apoptóticas contienen los cuatro dominios BH, excepto Mcl-1, que carece del dominio BH4. Los dominios BH1, BH2, y BH3 forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con las proteínas solo-BH3. Además, poseen un dominio hidrofóbico C-terminal que facilita su inserción en la membrana externa mitocondrial, donde se encuentran generalmente, aunque también se pueden encontrar en el citosol o unidas a la membrana del retículo endoplasmático. Cuando se sobreexpresan, cada una de estas proteínas protegen a las células contra una variedad de estímulos apoptóticos.

Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas se dividen en dos subtipos: las multidominio o efectoras y las “solo BH3”. Las proteínas multidominio (Bax, Bak), poseen los dominios BH1, BH2 y BH3, y están presentes en la mayoría de los tejidos. En las células normales, estas proteínas existen como monómeros inactivos, Bax en el citosol y Bak asociado en la membrana externa mitocondrial. Durante la apoptosis, Bax es translocada a la membrana, y ambas sufren cambios conformacionales que les permiten oligomerizar y formar el poro mitocondrial, lo cual desencadena diferentes acontecimientos a nivel mitocondrial y celular.

Las proteínas “solo BH3”, como su nombre indica, se caracterizan por poseer solo el dominio BH3, el cual es necesario y suficiente para inducir apoptosis (Shibue T 2006). Las proteínas BH3 juegan un papel crucial como sensores del estrés celular y su activación constituye la primera diana del daño mitocondrial. Dependiendo de las características moleculares peculiares de sus respectivos dominios BH3, estas proteínas podrían interactuar tanto como Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-x_L (Bim y Puma), inactivando su acción protectora, como con Bax y Bak (todas ellas), induciendo su oligomerización.

La familia de las caspasas

Las caspasas son una familia de proteínas que contienen un residuo nucleofílico de cisteína en el centro activo que participa en la ruptura proteolítica de motivos que contienen residuos de ácido aspártico (Boatright KM 2004), de ahí proceden el nombre que reciben (*Cystein-dependent aspartate-directed proteases*). El término caspasa fue adoptado por convenio en 1996 (Alnemri ES 1996). La familia de caspasas está compuesta por 15 miembros los cuales se pueden dividir en dos subfamilias de caspasas: caspasas del grupo I (caspasas-1, -4,- 5 y -11-15), que están involucradas en la inflamación y el procesamiento de citoquinas, y las caspasas involucradas en desencadenar y ejecutar la muerte por apoptosis. Estas se pueden dividir a su vez en caspasas iniciadoras o del grupo II (caspasa- 8, -9, -10) y en caspasas ejecutoras o del grupo III (caspasa-3, -6,-7). La caspasa-2 es estructuralmente similar a las caspasas del grupo I, pero su función se ubica en el grupo III (Figura 1.3).

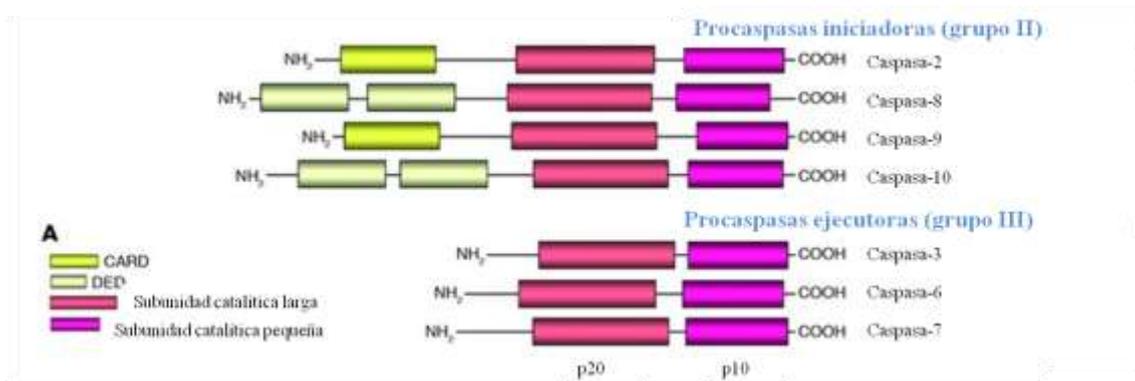


Figura 1.3. Procaspasas involucradas en la apoptosis. Procaspasas iniciadoras (-2,-8, -9, -10) y procaspasas ejecutoras (-3, -6, -7). Modificación de (Lavrik Inna N 2005).

Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (proenzimas inactivas o pro-caspasas). Se activan por proteólisis limitada y asociación de subunidades, adquiriendo su capacidad catalítica para degradar a su vez a sus sustratos diana. En las estructuras de las pro-caspasas se pueden distinguir tres dominios: el prodominio amino terminal, la subunidad grande (aproximadamente de 20 kDa) y la subunidad pequeña (10 kDa). La longitud del prodominio es muy variable y está implicado en la regulación de la activación. Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio largo con diferentes motivos reguladores como el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD: *Caspase – Recruitment Domain*), presente en las procaspasas -2 y -9 o el dominio efector de muerte (DED: *Death – Effector Domain*), presente en las procaspasas -8 y -10. Estos dominios son muy importantes para la activación de estas caspasas, ya que median las interacciones homo- y

heterofílicas entre las caspasas y con sus adaptadores. Las caspasas ejecutoras poseen un prodominio corto y se activan por las caspasas iniciadoras para ejecutar el programa de apoptosis.

Una vez las caspasas se activan, se asocian en forma de tetrámeros de dos subunidades p10 en el interior y dos subunidades p20 en el exterior formando dos centros activos por cada tetrámero. La activación de las caspasas iniciadoras puede ser tanto por oligomerización (autoactivación) como por acción proteolítica, y puede ser desencadenada tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca de la apoptosis. Sin embargo, la activación de las caspasas ejecutoras solo puede ser por acción de las enzimas proteolíticas, ya sean caspasas iniciadoras u otras enzimas como las caspasas ejecutoras, la granzima B, catepsina y calpains. Una vez activadas las caspasas se inicia una muerte programada por destrucción de componentes claves de la estructura celular (Boatright KM 2004).

Inhibidores de la activación de las caspasas

Los inhibidores de la apoptosis (IAP: *inhibitor of apoptosis*) son una familia de proteínas implicadas en la regulación de la muerte celular, inmunidad, inflamación, ciclo celular y migración (Almagro M.C 2012). Los miembros de esta familia de proteínas están caracterizados por la presencia de uno o tres dominios de repetición IAP de baculovirus (BIR: *baculoviral IAP repeat*). Esta familia fue originalmente identificada en células de insecto infectadas con Baculovirus (Crook NE 1993).

La familia de IAP humano está compuesta por 8 proteínas: NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*), survivina, Bruce, MI-IAP y ILP-2. Estas IAPs se unen a las caspasas inhibiendo su acción, en particular se unen a las caspasas -9, -3 y -7, pero son incapaces de unirse, y por tanto, de inhibir a la caspasa-8 (Mace PD 2010).

Las IAPs no son las únicas proteínas capaces de inhibir a las caspasas. Existen otras proteínas como c-FLIP [*celular FLICE (FADD-like-IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*], la cual actúa como un inhibidor competitivo de la procaspasa-8 al competir por FADD. La interacción previene la formación de DISC (*death-inducing signaling complex*) y la consecuente activación de la cascada de caspasas. Existen 3 isoformas de c-FLIP: la forma larga (c-FLIP_L), la forma corta (c-FLIP_S) y otras variantes (c-FLIP_R) (Safa 2012).

1.1.1.2 Vía extrínseca

La primera ruta de señalización del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana plasmática, a través de lo que se conoce como vía extrínseca o de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor TNF (TNFR), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio mortal (DD: *death domain*) en sus regiones citoplasmáticas, para acoplar el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica (Ashkenazi A. 1998).

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia por la unión de un ligando de muerte, como Fas/CD95 ligando (FasL/CD95L), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y Apo2L/TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) a sus respectivos receptores de muerte (Danial Nika N 2004). Entre los receptores de muerte más conocidos se encuentran:

- Receptor del TNF (TNFR1): se expresa principalmente en células hematopoyéticas, como macrófagos, monocitos, células dendríticas o linfocitos. Es el receptor del ligando de TNF α , una citoquina mediadora de respuestas inflamatorias e inmunorreguladoras, con actividad anti-viral y citotóxica, pero también pueden estimular el crecimiento y diferenciación celular al actuar sobre otros receptores (Vasalli 1992). La unión del TNF α a su receptor desencadena varios tipos de señales, como la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que conduce a la expresión de multitud de genes implicados en respuestas proinflamatorias. Sin embargo, la unión de TNF α a su receptor puede inducir apoptosis si la activación de NF- κ B está bloqueada (S.Nagata 1997).
- Fas/CD95: es el receptor del ligando Fas (FasL/CD95L). En la superficie celular, el receptor, se encuentra en forma de trímeros pre-formados que se entrecruzan tras la unión de su ligando natural o de anticuerpos agonistas, induciendo muerte por apoptosis. El ligando mortal FasL, es una glicoproteína de membrana que se expresa principalmente en linfocitos B, NK y células dendríticas, y tienen la capacidad de inducir apoptosis tanto en la inmunidad antitumoral como en el mantenimiento de la homeostasis celular (Martinez-Lorenzo MJ 1999).
- Receptores de Apo2L/TRAIL: es el receptor del ligando mortal Apo2L/TRAIL. Este ligando mortal, es una proteína que se expresa en todos los tejidos humanos. La rotura de

su extremo C terminal da lugar a la forma soluble de TRAIL, el cual se une a sus receptores en membrana en forma de homotrimeros, potenciándose así la transmisión de la señal (Kimberley FC 2004).

Se han identificado cinco receptores de Apo2L/TRAIL (Figura 1.4), los cuales son: TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) y OPG. De ellos, sólo los dos primeros inducen apoptosis. DcR1 y DcR2 se conocen como “receptores señuelo”, poseen una estructura similar a los receptores mortales, pero en su parte citoplasmática carecen del dominio mortal (DcR1) o lo tienen mutado (DcR2), por lo que no pueden enviar señales de muerte al interior (Ashkenazi A. 1998). El tercer “señuelo” es la osteoprotegerina (OPG), un receptor soluble que actúa como antagonista de TRAIL.

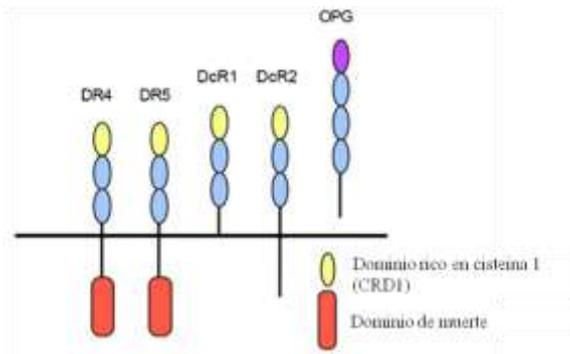


Figura 1.4. Esquema de los cinco tipos de receptores de TRAIL.
Modificación de (Kimberley FC 2004).

La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte (DD: *death domain*) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasas) como la proteína FADD (*Fas associated death domain*) o TRADD (*TNF receptor associated death domain*). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DEDs capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte (DISC: *death-inducing signaling complex*) que contiene a la proteína FADD y las caspasas -8 o -10. La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte. La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (Figura 1.5, A).

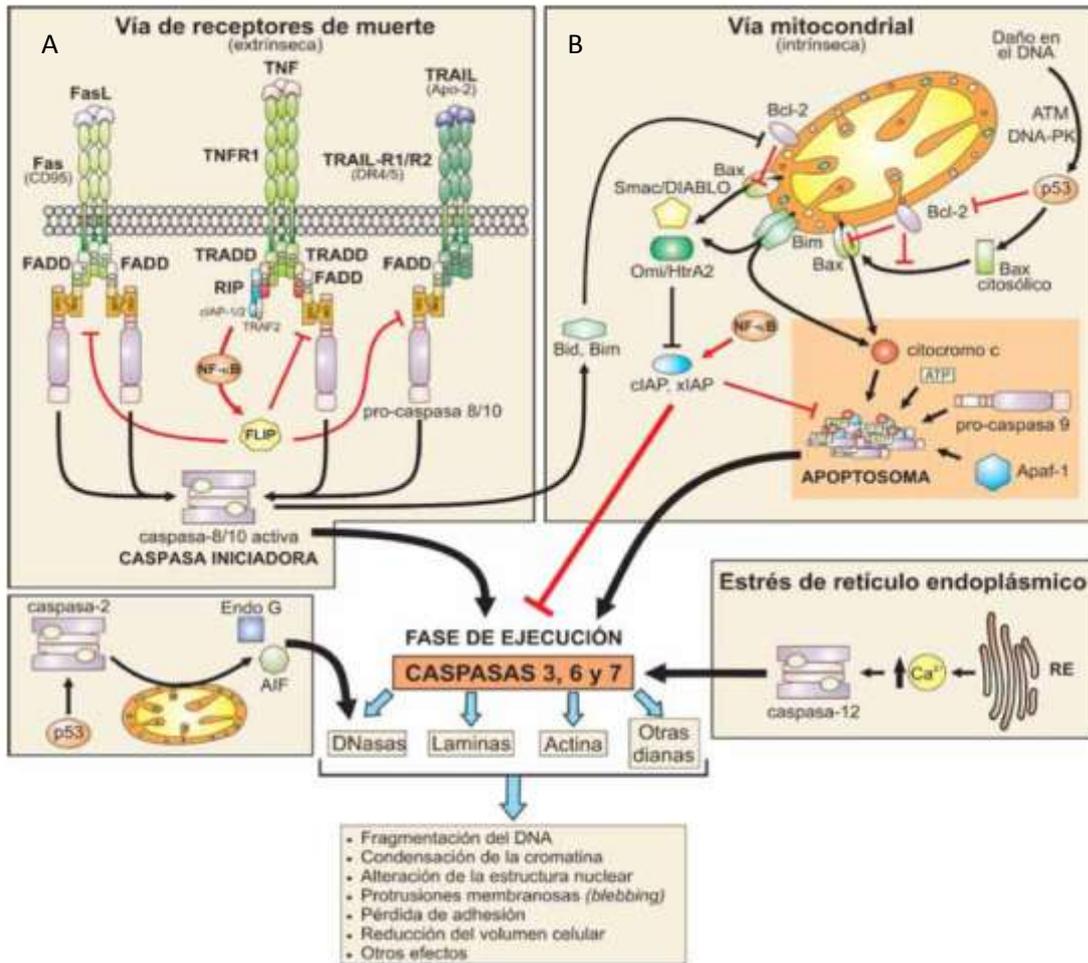


Figura 1.5. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

1.1.1.3 Vía intrínseca o mitocondrial

El orgánulo mediador central de esta segunda vía es la mitocondria. Una gran variedad de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones UV, daños DNA, agentes oxidantes, etc) utilizan esta ruta de señalización, la cual está regulada por proteínas de la familia Bcl-2.

Las mitocondrias están formadas por una matriz rodeada por una membrana interna, el espacio intermembrana y la membrana exterior. La membrana interna contiene algunas proteínas como la ATP sintasa y los componentes de la cadena transportadora de electrones. En condiciones fisiológicas, estas moléculas permiten a la cadena transportadora de electrones generar un gradiente electroquímico o potencial de membrana. Los defectos en la cadena de transporte electrónico pueden inducir la formación de ROS causando peroxidación lipídica y daños en la membrana. En el espacio intermembrana se encuentran moléculas como citocromo c, Endo G, Diablo/Smac y AIF

(*apoptosis inducing factor*), entre otras. Cuando por un estímulo apoptótico, se activan las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak, se forma un poro en la membrana externa de la mitocondria, favoreciendo la liberación de proteínas apoptogénicas al citosol. Además, se genera un flujo de calcio y se produce ROS.

La liberación del citocromo c es un evento crítico, ya que este interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*). Esta proteína actúa como molécula adaptadora de esta vía, con dATP y, posteriormente con la procaspasa-9, formándose un megacomplejo heptamérico conocido como apoptosoma, el cual ejecuta el programa apoptótico. La formación de este complejo conduce a un cambio conformacional y activación de la procaspasa-9 que, a su vez, rompe el predominio de caspasas efectoras, como la caspasa- 3, -6 y -7, activándolas. El proceso global requiere energía y una maquinaria de la célula no muy dañada, porque si el daño alcanza ciertos niveles, la célula puede acabar muriendo por necrosis (Figura 1.5, B)

Otras de las proteínas que se liberan de la mitocondria son AIF y Endo G, las cuales se translocan al núcleo, donde median la fragmentación del DNA de forma independiente de las caspasas. Cuando la proteína pro-apoptótica Smac/DIABLO se libera al citoplasma, interacciona con inhibidores endógenos de las caspasa (IAP), neutralizándolos y, por tanto, previniendo el bloqueo de la apoptosis.

1.1.2 Necrosis programada

La necrosis ha sido considerada durante mucho tiempo un mecanismo de muerte celular accidental o totalmente fuera de control, sin embargo, existe una muerte celular por necrosis que ocurre bajo condiciones estrictamente reguladas y que desempeña un papel importante en muchas condiciones fisiológicas y patológicas, como es la necroptosis (Vandenabeele P 2010).

La necroptosis se desarrolla con las características morfológicas de la necrosis pero de una forma programada. Se ha descrito que se produce cuando las caspasas están bloqueadas por inhibidores, o en el caso en que se hayan producido mutaciones en los genes de las caspasas o en los de otras proteínas implicadas en la apoptosis (Figura 1.6). Se puede inducir específicamente a través de señales desde la membrana, por la unión de un ligando a los receptores de muerte TNFR, y está regulada por mecanismos de señalización intracelular a través de una cascada de quinasas. Entre otros procesos, se activa una proteína adaptadora, RIP-1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*),

que contiene dominios DD y tiene actividad de tirosina quinasa (Galluzzi Lorenzo 2009). Ésta se transloca a la mitocondria interfiriendo con ANT (*Adenine nucleotide translocase*), componente del megacanal mitocondrial, lo que conlleva una disfunción mitocondrial, un incremento en la producción de ROS (*reactive oxygen species*) y una activación de la quinasa JNK (*C-Jun N-terminal kinase*). Aunque el orden de las etapas posteriores a la activación de RIP-1 no se conoce bien, se han descrito varias alteraciones como una activación de la fosfolipasa A2, de lipooxigenasas y de la esfingomielasa ácida.

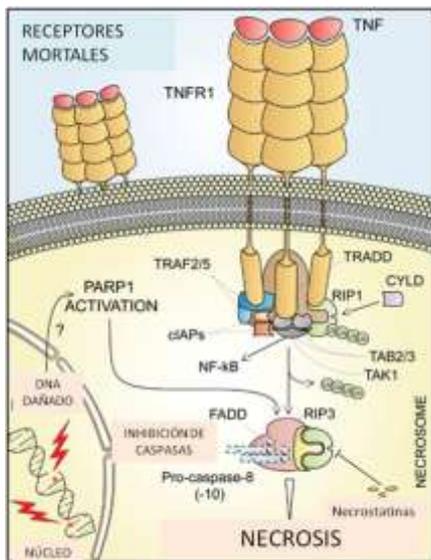


Figura 1.6. Representación de la muerte celular por necrosis.

Otro tipo de muerte programada es la mediada por PARP-1 como parte de la respuesta al daño producido en el DNA, por falta de nutrientes o energía, o en respuesta a una infección por patógenos. Esta vía puede desarrollar una función complementaria o reforzar a la apoptosis. La enzima PARP-1 participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica y se activa cuando se produce una rotura en una cadena de DNA. Para reparar dicha mella, esta enzima recluta a factores encargados de la reparación del DNA uniendo unidades de ADP-ribosa a proteínas asociadas a la cromatina. Aunque el mecanismo molecular no se conoce demasiado, si la reparación falla, los efectos finales que conducen a este tipo de muerte celular se pueden resumir en la activación de dos rutas: una produce un colapso energético y la otra, a través de RIP y JNK, a una disfunción mitocondrial y liberación del factor AIF.

1.2 Mieloma múltiple

1.2.1 Definición, incidencia y epidemiología

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

El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, después del linfoma no Hodgkin. Constituye, aproximadamente, el 10 % de todas las neoplasias hematológicas, y el 1 % de todos los cánceres y causa el 2 % de las muertes por cáncer. En Europa tiene una incidencia de 4,5-6,0/100000/año con una edad media de diagnóstico entre 63 y 70 años, y con una mortalidad de 4,1/100000/año (Rajkumar 2011).

Todavía no se conoce la etiología del MM, pero se cree que entre los factores de riesgo podrían ser: estimulación inmune crónica, desórdenes autoinmunes, exposiciones prolongadas a radiaciones ionizantes, pesticidas, herbicidas y dioxinas.

El mieloma múltiple se compone de células plasmáticas diferenciadas, con alteraciones génicas y generalmente derivadas de un solo clon inicial, las cuales comienzan a proliferar de modo descontrolado acumulándose en la médula ósea. Estas células malignas reciben el nombre de mielomas, cuya característica principal es la producción y secreción de una proteína monoclonal a la sangre denominada proteína M, para-proteína o proteína en pico. Se trata de un componente o fragmento Fab de una inmunoglobulina con una secuencia peptídica y estructura proteínica anormal. Las células mielomas constituyen tumores localizados en la médula ósea, los plasmocitomas, los cuales pueden ser únicos o más frecuentemente múltiples (de ahí el nombre de mieloma múltiple). Además de la médula ósea, también pueden afectar al hueso o incluso desarrollarse fuera de él, pasando a sangre y dando lugar a una leucemia de células plasmáticas.

1.2.2 Biología del mieloma múltiple

1.2.2.1 Estadios del mieloma múltiple

El mieloma múltiple surge a partir de una célula B normal de un centro germinal. Al menos, el 30-50% del mieloma múltiple maligno parece surgir de la gammapatía monoclonal benigna de significado incierto (GMSI o MGUs) desde el cual evolucionan a mieloma medular, pudiendo pasar o no por un estadio de mieloma “latente” asintomático.

Inicialmente, el mieloma múltiple se limita a la médula ósea (intramedular), pero con el tiempo el tumor puede adquirir la capacidad de crecer en lugares extramedulares (tales como sangre, líquido pleural y la piel). Alguno de estos múltiples mielomas extramedulares puede establecer líneas celulares inmortalizadas in vitro (Figura 1.7).

La transición de GMSI a mieloma múltiple intramedular se manifiesta por un aumento del número de células de mieloma múltiple en múltiples focos, angiogénesis asociado y destrucción ósea osteolítica.

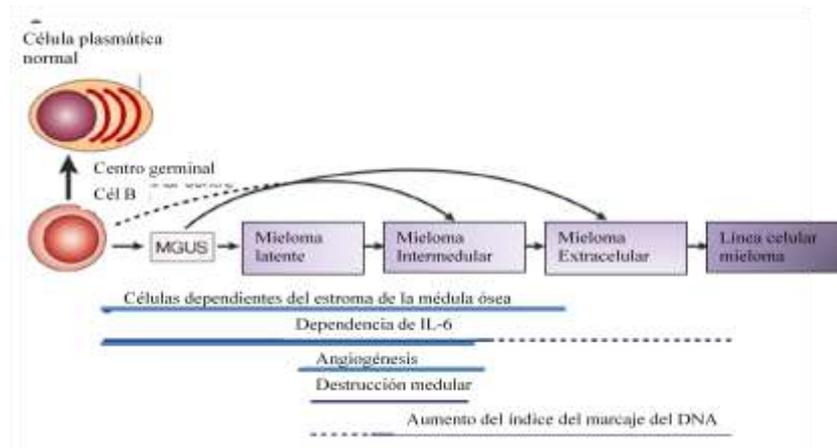


Figura 1.7. Estadios del mieloma múltiple. Modificación de (Leif 2002)

1.2.2.2 Inmunofenotipo

Las células mielomatosas presentan un inmunofenotipo variable de unos pacientes a otros, que generalmente difieren del de las células plasmáticas normales. Durante el proceso de diferenciación a células tumorales, las células plasmáticas pierden algunos antígenos y ganan otros.

Respecto a las células plasmáticas normales, las células tumorales ganan la expresión de CD138 y CD56, aunque se ha observado pérdida de CD56, asociada a un mal pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, las células del mieloma múltiple pierden la expresión de CD19 y

expresan menor proporción de CD38 que las células plasmáticas normales. La expresión de CD45, un marcador específico de linfocitos, es muy heterogéneo, porque aunque la mayoría de las células tumorales lo pierden, hay un porcentaje de pacientes que lo presentan.

Tras lo expuesto, podríamos definir un patrón CD138(-), CD38(++), CD56(-), CD19(+), CD45(-) para las células plasmáticas normales y un patrón de CD138(+), CD38(+), CD56(+), CD19(-), CD45(+/-) para las células mielomatosas.

Por lo tanto, la gran variabilidad en cuanto a la expresión de antígenos de superficie, supone una gran dificultad a la hora de caracterizar la enfermedad.

1.2.2.3 Alteraciones genéticas en el mieloma

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

Algunas de estas mutaciones son: mutaciones en Ras (proteínas G pequeñas asociadas a membrana que se unen a nucleótidos de guanina (GTP y GDP) y poseen actividad GTPasa), sobreexpresión de Bcl-2, mutaciones e la proteína del retinoblastoma (Rb) y mutación en un gen de resistencia a múltiples drogas (MDR).

1.2.2.4 Microambiente medular en el mieloma

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

Tras la adhesión de las células de mieloma al estroma de la médula ósea, se induce secreción de una serie de citoquinas por las células del estroma, que son las siguientes: interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral β (TNF- β). La más importante de todas

ellas es la IL-6, la cual regula la proliferación y la supervivencia de las células del MM e inhiben su apoptosis.

1.2.3 Fisiopatología del mieloma múltiple

El crecimiento descontrolado de células mielomatosas trae aparejado la siguiente fisiopatología: destrucción ósea (lesiones osteolíticas y osteoporosis), efectos asociados a esta destrucción (hipercalcemia, fracturas óseas), insuficiencia de la médula ósea (anemia, leucopenia, trombocitopenia, etc), hipervolemia e hiperviscosidad, supresión de la producción de inmunoglobulinas normales, insuficiencia renal y afectación secundarias a otros órganos como hígado, tejido nervioso (Brian 2006). A veces la enfermedad puede permanecer asintomática durante muchos años siendo el dolor óseo el cuadro de presentación más común.

1.2.4 Farmacoterapia del mieloma múltiple humano

Los objetivos fundamentales del tratamiento son mejorar la calidad de vida y aumentar la supervivencia. Por muchos años, el melfalán (introducido en 1962) y la prednisona han sido los principales quimioterapéuticos usados para combatir el mieloma múltiple, seguido del trasplante de células madre, el cual ha estado reservado para un número reducido de pacientes.

El tratamiento de la enfermedad ha evolucionado rápidamente en las últimas décadas con el desarrollo y utilización de nuevos fármacos, como la talidomida, lenalidomida y bortezomib (Laubach JP 2010).

La talidomida fue empleada en el tratamiento de las náuseas del embarazo durante los años 50, y fue posteriormente retirada del mercado en 1961 por sus efectos teratógenos. Posteriormente se estudió sus efectos anti-angiogénicos, confirmando efectos beneficiosos en pacientes con recaída y mieloma refractario, siendo actualmente como terapia estándar para estos casos (García-Sanz 2006). Se desconoce el mecanismo de acción exacto de la talidomida, pero se propone que inhibe la síntesis del TNF- α , previene los daños causados en el DNA por radicales libres, suprime la angiogénesis, estimula la inmunidad celular y altera la expresión de moléculas de adhesión.

El bortezomib fue el primer inhibidor del proteasoma evaluado en ensayos clínicos, siendo aprobado por la FDA, para el tratamiento de pacientes con mieloma, en 2003. El bortezomib es un

ácido dipeptidil borónico que inhibe la subunidad 26S del proteasoma de forma reversible y específica.

En la actualidad existen varios tratamientos alternativos para el MM. Se usan unos u otros en función del estadio del tumor en el momento del diagnóstico, además de otros factores como la edad, indicadores de pronóstico y patologías concomitantes..

1.2.5 CX-4945 (Silmitasertib)

CX-4945 es la primera molécula, disponible por vía oral, que inhibe a la proteína CK2 (casein kinase 2) en ensayos clínicos para el cáncer (Figura 1.8). CX-4945 fue optimizado como un inhibidor competitivo de la holoenzima CK2 ($K_i=0,38$ nM) (Pierre F 2011). Este potente inhibidor ha sido recientemente introducido en la fase I clínica en pacientes con cánceres sólidos avanzados y en pacientes con mieloma múltiple (Buontempo F 2013).

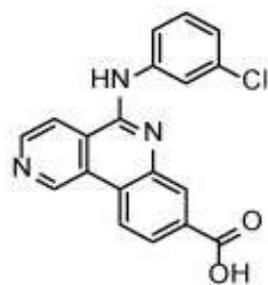


Figura 1.8. Estructura química del CX-4945: 5 - [(3-clorofenil) amino]-benzo [c] -2,6-naftiridina-8-carboxílico. Modificación de (Ku Jeong Min 2013)

La protein kinasa CK2, es una proteína Serin / Treonina quinasa generalmente presente en las células como una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades catalíticas (α y/o α') y dos (β) subunidades reguladoras (Son YH 2013) Es una proteína altamente conservada, constitutivamente activa, independiente de ningún segundo mensajero ni eventos de fosforilación (Borgo C 2013). Tiene la capacidad de fosforilar a un número notable de sustratos. Está implicada en varios procesos celulares, tales como ciclo celular, la expresión génica, la síntesis de proteínas, la transducción de señales y el metabolismo; sin embargo, su principal función se considera que es favorecer la supervivencia e inhibir la apoptosis. Esta hipótesis se basa en observación de que muchos sustratos de CK2 son proteínas implicadas en la muerte celular y en la supervivencia, y lo que es más importante, que la reducción de la actividad o expresión CK2 (inducida mediante tratamiento de células con inhibidores específicos o por la tecnología de interferencia de ARN, respectivamente) provoca la muerte celular, principalmente mediante la apoptosis (Zanin Sofia 2012).

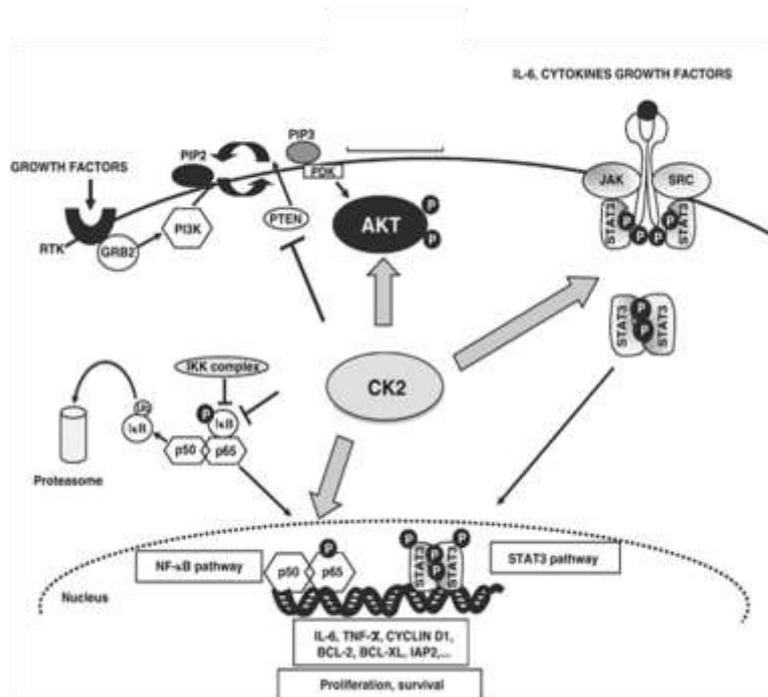


Figura 1.9. Implicación de la proteína quinasa CK2 en las vías de señalización asociadas a tumores.
Modificación de (Piazza F1 2012)

De acuerdo con la función anti-apoptótica de la CK2, las células tumorales, que se caracterizan por una rápida proliferación y una apoptosis defectuosa, expresan altos niveles de CK2 (Quotti Tubi Laura 2013). En este sentido, una propiedad peculiar de CK2 es la capacidad para proteger las células de la apoptosis. Se cree que esta acción depende de varios mecanismos (Figura 1.9)

- CK2 interfiere en la estabilidad y funcionalidad de las proteínas supresoras de tumores PML y PTEN mediante fosforilación de residuos de serina críticos sobre estas proteínas haciéndolas menos activas: en el caso de PML mediante el aumento de la degradación mediada por proteasoma y en el caso de PTEN a través de la estabilización de una forma menos activa de la molécula.
- CK2 fosforila a moléculas anti-apoptóticas contribuyendo a la protección de la apoptosis. La fosforilación de CK2 a BID inhibe su procesamiento por caspasa-8, y por lo tanto, de la muerte celular.
- CK2 regula positivamente cascadas promotoras del crecimiento, tales como la PI3K/AKT, el NF-kappa B, la vía JAK / STAT y las vías de señalización β-catenina/Wnt con el resultado de dirigir el destino de la célula hacia supervivencia y en contra la muerte celular programada.

CX-4945 tiene un efecto pro-apoptótico en las células cancerígenas humanas y el tratamiento con este inhibidor actúa de las siguientes formas:

- La actividad anti-proliferativa de CX-4945 se correlaciona con mRNA y los niveles de proteínas de CK2 α , pero no con la subunidad catalítica CK2 α' , ni con la subunidad reguladora CK2 β ni con el estado mutacional de PI3K/Akt o PTEN.
- CX-4945 inhibe la señal de PI3K/Akt directamente bloqueando la fosforilación de Akt en la Serina 129 por CK2 en lugar de a través de la activación de PTEN.
- El tratamiento con CX-4945 causa reducción de fosforilación de p21 (T145) aumentando los niveles totales de p21 y p27, e induciendo la actividad de la caspasas-3 y -7.
- EL tratamiento con CX-4945 induce arresto del ciclo celular.

1.2.6 Inhibidores de mTOR

La quinasa mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es clave en la regulación del crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia. Numerosos estudios han demostrado que el bloqueo de mTOR reduce el crecimiento tumoral.

La vía de señalización (PI3K)/AKT/mTOR está frecuentemente activada en cánceres humanos por lo que mTOR se ha validado como diana terapéutica. mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos multiméricos llamados mTORC1 y mTORC2, los cuales regulan el crecimiento celular, metabolismo, proliferación y supervivencia (de la Puente Pilar 2014).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El trabajo recogido en este Máster pretende contribuir a una mejor caracterización de los mecanismos mediante los cuales, nuevos fármacos (CX-4945), inducen apoptosis en líneas celulares del mieloma múltiple (MM), una neoplasia hematológica que afecta a las células B plasmáticas. Aunque en los últimos años se han introducido nuevos agentes quimioterapéuticos para tratar este tipo de cáncer, la esperanza de vida habitual se sitúa entre los 3 y 5 años, por lo que es urgente el identificar nuevos fármacos dirigidos a dianas moleculares definidas, que mejoren el tratamiento de esta enfermedad y mejore la esperanza de vida.

Nuestro grupo de investigación comenzó sus estudios en el campo de la apoptosis en 1994, y tiene una amplia experiencia en el estudio de este fenómeno celular. Se han estudiado diversos fármacos antitumorales capaces de inducir apoptosis en celulares tumorales, principalmente de células procedentes de neoplasias hematológicas como leucemias y mieloma múltiple, aunque también en células de tumores sólidos como colon, páncreas y mama.

Uno de estos fármacos podría ser el inhibidor de la serin/treonin quinasa CK2, CX-4945, que se encuentra en ensayos clínicos de fase I. La enzima CK2 es una quinasa constitutivamente activa en las células de mieloma múltiple, aunque también puede inducirse por señales de estrés. CK2 fosforila a varios factores de transcripción como NF- κ B, c-myc y STAT3 que están implicados en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis.

En el presente trabajo los objetivos que nos marcamos para este nuevo fármaco:

- Evaluar la capacidad de inducción de muerte celular tras el tratamiento con CX-4945 en células del mieloma múltiple (MM).
- Caracterizar el mecanismo de apoptosis inducido por el CX-4945 en células de MM.
- Estudiar el efecto que la sobre-expresión de Mcl-1 y Bcl-x_L tiene en la apoptosis inducida por el inhibidor de CK2 en células de mieloma múltiple
- Caracterizar la fase de ejecución del mecanismo de la apoptosis causado por CX-4945 y de dependencia de la acción de las caspasas.
- Evaluar la contribución de los receptores mortales a la apoptosis inducida por CX-4945 en mieloma múltiple
- Evaluar la combinación de CX-4945 con otros fármacos, como el inhibidor de mTOR, para mejorar la capacidad de inducción de apoptosis en células del mieloma múltiple.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Materiales y medios de cultivo celulares

Durante este proyecto de Máster se empleó para el mantenimiento de las células en suspensión el medio de cultivo RPMI 1640, de Gibco™, Invitrogen (Barcelona, España). Este medio se suplementó con 10 % de suero fetal bovino (SFB) de Sigma™ Aldrich (Madrid, España), además se le adicionó otros productos como L-glutamina 2 mM de Gibco y antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 µg/ml) de PAN™, Biotech.

Los frascos de cultivo empleados, así como el resto del material plástico estéril (placas de 6, 12, 24 o 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, etc) procedieron de TPP, Suiza. Los tubos criogénicos fueron de Nunc, Dinamarca. El dimetilsulfóxido (DMSO) procedió de Sigma. Para esterilizar el material se utilizó el autoclave de Autester, Mod 4376, Selecta (España). Las células fueron cultivadas en un incubador de CO₂ termostatzado de Heraeus Cell (Alemania).

3.1.2 Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido: RPMI 8226, U266 (clon B1), MM.1S, NCI-H929. La línea original RPMI 8226 fue amablemente proporcionada por la Dra. Martine Amiot (INSERM U463, Nantes, Francia), las células MM.1S por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España), las líneas U266 y NCI-H929 por el Dr. Antonio Campos Caro (Hospital Puerta del Mar, Cádiz, España). Se utilizaron también líneas celulares derivadas de la línea RPMI obtenidas en nuestro laboratorio, las cuales son RPMI/vector pLZR, RPMI/Mcl-1, RPMI/Bcl-x_L.

3.1.3 Mantenimiento de cultivos celulares

Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen máximo de células en suspensión 15 ml) ó 75 cm² (volumen máximo de células en suspensión 40 ml) con tapón de filtro. Estas células de mieloma se sembraron a una densidad de mínima de 3 x 10⁵ cél/ml y se cultivaron en medio completo con 10% SFB.

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado, a 37 °C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. A los 3 o 4 días de cultivo, alcanzadas densidades entre 8-12 x 10⁵

cél/ml, se realizó el pase de los cultivos, para diluir las células. Para ello, se determinó el número de células y su viabilidad, con azul Trypan, con la ayuda de una cámara de Neubauer al microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

Todas las manipulaciones con células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical, Telstar (España), en condiciones estériles. El material usado, de vidrio y plástico, se esterilizó previamente en un autoclave durante 20-30 minutos a 1.2 atm de presión y las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron usando filtros de 0.22 μm .

Mensualmente se llevaba a cabo un control exhaustivo de las posibles contaminaciones por micoplasmas que pueden sufrir las líneas celulares. Esta contaminación, junto con la de levaduras, constituyen los principales problemas cuando se trabaja con líneas y cultivos celulares. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido ampliamente utilizada para la detección de micoplasmas contaminantes, pero actualmente existen un servicio externo que analiza las muestras. En el caso de que una línea celular estuviera contaminada se puede someter a un tratamiento basado en ciclinas (4 $\mu\text{l/ml}$) durante 3 semanas.

3.1.4 Congelación y descongelación de líneas celulares

Para llevar a cabo la congelación de las líneas celulares, se necesitan aproximadamente una concentración de 5×10^6 células. Alcanzada esta cantidad se lleva a cabo una centrifugación a 1200 r.p.m (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. Pasado este tiempo se elimina el sobrenadante, y el precipitado obtenido se resuspende en 500 μl de medio completo conteniendo un 10% de DMSO. Posteriormente se trasvasa el contenido a un criotubo de congelación estéril. Los viales fueron introducidos rápidamente en un congelador a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, durante al menos 24 h. Pasado este tiempo, los viales se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) hasta su utilización.

Para descongelar células, a los criotubos seleccionados se les va añadiendo lentamente un pequeño volumen de medio completo hasta la descongelación total de las células. Esta suspensión celular se deposita en un tubo de fondo cónico con 8 ml de medio completo y se centrifuga a 1200 r.p.m durante 5 minutos. Tras la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, se resuspende el precipitado obtenido con 4 ml de medio completo al 15% SFB y se añade esta mezcla en una placa

de 6 pocillo para la incubación. Una vez que las células se recuperan de la descongelación, se sembraron a la densidad habitual.

3.1.5 Aislamiento de células vivas mediante centrifugación en gradiente de densidad

Al descongelar viales de líneas celulares e incubarlas durante unos días para que se recuperen, puede ocurrir a veces que exista una proporción mayor de células muertas con respecto al número de células viables. Para eliminar esas células muertas se puede centrifugar a bajas revoluciones (600 r.p.m) durante 5 minutos o bien realizar sobre Ficoll-Paque, una centrifugación en gradiente de densidad. Para llevar a cabo esta centrifugación, la muestra diluida en medio, previamente homogenizada, se añade sobre el mismo volumen de Ficoll-Paque presente en un tubo de fondo cónico. La adición se realiza de forma lenta, evitando la mezcla de las dos fases. Se centrifuga el tubo a 1400 r.p.m, sin freno durante 20 minutos y se aspira, con una pipeta Pasteur, el anillo de células vivas formado en la interfase, para posteriormente trasvasarlo a un tubo que contenía 3-5 ml de medio RPMI completo. Se centrifuga de nuevo a 1200 r.p.m durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado con 3-5 ml de medio RPMI completo, para colocarlo en una placa de 12 pocillos e incubarlo en la estufa. Se realizó en contaje de las células y se determinó la viabilidad y la densidad celular.

3.2 Estudios de proliferación, citotoxicidad, apoptosis y necrosis celular

3.2.1 Materiales y reactivos para estudios de proliferación y citotoxicidad.

El azul de Trypan, usado para el contaje celular, procedió de Sigma al igual que el bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT), el cual se utilizó como una solución estéril de 5 mg/ml preparada en suero fisiológico (PBS: NaCl 0.15 M, fosfato potásico 0.01 M, pH 7.4). Los péptidos inhibidores de proteasas benciloxycarbonil-Leu-Glu-His-Asp-fluorometilcetona 2 (Z-LEHD-fmk), benciloxycarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona (Z-DEVD-fmk), benciloxycarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-fluorometilcetona (Z-IETD-fmk) procedieron de BD Biosciences (Madrid, España), mientras que el benciloxycarbonil-Val-Ala-Dl-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk) fue de Bachem (Bubendorf, Suiza). Las quimeras DR4-Fc (bloquean TRAIL-R1) y DR5-Fc (bloquea TRAIL-R2) fueron de R&D Systems (Vitro, Madrid). El anticuerpo monoclonal bloqueante de Fas fue de Bender (Barcelona) y el anticuerpo citotóxico anti-Fas (CH 11) fue proporcionado por

Upstate Biotechnology (New York). Los inhibidores de necroptosis, necrostatina y necrosulfonamida procedieron de Sigma-Aldrich. La poli-L-lisina fue proporcionada por Sigma y el colorante Hoechst 33342 por Molecular Probes (Leydes, Holanda).

La Anexina V marcada con fluoresceína (Anexina-FITC) o con DY634 (Anexina –DY634) y el 7-AAD procedió de BD Biosciences (Madrid, España), mientras que el tetrametilrodamina metil éster (TMRE) procedió de Molecular Probes/Invitrogen.

3.2.2 Fármacos citotóxicos y citostáticos

El inhibidor de la CK2, CX-4945 (Silmitsertib) fue proporcionado por Selleckchen (Munich, Alemania) y se mantuvo en DMSO a -20 °C El inhibidor de mTOR, PP242 procedió de Selleckchem.

3.2.3 Contaje y determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad se realizó de forma rutinaria por contaje con azul de Trypan. Las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática, son permeables a este colorante y adquieren una coloración azulada, mientras que las células vivas o apoptóticas, que todavía mantienen su membrana plasmática íntegra, no adquieren esta coloración azulada.

Para el contaje se mezclaron 50 µl de suspensión celular, previamente homogeneizada, con 50 µl de una solución estéril de azul Trypan al 0.4% de NaCl 0.15 M. La mezcla se depositó sobre la cámara de Neubauer y se realizó el contaje en un microscopio óptico.

Cálculos para determinar la densidad celular:

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

Siendo 10^4 el factor de corrección del tamaño de la cámara.

Determinación de la viabilidad celular:

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

Siendo el número de células totales el sumatorio de las células vivas, células apoptóticas y células muertas. Todos los experimentos con células se realizaron con un porcentaje de muerte menor al 15%.

3.2.4 Determinación de la proliferación celular

Para determinar la proliferación y viabilidad celular tras el tratamiento con drogas citotóxicas se utilizó el método del MTT, un método colorimétrico. Este ensayo se basa en la reducción metabólica por parte de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), de color amarillo, a otro compuesto coloreado de color azul (formazán), el cual forma cristales. Esta transformación permite determinar la funcionalidad de las mitocondrias de las células tratadas. La cantidad de cristales insolubles de azul formazán producidos es proporcional a la cantidad de células vivas.

Las células se cultivaron a una densidad de 3×10^5 cél/ml en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen total por pocillo de 100 μ l en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de droga citotóxica. El cultivo se incubó en la estufa durante 24 horas. Transcurridos este tiempo, se añadió a cada pocillo 10 μ l de una disolución de MTT (5 mg/ml) en suero fisiológico con una pipeta de repetición. Las placas se incubaron durante 3 horas a 37°C. Trascurrido este tiempo, los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 μ l de Isopropanol 0,05 M HCl y con agitación en una placa vibradora (Bioblock, Francia). Se midió la absorbancia de los pocillos a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas ELISA, MR5000, Dynatech, USA, frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares). Los resultados se presentaron como porcentaje de crecimiento de las células expuestas a las distintas concentraciones de la droga citotóxica frente al control, constituido por los cultivos sin droga. Cada concentración se analizó por triplicados.

3.2.5 Citómetro de flujo

Durante este proyecto de Máster se ha utilizado la citometría de flujo para el estudio de distintos parámetros característicos del proceso apoptótico y para analizar los niveles de expresión de diferentes proteínas de membrana en las células.

El análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo analizador, el FACSCalibur™ de BDBiosciences, el cual posee dos láseres, un láser azul de 488 nm y un láser diodo rojo de 635 nm y por lo tanto cuenta con 4 canales de detección (fotodetectores, FL), además del FSC y SSC.

Excitación con el láser de 488 nm

FSC Forward Scatter: Tamaño de la célula

SSC Side Scatter: Granulosidad

FL1 Verde (530±15 nm): DiOC6, Anexina V-FITC, Alexa 488, Fluo-4, GFP

FL2 Amarillo (585±21 nm): **TMRE**, Cy3, PI, Alexa555

FL3 Naranja (670 nm): 7-AAD, PerCP-Cy5.5

Excitación con el láser de 633 nm

FL4 Rojo (661±8 nm): **Anexina V-DY634**, APC, Alexa663

Los fluorocromos usados durante la realización del proyecto han sido, TMRE y Anexina DY634.

3.2.5.1 Análisis de la expresión de proteínas de membrana

Para analizar la expresión de los receptores DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DcR1 (TRAIL-R3) y DcR2 (TRAIL-R4) se tomaron 5×10^5 células/línea celular, las cuales se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió con 500 µl de medio para repartir posteriormente 100 µl/microtubos. De nuevo, se sometió a centrifugación y se resuspendió en este caso el precipitado con 100 µl de PBS con un 5% de suero. Se añadió a cada microtubo las cantidades adecuadas de anticuerpo, 1 µl del anticuerpo anti-IgG-PE inespecífica (control isotipo), 3 µl de anti-DR4-PE y 1,5 µl de anti-DR5-PE, anti-DcR1-PE o anti-DcR2-PE, y se incubaron durante 15-20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la incubación, las muestras se lavaron dos veces con PBS con suero, y finalmente se diluyeron las muestras con 200 µl de PBS, para su posterior análisis por citometría de flujo.

La siguiente tabla 3.1 contiene información de los anticuerpos usados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Especie, Origen	Concentración ($\mu\text{l}/10^6$ cél)	Proveedor
IgG-PE	Ratón	1	Thermo Scientific Pierce
DR4-PE (TRAIL-R1, CD261)	Mc, ratón IgG1	3	Thermo Scientific Pierce
DR5-PE (TRAIL-R2, CD262)	Mc, ratón	1,5	Thermo Scientific Pierce
DcR1-PE (TRAIL-R3, CD263)	Mc, ratón, IgG1	1,5	Thermo Scientific Pierce
DcR2-PE (TRAIL-R4, CD264)	Mc, ratón, IgG1	1,5	Thermo Scientific Pierce

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

La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora es usada para bombear protones (H^+) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana interna ($\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial). Este gradiente de H^+ permite a la ATP sintasa usar el flujo de protones generados para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. En condiciones normales, el potencial mitocondrial de las células es alto y constante (~ 130 mV), pero disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias. Para la medida de este potencial se utilizó la sonda fluorescente TMRE que emite fluorescencia roja ($\lambda_{\text{abs}} = 549$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 574$ nm). Esta sonda está cargada positivamente, por lo que se acumula en la matriz mitocondrial de las células viables. Cuando desciende el valor del potencial, es decir, en las primeras etapas de la apoptosis, desciende la cantidad de sonda retenida en la matriz, disminuyendo por lo tanto la fluorescencia.

Cuando la célula está ya en un proceso de apoptosis más avanzada, se produce la exposición de la fosfatidilserina (PS) desde la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa. La exposición de este fosfolípido es un evento indicador de apoptosis. Para medir la externalización de la fosfatidilserina y por lo tanto, la apoptosis se utilizó el fluorocromo Anexina DY634 ($\lambda_{\text{abs}} = 650$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 660$ nm), el cual se une específicamente al fosfolípido.

La existencia de sondas que emiten a longitudes de onda diferentes, tanto para analizar la exposición de PS como el potencial de membrana mitocondrial, nos permite medir ambos parámetros simultáneamente en una misma célula sin que interfieran entre ellas.

Para realizar este doble marcaje, se prepara una mezcla con 100 µl de ABB (*Annexin Binding Buffer*), 0,5 µl de TMRE y 1 µl de Anexina DY634. El volumen de cada componente de la mezcla es por cada muestra a analizar. Las células (6×10^5 cel/ml), tratadas y control, se someten a una centrifugación a 3500 r.p.m durante 1 minuto para resuspender posteriormente con 100 µl de la mezcla el precipitado obtenido. Este volumen se transvasa a tubos de citómetro para incubarlos durante 15 minutos a 37 °C y en oscuridad, favoreciendo así la entrada de la sonda TMRE a las mitocondrias y la unión de la Anexina a la fosfatidilserina translocada en la membrana. Pasado este tiempo de incubación, las muestras se diluyen con 200 µl de tampón ABB y se analizan las señales del TMRE y Anexina DY634 en los canales FL2 y FL4 respectivamente, de un citómetro de flujo. Se consideran células apoptóticas aquellas que son Anexina DY634 positivo y TMRE negativo. Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando programas informáticos Cell Quest y Weasel.

3.3 Análisis de la expresión de la fragmentación del ADN mediante tinción nuclear con Hoechst 33342

Durante la muerte celular programada se produce una compactación y fragmentación del material celular, que puede ser fácilmente detectada usando colorantes que tiñen específicamente la cromatina nuclear. El reactivo utilizado para la visualización de la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, aspectos indicadores de la apoptosis, fue la sonda Hoechst 33342.

Inicialmente se prepararon cubreobjetos cubiertos de polilisina según el siguiente protocolo: se eligieron cubreobjetos redondos de 13 mm de diámetro, primero se lavaron en etanol y se dejaron secar al aire. Una vez secos, se les añadió a cada cubre 150 µl de una solución 0.1% (p/v) de poli-L-Lys en H₂O y se incubaron durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, con una micropipeta se eliminó todo el exceso de polilisina, para una posterior utilización, y se lavaron los cubreobjetos en agua destilada. Se dejaron secar con la cara de polilisina hacia arriba y se guardaron en una placa de 24 pocillos hasta su utilización.

Tras los correspondientes tratamientos, las células (15×10^5) se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 minutos, se resuspendieron en 600 μ l de PBS y se volvieron a centrifugar a la misma velocidad. En este caso, se resuspenden con 300 μ l de paraformaldehído 4% y se dejan durante 15 minutos a 4 °C. Pasado este tiempo, se centrifuga a 5000 r.p.m durante 2 minutos y se resuspenden con 500 μ l de PBS. Esta solución de células fijadas se añade sobre los cubreobjetos tratados con polilisina presentes en la placa de 24 pocillos. Para favorecer la adhesión de las células a los cubreobjetos, la placa se centrifuga a 1200 r.p.m durante 5 minutos. Se elimina la solución sobrante de los pocillos por aspiración.

Se preparó una mezcla de Hoechst 33342 diluido en Mowiol a una concentración de 5 μ g/mg y se colocó una gota de esta mezcla en cada portaobjeto, sobre los cuales se colocaron los cubres ya secos con la cara tratada hacia abajo. Finalmente, se dejaron secar durante 12-24 horas, y se conservaron a 4 °C hasta su análisis.

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

3.4 Análisis de la expresión de proteínas

3.4.1 Materiales y reactivos

3.4.1.1 Reactivos para la extracción e inmunoprecipitación de proteínas

Para la obtención de proteínas de extractos celulares se utilizaron los siguientes productos: Triton X-100, Tris/HCl, EDTA, ortovanadato sódico (Na_3VO_4), pirofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_5$), fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), fluoruro sódico (NaF), leupeptina, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol procedentes de Sigma (Madrid, España). El cloruro de sodio (NaCl) y el dodecilsulfato de sodio (SDS) fueron proporcionados por Merck y el glicerol por Scharlau. El cóctel de inhibidores de proteasas procedió de Roche.

3.4.1.2 Materiales y reactivos para la electroforesis de proteínas y transferencia a membranas.

Para la electroforesis de proteínas se emplearon los siguientes productos: persulfato amónico (APS) procedente de Serva (Heilderberg, Alemania), solución 30% acrilamida/bisacrilamida,

N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y rojo Ponceau procedieron de Sigma y el marcador de peso molecular coloreado "Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder" fue suministrado por Thermo Scientific.

Las cantidades utilizadas de cada producto para la elaboración de un gel al 14% de poliacrilamida son mostradas en la tabla 3.2.

	Resolving (gel inferior)	Stacking (gel superior)
Acrilamida/Bisacrilamida	2,3 ml	325 µl
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1,25 ml	-----
0.5M Tris-HCl pH 6.8	-----	630 µl
Agua destilada	1,37 ml	1,5 ml
10% SDS	50 µl	25 µl
Persulfato sódico (APS)	100 µl	100 µl
(TEMED)	10 µl	10 µl

En la transferencia de proteínas a membranas se utilizaron: membranas de PVDF (Hybond-P) y papel adsorbente (Amersham Hybond blotting paper) que fueron proporcionadas por GE Healthcare, metanol (grado HPLC) procedente de Panreac y Tween 20 y glicina obtenidos de Sigma.

3.4.1.3 Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos utilizados en Western-blot

La Tabla 3.3 contiene la información referente a los anticuerpos empleados en la inmunotransferencia (Western Blot).

Anticuerpo	Tipo, Especie, Origen	Dilución	Proveedor
Caspasa 3	Pc, conejo	1/1000	Cell Signaling
Caspasa 3 activa	Pc, conejo	1/1000	Cell signaling
Caspasa 6	Mc, conejo	1/1000	Cell signaling
Caspasa 8	Mc, ratón, clon 5F7	1/500	MBL
Caspasa 9	Mc, ratón	1/1000	MBL
XIAP	Mc, ratón, clon 28	1/250	BD Biosciences
Bid	Pc, cabra, AF860	1/1000	R&D Systems
FasL	Ratón	1/1000	BD Biosciences
TRAIL	Ratón	1/1000	BD Biosciences
β-actina	Mc, ratón, clon AC-15	1/10000	Sigma

Los anticuerpos secundarios dirigidos contra las IgGs de conejo, ratón o cabra, marcados con fosfatasa alcalina o con peroxidasa, procedieron de Sigma (Madrid, España) y se usaron una dilución 1:10000. Los reactivos utilizados para el revelado por quimioluminiscencia (ECL) fueron sustrato quimioluminiscente para la detección de HRP procedente de Thermo Scientific y KPN. Mientras que los films usados para dicho revelado fue Hyperfilm ECL, de GE Healthcare. Tanto el líquido revelador como fijador procedió de Sigma.

3.4.2 Métodos de análisis de proteínas por Western-Blot

3.4.2.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes

Tras someter a las células a diversos tratamientos, se tomaron 7×10^5 células en microtubos y se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con 1 ml de PBS y se sometió de nuevo a una centrifugación a 4500 r.p.m durante 1 minuto. Tras esta centrifugación, el precipitado obtenido fue resuspendido con 20 μ l de solución de lisis 1x y se incubaron durante 20 minutos en hielo. Esta solución de lisis está compuesta por: Tritón X-100 al 1% (v/v), Tris/HCl 1M pH 7.6, EDTA 0.5M, ortovanadato sódico 0.5M, pirofosfato sódico 0.5M, fluoruro de sodio 1M, cloruro de sodio 2M y glicerol 10%.

Pasado este tiempo de incubación, se centrifugó de nuevo a 10000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió solución de carga concentrado 3x, con la siguiente composición: Tris/HCl 150mM pH7.4, SDS 3%, molibdato de sodio 0.3mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30mM, glicerol 30% (v/v), β -mercaptoetanol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0.06% (v/v). Finalmente los lisados celulares se calentaron a 100 °C en un baño seco (Selecta) durante 5 minutos y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

3.4.2.2 Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación de proteínas celulares en función de su peso molecular se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS al 0.1%. El porcentaje de poliacrilamida usado durante este trabajo fue de 14% (Tabla 3.2). Las electroforesis se realizaron en cubetas de electroforesis de BioRad. Tanto los geles como el tampón de electroforesis (buffer running) (Tris, Glicina y SDS pH 8,6) fueron hechos en el laboratorio.

Las muestras de lisados se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, se centrifugaron a 10000 r.p.m durante 30 segundos y se cargaron en los pocillos del gel (10 µl/pocillo), también se cargó en un pocillo 8 µl marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 180V, 20 mA/gel, durante 2 horas, de forma continua.

3.4.2.3 *Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF*

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol, utilizando un tampón de transferencia compuesto por: Tris/HCl 48 mM pH 8.3, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20 % (v/v). La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca de BIO-RAD a 20 V y 400 mA durante 2 horas. La eficacia de la transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo Ponceau.

3.4.2.4 *Análisis de proteínas por inmunotransferencia*

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de nitrocelulosa se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos (Tabla 3.3), y los pesos moleculares relativos a las proteínas se calcularon en relación al marcador de peso molecular estándar coloreado utilizado en la electroforesis.

Tras la tinción con rojo de Ponceau, la membrana de PVDF se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (w/v), disuelta en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Una vez bloqueada, se llevó a cabo tres lavados consecutivos y en agitación, durante 10 minutos cada uno, con una solución de lavado denominada Tampón B que contenía disueltos en PBS pH 7.4, Tween 20 0.1% y timerosal (1g/l). Posteriormente, para detectar la proteína deseada, se incubó durante toda la noche en la cámara fría y en agitación, con el anticuerpo primario específico. Para los anticuerpos primarios se preparó una solución de Anticuerpo que contenía PBS-Tween, Acida sódica al 0,05% y BSA 5%, en la que se añadió la cantidad de anticuerpo según su factor de dilución.

Finalizada la incubación, la membrana se sometió a dos lavados consecutivos, en agitación, durante 10 minutos con Tampón B. Tras los lavados, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina o peroxidasa (diluido en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. La concentración utilizada

del anticuerpo secundario fue 0.2 µg/ml. Finalmente se retiró la solución de anticuerpo y se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos con tampón B. Después haber lavado correctamente para evitar la aparición de fondo oscuro, la membrana se incubó durante 5 minutos, bien con una solución de luminol, específica para los anticuerpos secundarios con HRP (peroxidasa de rábano) o bien con sustrato específico para los anticuerpos con PA (fosfatasa alcalina).

Tras la incubación, la membrana se transfirió a una funda de plástico transparente encajada dentro de un cassette de revelado radiológico, eliminando por presión el exceso de mezcla de revelado y las posibles burbujas formadas. En un cuarto oscuro, con iluminación para revelado fotográfico, se colocó una película radiográfica Hyperfilm sobre la funda que contenía la membrana, y se expuso durante un tiempo determinado, entre 5 a 15 minutos, que varió dependiendo del anticuerpo utilizado. Pasado este tiempo, el film se reveló mediante inmersión seriada en el líquido revelador, agua destilada y líquido fijador. La preparación de estos líquidos se realizó según las instrucciones del fabricante. Tras el revelado las películas se dejaron secar al aire.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio del mecanismo de apoptosis inducido por CX-4945.

En este primer apartado se caracterizó el efecto de CX-4945 en líneas celulares del mieloma múltiple. En concreto, se utilizaron las líneas celulares NCI-H929, MM.1S, RPMI 8226 y U266.

4.1.1 Determinación de la IC₅₀ del CX-4945 en líneas de mieloma múltiple

Se realizaron ensayos de dosis-respuesta durante 24h, mediante el método de MTT (apartado 3.2.4).

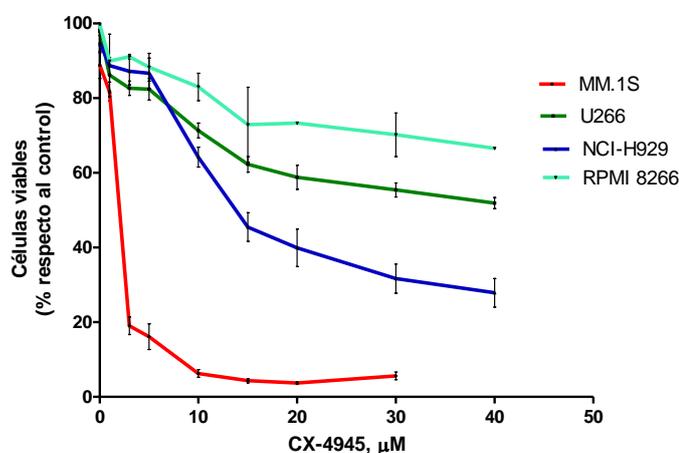


Figura 4.1.- Sensibilidad a CX-4945 en las células de mieloma. Las líneas celulares se incubaron con concentraciones crecientes de CX-4945 durante 24h. La proliferación celular se estimó por el método del MTT. Los resultados mostrados con la media \pm error estándar de 7 determinaciones individuales y están expresados como porcentaje de viabilidad relativa respecto a las células control (sin CX-4945).

Como se aprecia en la figura 4.1, el CX-4945 indujo una clara reducción de la proliferación celular en todas las líneas, siendo mucho más drástica en la línea celular MM.1S, por lo que esta fue la más sensible con una concentración inhibitoria del 50 % de la proliferación (IC₅₀) de 2,17 µM de CX-4945 a las 24h, seguido de la línea NCI-H929, con una IC₅₀ 14,5 µM del fármaco. Las más resistentes fueron las líneas celulares RPMI 8266 y U266 con un IC₅₀ de 35 µM y 40 µM de CX-4945, respectivamente.

Este fármaco, en comparación con otros utilizados en el tratamiento del mieloma múltiple como Sorafenib (inhibidor de la quinasa Raf) y BMS-214662 (inhibidor de farnesil-transferasas no peptídico), muestra unas IC₅₀ mucho mayores para las líneas celulares estudiadas. En cuanto al

Sorafenib, la IC50 se encuentra en el rango de concentración entre 5-8 μM , mientras que el BMS-214662, muestra valores de IC50 menores, siendo la línea más sensible en este caso NCI-H929 con IC50 de 50 nM, seguido de RPMI 8226 con 0.2 nM. La más resistente fue U266, con IC50 de 0.8 nM (Gómez Benito 2006), (Ramírez Labrada 2013).

4.1.2 Efecto de CX-4945 en la apoptosis en las diferentes líneas celulares

Debido a la naturaleza del método del MTT, los resultados no permitían concluir inequívocamente si el CX-4945 tiene un efecto citostático o citotóxico sobre las líneas celulares de mieloma. Para determinar si el CX-4945 inducía muerte celular se realizaron tanto curvas dosis-respuesta como tiempo-respuesta, midiendo la inducción de apoptosis, la cual se determinó por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células en las que había exposición de fosfatidilserina (PS) mediante el fluorocromo Anexina V-DY634 y el porcentaje de la caída del potencial de membrana mitocondrial mediante el TMRE. Estas características son eventos claros de la apoptosis celular temprana.

En primer lugar se realizaron curvas dosis-respuesta para las líneas celulares MM.1S, U266 y NCI-H929, incubando dichas líneas con dosis crecientes de CX-4945 durante 24h.

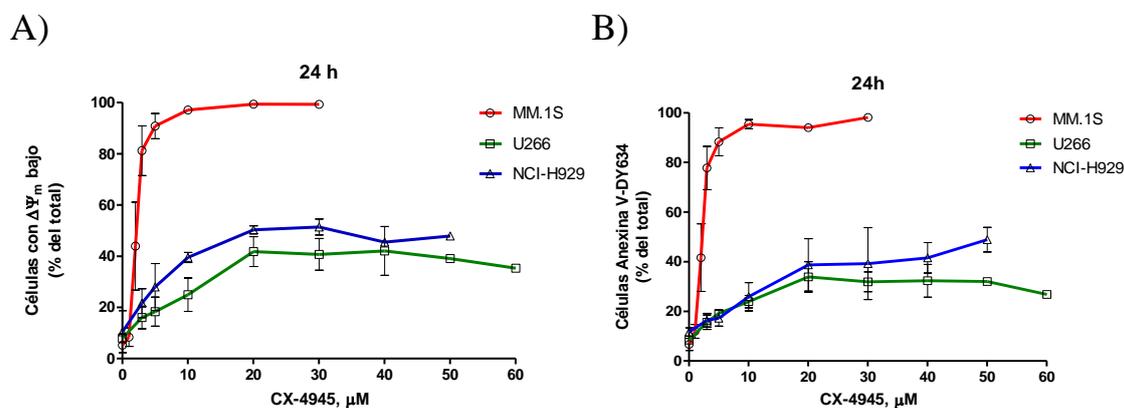


Figura 4.2.- Ensayo de la apoptosis con diferentes concentraciones de CX-4945, curva dosis-respuesta. Las líneas celulares MM.1S, NCI-H929 y U266 fueron incubadas con concentraciones crecientes de CX-4945 durante 24 h. Pasado este tiempo, se analizó mediante citometría de flujo la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), representado en la figura A) y la exposición de fosfatidilserina (Anexina V+) representado en la figura B). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes.

CX-4945 provoca una caída del potencial mitocondrial y una exposición de fosfatidilserina de membrana de forma dependiente a la dosis. Las células de mieloma U266 y NCI-H929, a partir de las dosis 20 μM de CX-4945 no se observa un aumento de muerte celular, incluso a dosis de hasta 50 o 60 μM del fármaco, por lo que en relación con los datos obtenidos en el ensayo MTT, indican una combinación de un efecto citostático y un efecto citotóxico. En cambio, la línea celular MM.1S, la citotoxicidad es muy alta por lo que la inhibición observada en el test podría corresponder íntegramente a un efecto citotóxico.

Con estos datos obtenidos para cada línea celular se concluye que el CX-4945 induce apoptosis en todas las líneas de mieloma usadas, siendo la más sensible a este fármaco la línea celular MM.1S, seguida de NCI-H929, y la más resistente la línea U266.

En segundo lugar, para medir también la muerte celular en células de mieloma múltiple inducida por el compuesto CX-4945, se realizó curvas tiempo-respuesta. Para ello, se incubó las líneas celulares de mieloma múltiple MM.1S, U266, NCI-H9299 y RPMI 8226 con sus respectivos IC50 del fármaco, y se midió tanto la caída del potencial de membrana como la exposición de fosfatidilserina a diferentes tiempos.

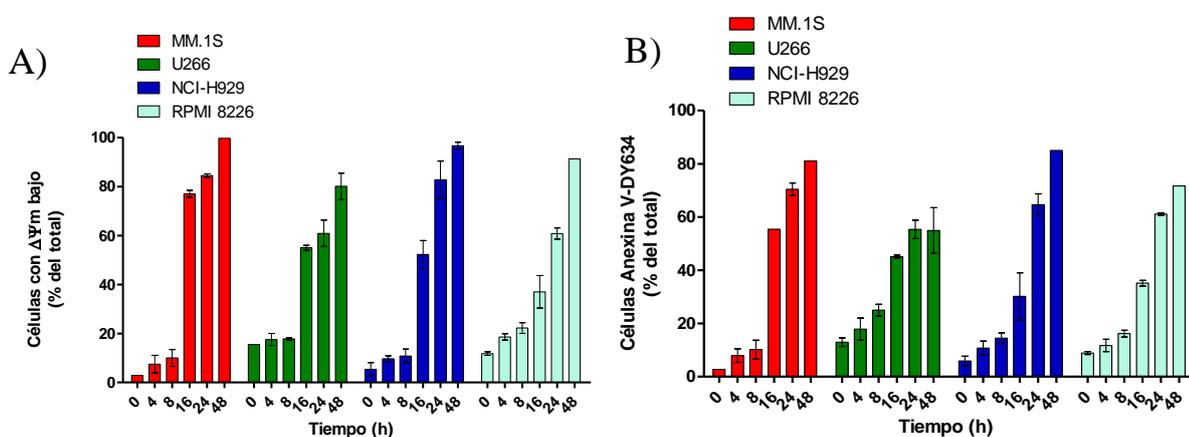


Figura 4.3.- Ensayo de la apoptosis con concentración fija de CX-4945 a diferentes tiempos, curva tiempo-respuesta. Las líneas celulares fueron incubadas, a diferentes tiempos (0, 4, 8, 16, 24, 48 h) con su respectivas IC50 del fármaco, que son las siguientes: 4 μM MM.1S, 30 μM U266, 15 μM NCI-H929 y 30 μM RPMI 8226. Después de cada tiempo, mediante el citómetro de flujo, se midió la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), representado en la figura A) y la exposición de fosfatidilserina (Anexina V+) representado en la figura B). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Como representa la figura 4.3, en todas las líneas celulares estudiadas, durante las 8 primeras horas, se produce de forma progresiva, una exposición de fosfatidilserina y una caída del

potencial mitocondrial poco significativa. Se observa que a las 16 horas es cuando se produce una brusca caída del potencial y una gran exposición de fosfatidilserina, aumentando progresivamente a las 24 y 48 horas. No todas las líneas celulares se comportan de la misma manera a 16 h. La línea celular más sensible, MM.1S, presenta a ese tiempo un 80 % de apoptosis, mientras que las otras líneas celulares, requieren entre 24 y 48 h para alcanzar esos porcentajes.

Se puede concluir, tanto por las curvas dosis-respuesta como por las curvas tiempo-respuesta, que el fármaco CX-4945 induce apoptosis en todas las líneas celulares de mieloma múltiple usadas, y que la línea más sensible es MM.1S.

4.1.3 Efecto de los inhibidores de los diferentes tipos de muerte.

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que el fármaco CX-4945 induce muerte celular en las células de mieloma múltiple analizadas. La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programada, pero existen otras formas de muerte celular descritas como la necrosis programada o necroptosis (L Galluzzi 2012).

Para caracterizar el tipo de muerte, se trataron las líneas celulares de mieloma múltiple con CX-4945, previa incubación de diferentes inhibidores como Z-VAD-fmk, Necrostatina-1, Necrosulfonamida o la combinación de ellos, una hora antes de adicionar el CX-4945. El Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) es un inhibidor general de las caspasas, por lo que inhibe la muerte celular por apoptosis, la cual está controlada genéticamente y es ejecutada por caspasas. La Necrostatina-1 (Nec-1) es un inhibidor de la enzima quinasa Rip1 (*receptor-interacting protein 1*), impidiendo que se active la vía de muerte celular necroptosis. La necrosulfonamida (NSA) inhibe también la necroptosis por modificación covalente de MLKL (*mixed lineage kinase domain like*), la cual forma parte integral de la maquinaria de señalización de necroptosis por debajo de la activación de Rip1 y Rip3 (Ting Pan 2014).

En este experimento se incubaron las líneas celulares MM.1S, U266, NCI-H929 y RPMI 8226 con Z-VAD-fmk 30 μ M, Nec-1 30 μ M y NSA 1 μ M una hora antes de tratar las células con CX-4945 durante 24 horas. También se estudiaron los efectos de las combinaciones de Z-VAD-fmk con cada inhibidor de necroptosis. Las concentraciones de CX-4945 utilizadas para cada línea celular fueron sus respectivas IC50.

Se evaluó mediante citometría de flujo, su efecto en eventos tempranos como la exposición de fosfatidilserina (PS) o la disminución de la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

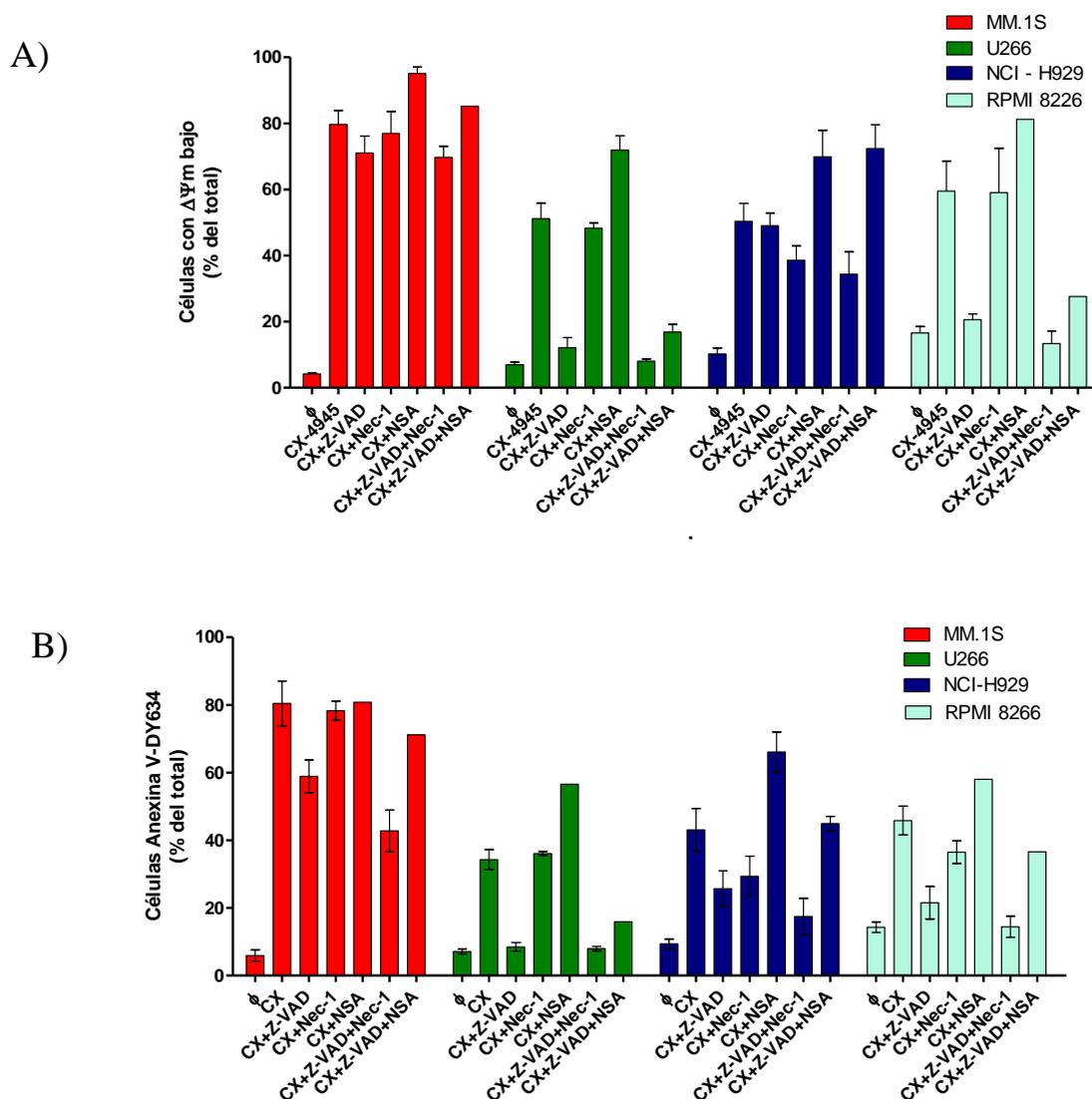


Figura 4.4.- Efecto de los inhibidores de la apoptosis y de la necrosis. Las líneas celulares fueron incubadas una hora antes con los inhibidores Z-VAD-fmk, Nec-1 y NSA, y posteriormente con sus respectivas IC₅₀ del fármaco, que son las siguientes: 4 μ M MM.1S, 30 μ M U266, 15 μ M NCI-H929 y 30 μ M RPMI 8226. Después de 24 h de incubación, mediante el citómetro de flujo, se midió la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), representado en la figura A) y la exposición de fosfatidilserina (Anexina V+) representado en la figura B). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 10 experimentos independientes

Como se muestra en la Figura 4.4, el tratamiento con CX-4945 indujo en todas las líneas exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática y pérdida del $\Delta\Psi_m$ de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

Con respecto al Z-VAD-fmk, el inhibidor general de caspasas, se aprecia una protección de la apoptosis y la muerte inducida por CX-4945 en grado variable, mostrando desde una inhibición prácticamente completa como la que se observa en las RPMI 8226 y U266, impidiendo por completo, tanto la pérdida de $\Delta\Psi_m$ como la exposición de PS, a una ligera inhibición como la observada en las MM.1S. Este inhibidor no previno de la pérdida del $\Delta\Psi_m$, aunque si atenuó la translocación de PS en la línea NCI-H929. Estudios previos del grupo demostraron resultados similares en cuanto al efecto del Z-VAD-fmk sobre la apoptosis inducida por sorafenib y BMS 214662 en las líneas RPMI 8226 y U266.

Se observa en todas las líneas que la incubación con Nec-1 inhibe muy poco la muerte inducida por CX-4945, mientras que la incubación con NSA, potencia la muerte inducida por el fármaco de estudio. Este último hecho se observó también en los estudios realizados con el sorafenib en las líneas celulares MM.1S y RPMI 8266, en el que la combinación con la Nec-1 aumenta la muerte celular inducida por el mismo (Ramirez Labrada 2013).

En este estudio, la combinación de los inhibidores Z-VAD/Nec-1 junto con CX-4945, provoca en las líneas celulares RPMI 8226 y U266 un fuerte efecto protector aunque la mayor parte de este efecto parece deberse al inhibidor de caspasas, mientras que en las líneas H929 y MM.1S el efecto es menor. La combinación de ambos inhibidores junto con el sorafenib, en estudios previos, mostraba los mismos resultados.

Según estos datos, el CX-4945 induce muerte celular dependiente de caspasas en las líneas de mieloma múltiple utilizadas, excepto en MM.1S, debido a que la utilización del inhibidor de caspasas, Z-VAD-fmk, disminuye significativamente la muerte.

Para caracterizar el efecto del CX-4945 en estas líneas celulares se analizó, además de la caída del potencial mitocondrial $\Delta\Psi_m$ y la exposición de PS ya observados, la determinación de otros parámetros moleculares y morfológicos característicos de la apoptosis. Uno de esos marcadores es la condensación y fragmentación celular. Para ello, se tiñeron los núcleos con Hoechst 33342 y se observaron por microscopia de fluorescencia para detectar células que tuvieran condensación nuclear, morfología característica de las células que están sufriendo apoptosis.

El experimento se llevó a cabo por la incubación de las líneas celulares MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226 y U266 con el fármaco de estudio, CX-4945 y con la combinación de este junto con el inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk.

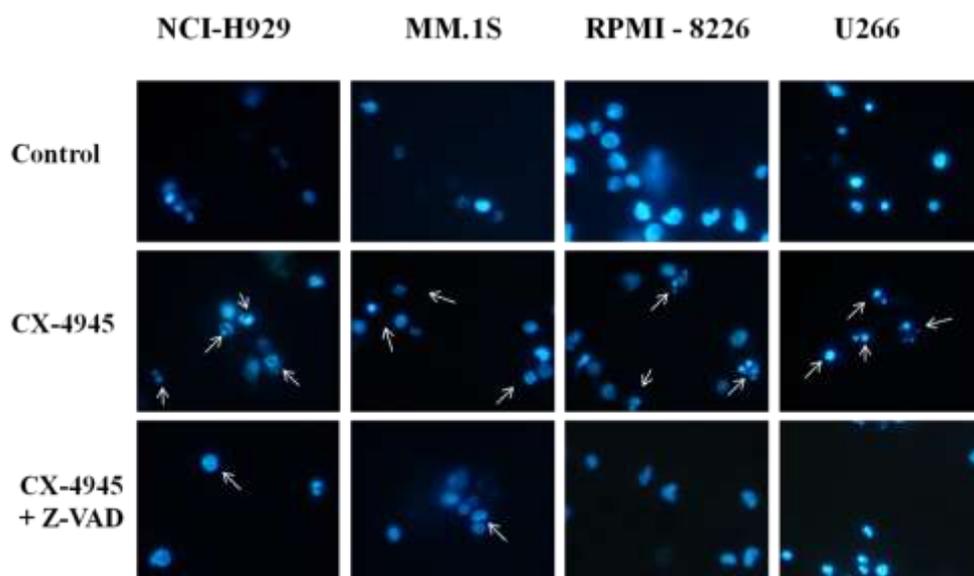


Figura 4.5.- Efecto de CX-4945 y de Z-VAD-fmk en la condensación y fragmentación nuclear. Las líneas celulares fueron incubadas una hora antes con el inhibidor Z-VAD-fmk y posteriormente con sus respectivas IC50 del fármaco, que son las siguientes: 4 μ M MM.1S, 30 μ M U266, 15 μ M NCI-H929 y 30 μ M RPMI 8226. Después de 24 h de incubación, se fotografiaron por microscopia de fluorescencia x40.

Como muestra la figura 4.5, al incubar las células con CX-4945 durante 24 horas, todas las líneas celulares mostraron características típicas de la apoptosis como el encogimiento celular, que fue más acusado en U266, RPMI 8226 y MM.1S, y la formación de burbujas, mientras que las células NCI-H929 muestran el típico núcleo apoptótico refringente.

La condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear inducida tras el tratamiento con CX-4945, se evitaron en presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk en RPMI 8226 y U266. En las células MM.1S y NCI-H929 se evitó la fragmentación nuclear, pero se detectó condensación de la cromatina perinuclear células indicativas de muerte independiente de caspasas (López-Royuela Nuria 2010).

4.2 Estudio del efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 y Bcl-xL en mieloma en la sensibilidad de apoptosis

Para estudiar la implicación de las proteínas Mcl-1 y Bcl-xL en la sensibilidad de apoptosis de las células del mieloma múltiple, se obtuvieron, a partir de la línea celular RPMI 8226, líneas

celulares que sobreexpresasen Mcl-1 y Bcl-x_L, mediante la técnica de transfección retroviral. Esta técnica permite la integración a nivel cromosómico del gen celular de interés, empleando vectores específicos, en este caso, el vector que se usó fue pLZR-IRES-GFP.

Las proteínas que se sobreexpresaron son anti-apoptóticas y pertenecen a la familia Bcl-2, las cuales inhiben la vía mitocondria de la apoptosis (Apartado 1.1.1.1). Las funciones características de estas es promover la diferenciación y viabilidad celular.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 y Bcl-x_L en la sensibilidad celular a la apoptosis, las células RPMI pLZR, RPMI pLZR-Mcl-1 y RPMI pLZR-Bcl-x_L, las cuales se obtuvieron hace unos años en nuestro laboratorio, se trataron con concentraciones crecientes del fármaco CX-4945, dejándolas incubar durante 24h.

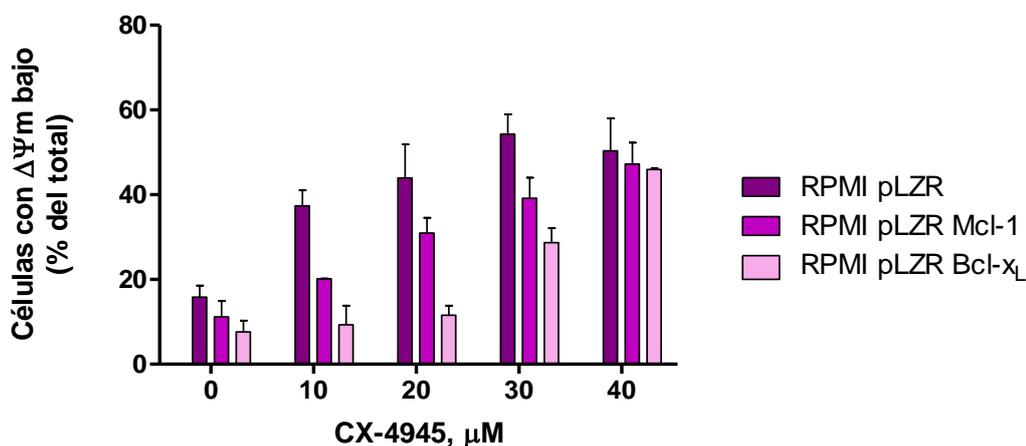


Figura 4.6.- Efecto de la sobre-expresión de Mcl-1 y Bcl-x_L en la sensibilidad de la apoptosis. Las líneas celulares se trataron con concentraciones crecientes de CX-4945. Después de 24 h de incubación, mediante el citómetro de flujo, se midió la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Como se observa en la figura 4.6, las células RPMI pLZR al igual que las RPMI 8226 (Figura 4.2), fueron sensibles a CX-4945, aumentando la caída del potencial mitocondrial a medida que aumenta la concentración del fármaco. En cambio, en las células RPMI-pLZR-Mcl-1 y RPMI-pLZR-Bcl-x_L, se redujo considerablemente la toxicidad del CX-4945 a las 24 h de incubación, siendo más notable este hecho en las células que sobreexpresan la proteína Bcl-x_L. La sobreexpresión de esta proteína protege casi por completo hasta la dosis de 20 μM de CX-4945, mientras que el efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 solo ejerce una inhibición parcial a esa concentración, incluso a dosis más altas.

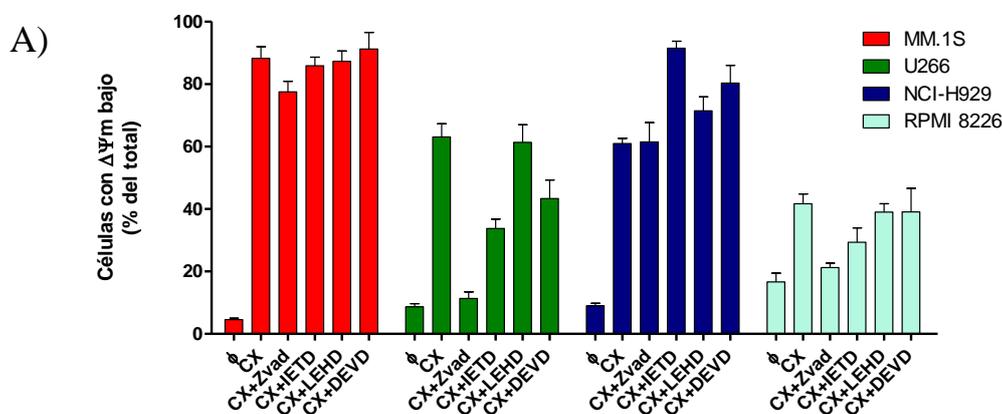
Estos resultados indican que la sobreexpresión de las proteínas Mcl-1 y Bcl-x_L no es suficiente para evitar por completo la muerte celular en esta línea de mieloma, sugiriendo que la vía de muerte activada en estas células por CX-4945 sea la vía extrínseca, medida por receptores mortales (Apartado 1.1.1.2). Estas proteínas antiapoptóticas preservarían durante más tiempo la viabilidad de las células del mieloma múltiple, tras el tratamiento con fármacos anti-tumorales que inducen apoptosis vía mitocondrial.

4.3 Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por CX-4945

4.3.1 Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la apoptosis inducida por CX-4945

Debido a los resultados obtenidos en la Figura 4.4, en las que todas las líneas celulares incubadas con Z-VAD-fmk, excepto MM.1S, presentaban una inhibición de la apoptosis con respecto a la producida por el fármaco CX-4945, se planteó, por ello, estudiar el efecto de inhibidores específicos de caspasas en la apoptosis inducida por CX-4945.

Las células se incubaron de nuevo con el inhibidor general de caspasas, Z-VAD-fmk, una hora antes de adicionar el CX-4945, a una concentración de 30 μ M. El tratamiento con los inhibidores específicos se realizó de la misma forma y con la misma concentración, y son los siguientes: inhibidor de la caspasa-8 (IETD), inhibidor de la caspasa-9 (LEHD) e inhibidor de la caspasa 3 (DEVD). Las concentraciones de CX-4945 adicionadas a cada línea celular fueron las siguientes: 6 μ M MM.1S, 35 μ M U266, 20 μ M NCI-H929 y 35 μ M RPMI 8226. Se evaluaron los efectos mediante citometría de flujo, analizando la expresión de PS (Anexina V⁺) y la caída de potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$ m).



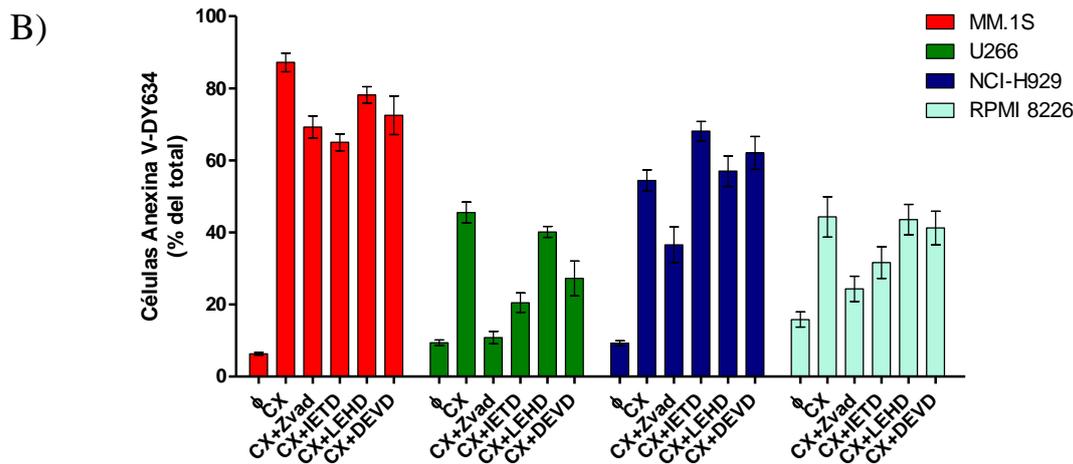


Figura 4.7.- Efecto de los inhibidores de caspasas sobre la muerte inducida por CX-4945. Las líneas celulares fueron incubadas una hora antes con los inhibidores Z-VAD-fmk, IETD, LEHD y DEVD, y posteriormente se trataron con las siguientes concentraciones de CX-4945: 6 μ M MM.1S, 35 μ M U266, 20 μ M NCI-H929, 35 μ M RPMI 8226. Después de 24 h de incubación, mediante el citómetro de flujo, se midió la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), representado en la figura A) y la exposición de fosfatidilserina (Anexina V+) representado en la figura B). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 7 experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 4.7, el Z-VAD-fmk vuelve a mostrar los mismos resultados que en la Figura 4.4.

La línea celular MM.1S no muestra disminución de la apoptosis con el Z-VAD-fmk, lo que sugiere que existe un mecanismo alternativo de muerte celular independiente de caspasas en estas células. Este hecho confirma al tratar dichas células con inhibidores específicos de caspasas, los cuales tampoco protegen de la apoptosis.

Con respecto a la línea celular NCI-H929, el tratamiento con Z-VAD-fmk, aunque no previno de la pérdida de $\Delta\Psi_m$, si atenuó la translocación de PS. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la exposición de PS, un evento tardío en la apoptosis, es dependiente de caspasas, mientras que la caída del potencial de membrana mitocondrial en algunos modelos es anterior a la activación de las caspasas (López-Royuela Nuria 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos con el inhibidor general, tras el tratamiento de esta línea con IETD, LEHD y DEVD, no se mostró una disminución clara de la apoptosis en ninguno de los casos.

Por último, las líneas celulares U266 y RPMI 8226 tratadas con Z-VAD-fmk mostraron una inhibición prácticamente completa de la apoptosis. Tras la incubación con los inhibidores específicos se observó también una disminución de la apoptosis pero menor que con el Z-VAD-

fmk. El inhibidor de caspasa-8 (IETD) produce una inhibición mayor que con el inhibidor de caspasa-9 (LEHD). Estos resultados sugieren que la caspasa-8 contribuye a la caída de potencial mitocondrial en ambas líneas celulares. No obstante, la inhibición producida por IETD es menor que la producida por Z-VAD-fmk, indicando que otras caspasas también están implicadas en el proceso. En el caso de las U266, el inhibidor de la caspasa-3, DEVD, también reduce la caída del potencial mitocondrial causada por CX-4945, por lo que en estas células podría ser la acción conjunta de ambas caspasas la causante de la apoptosis. En la línea RPMI 8226, el único efecto significativo se observó con el inhibidor de la caspasa-8, aunque no se llegó al nivel de protección del Z-VAD-fmk, lo que sugiere que algunas otras caspasas, no analizadas en este trabajo, podrían participar también en la apoptosis inducida por CX-4945 en esta línea celular.

Respecto al mecanismo por el que se activa la caspasa-8 en respuesta al CX-4945 una hipótesis es la producción de ligandos mortales que actuarían de modo autocrino sobre las células induciendo apoptosis a través de la vía extrínseca, como ha sido propuesto para otros fármacos (Quan Chen and Hussein 2001). Otra posibilidad es que las alteraciones en la señalización celular provocadas por el CX-4945 induzcan la activación de la caspasa-8 sin necesidad de que los ligandos mortales se unan a sus correspondientes receptores (Clancy Lauren 2005).

En el caso de la línea celular NCI-H929, el inhibidor de la caspasa-8 potencia la muerte celular, en comparación con las células tratadas con CX-4945. Este hecho se podría relacionar con lo observable en la Figura 4.4, en la que la necrostatina inhibía algo la muerte celular. Por lo tanto, si se inhibe la caspasa-8 se puede potenciar la necroptosis debido a la activación del necroptosoma (Green 2008).

Por lo tanto, según los resultados obtenidos con los inhibidores específicos de caspasas, el CX-4945 puede inducir una muerte celular de forma diferente dependiendo del modelo celular empleado. Por un lado, en las RPMI 8226 y las U266 se induce una muerte dependiente en gran medida de la activación de las caspasas, más específicamente, de las que forman parte de la vía extrínseca de la apoptosis o de la necroptosis, mientras que en la línea MM.1S, predomina una vía independiente de caspasas, y en la línea NCI-H929 podría existir contribución de la necroptosis.

4.3.2 Análisis de la activación de caspasas inducida por CX-4945

Puesto que los resultados de los experimentos con inhibidores indicaban un papel importante de las caspasas en la apoptosis inducida por CX-4945 en algunas de las líneas celulares de mieloma, se decidió profundizar en el papel de varias de estas enzimas. Se analizó por Western-blot la activación de las principales caspasas iniciadoras y ejecutoras, tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca, tras el tratamiento con CX-4945, en varias líneas celulares de mieloma múltiple.

En primer lugar se analizó la activación de las caspasas-8 y -3 tras el tratamiento con concentraciones crecientes de CX-4945 en la línea celular MM.1S durante 24h. Como se había observado en los experimentos anteriores (Figura 4.7), esta línea celular, al ser incubada con el inhibidor de caspasas, Z-VAD-fmk, no mostraba una disminución significativa de la muerte producida por el CX-4945, por lo que se pensó que podría tener inhibidas las caspasas. Por esta razón, se analizó la activación de varias de ellas.

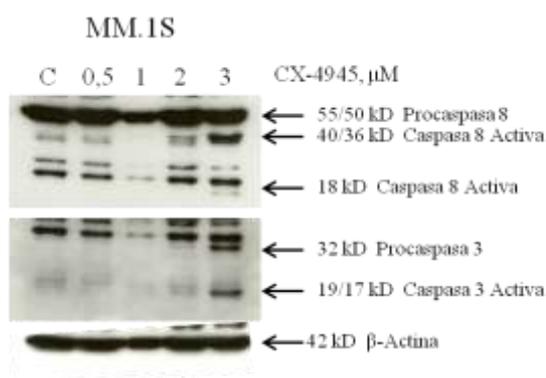


Figura 4.8.- Activación de las caspasas inducidas por CX-4945. Las células se trataron con concentraciones crecientes de CX-4945 durante 24h. Transcurrido este tiempo, se realizaron los extractos de proteínas totales y se analizó la activación de las caspasas mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de la muestra cargada se normalizó mediante la detección de la β-actina.

La figura 4.8, muestra que CX-4945 induce el procesamiento de las procaspasas -8 y -3, puesto que en ambas se reduce los niveles de la proenzima y por la aparición en ambas de la forma activa. Por lo que se puede concluir que en la línea celular MM.1S, CX-4945 induce la activación de las caspasas pero su actividad no es esencial para la muerte celular.

En segundo lugar, se analizó la expresión de caspasas tras el tratamiento con CX-4945 con una concentración fija y a diferentes tiempos. Este experimento se realizó tanto en la línea celular MM.1S como en las NCI-H929.

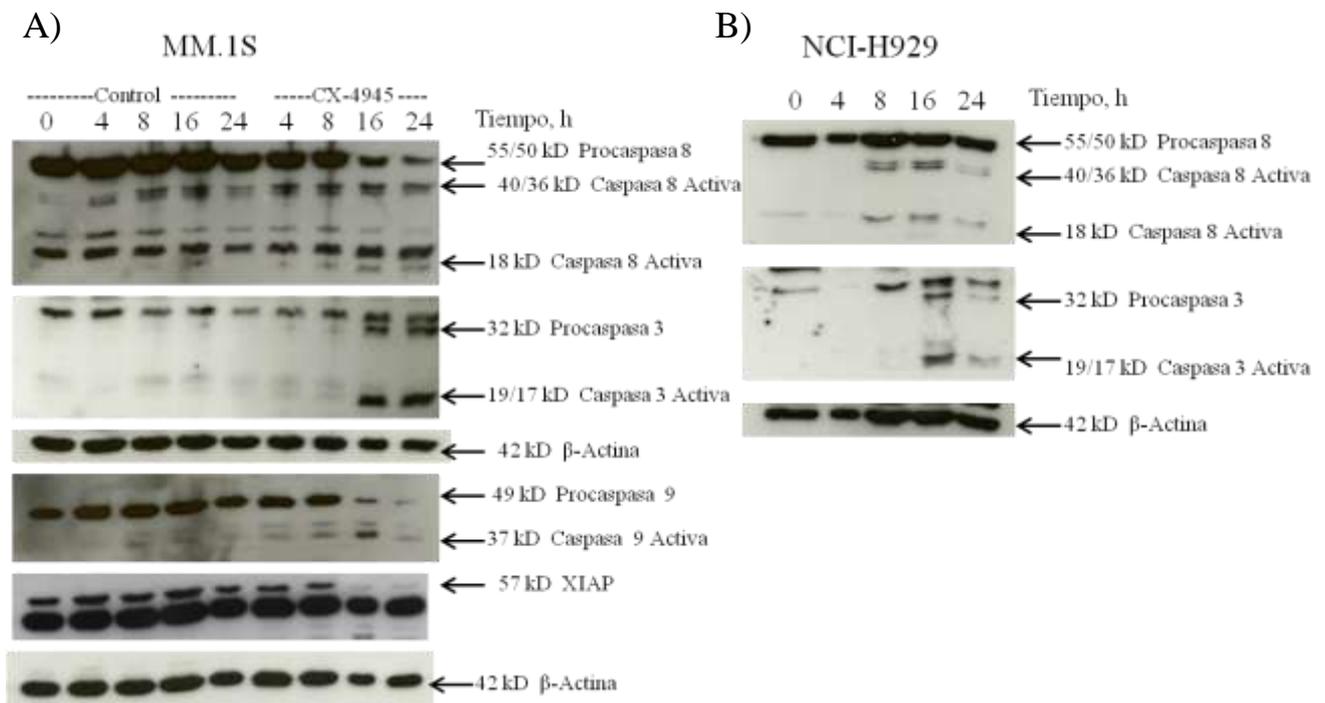


Figura 4.9.- Activación de las caspasas inducidas por CX-4945. La línea celular MM.1S (A) y NCI-H929 (B) se trató 6 μ M y 20 μ M de CX-4945, respectivamente, y fue incubado a diferentes tiempos, a 0, 4, 8, 12 y 24h. Transcurrido este tiempo, se realizaron los extractos proteicos totales y se analizó la activación de las caspasas mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de la muestra cargada se normalizó mediante la detección de la β -actina.

La figura 4.9 A), representa la activación de las caspasas en la línea celular MM.1S tratada con CX-4945 con una concentración fija a diferentes tiempo de incubación. Se analizaron también controles sin tratar para cada tiempo de incubación. Para las caspasas iniciadoras, tanto la caspasa-8 como la caspasa-9, se observa en la muestra tratada, que a las 8 h se comienza a producir una disminución de los niveles de proenzima y una aparición de la forma activa. Este mismo hecho ocurre en la caspasa ejecutora, la caspasa-3. También fue analizada la proteína XIAP que es un inhibidor de las caspasas. Durante la apoptosis se libera de las mitocondrial al citosol la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, un inhibidor de XIAP (Apartado 1.1.1.1, Figura 1.5). En la figura 4.9 A) se observa que a tiempos largos se produce disminución de los niveles de XIAP, lo que contribuye a una mayor activación de las caspasas (Almagro M.C 2012).

En la Figura 4.9 B) se analizan los niveles de expresión de las caspasas en la línea celular NCI-H929, observándose el mismo patrón que en las células MM.1S. A partir de las 8 h comienza a reducirse tanto de la caspasa-8 como de la caspasa-3, la cantidad de proenzima y aumenta la caspasa activada de ambas. Por lo que se puede concluir que aunque su actividad no sea esencial para la muerte celular en estas líneas, las caspasas que forman parte de ella no están inactivadas.

4.3.3 Análisis de la secuencia de activación de las caspasas inducidas por CX-4945.

Se analizó la expresión de las principales caspasas iniciadoras y ejecutoras, tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca, tras el tratamiento con CX-4945 y con inhibidores específicos de caspasas, en la línea de mieloma múltiple, U266, con el fin de determinar el orden en el que se produce la activación de las mismas.

En primer lugar se analizó, en la línea celular U266, la expresión de la caspasa-8 y -3 tras el tratamiento con una concentración fija de CX-4945, 30 μ M, a diferentes tiempos de concentración. En segundo lugar, se incubó las células de U266, no solo con CX-4945 a la misma concentración sino también con el inhibidor de caspasa-9 (LEHD), y se observó a los mismos tiempos la expresión de la caspasa-8, específica de la vía extrínseca y la proteína proapoptótica Bid, la cual es procesada y activada por la caspasa -8 sin respuesta a la unión de ligandos mortales. Bid sirve también como ligando directo molecular entre la activación de la caspasa-8 y la maquinaria mitocondrial de muerte. Por último, se incubaron las células con CX-4945 a la misma concentración y en este caso con el inhibidor de la caspasa-8 (IETD), para analizar la expresión de la caspasa -9, principal iniciadora de la vía mitocondrial de apoptosis.

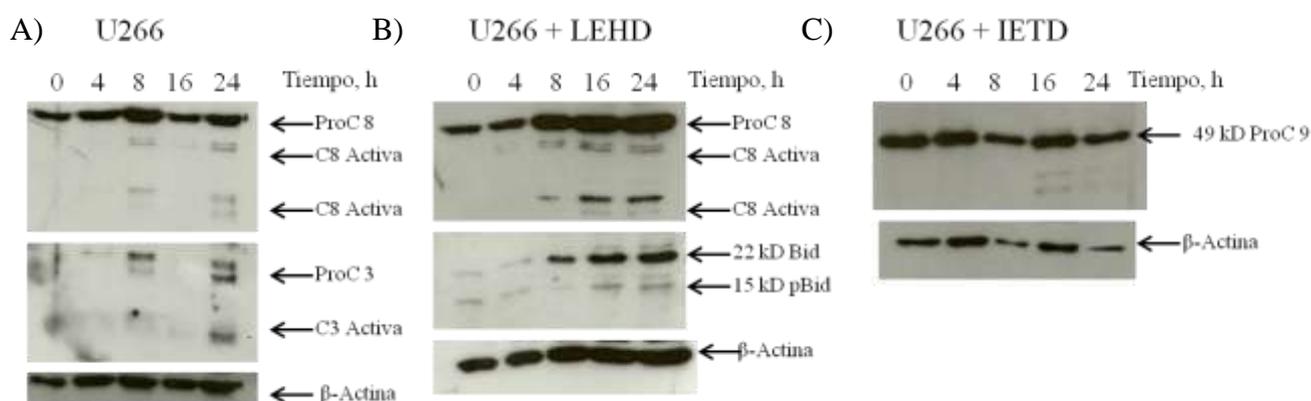


Figura 4.10.- Activación de las caspasas inducidas por CX-4945 e inhibidores de caspasas. La línea celular U266 se trató solo con 30 μ M de CX-4945 (A) o en combinación con 30 μ M de inhibidor de caspasas -8 (IETD) (B) o con 30 μ M del inhibidor de caspasa -9 (LEHD) (C), los cuales fueron incubados a diferentes tiempos, a 0, 4, 8, 16 y 24h. Transcurrido este tiempo, se realizaron los extractos totales y se analizó la activación de las caspasas mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de la muestra cargada se normalizó mediante la detección de la β -actina.

La Figura 4.10 A, muestra que el tratamiento con CX-4945 de las células U266, produce la activación de la caspasa-8 y la caspasa-3 a diferentes tiempos. Se observa, que a las 8 h, al igual que ocurría en los experimentos anteriores, comienza a reducirse la cantidad de procaspasas y aumentar

la cantidad de caspasa procesada, tanto de las iniciadoras como de las ejecutoras. Además se observa, en la Figura 4.10 B, que la inhibición de la caspasa 9 con LEHD, no evita la activación de la caspasa 8 ni el procesamiento de la proteína proapoptótica Bid, sobre todo a partir del tiempo 8 h. En cambio, la Figura 4.10 C, en las que las células se trataron con inhibidor de caspasa 8, no se observa activación de la caspasa-9 a las 8 h, sino que comienza a observarse esta activación a tiempo más largos. Estos resultados indican que la activación de la caspasa-8 ocurre antes y es necesaria para la activación de la caspasa-9.

4.4 Implicación de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por CX-4945

La principal vía apoptótica independiente de mitocondrias esta iniciada por la activación de receptores mortales como Fas o TRAIL-R tras la unión de sus ligandos, Apo2L/TRAIL y FasL, respectivamente (Aroui et al., 2009). Apo2L/TRAIL es un ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) capaz de inducir apoptosis, vía extrínseca, tras la unión a sus receptores mortales en membrana. Existen dos receptores de muerte pro-apoptóticos (DR4 y DR5, que contienen dominios DD (*Death Domain*) intracelulares implicados en la transducción de la señal y dos receptores señuelos (DcR1 y DcR2) funcionalmente inactivos, bien porque carecen del dominio DD (DcR1) o lo tienen mutado (DcR1) (Figura 1.4).

En algunos casos se ha propuesto que el efecto apoptótico de algunos fármacos antitumorales depende en parte de la producción autocrina de estos ligandos mortales (Quan Chen and Hussein 2001). Los resultados de la activación de caspasas parecían sugerir que este mecanismo podría estar implicado en la acción de CX-4945 en las células U266, por lo cual decidimos explorar esta vía.

4.4.1 Análisis de la expresión de Apo2L/TRAIL y FasL inducida por CX-4945.

Los resultados anteriores podrían indicar que CX-4945 induce la vía extrínseca a través de un bucle autocrino de ligandos mortales en las células U266. Por ello se decidió analizar la producción de TRAIL y la posible implicación de este sistema en la apoptosis inducida por CX-4945 en dichas células.

Se analizó la expresión de los principales ligandos mortales, tanto FasL como TRAIL, tras el tratamiento con CX-4945, en la línea de mieloma múltiple, U266. Las células se trataron con una concentración fija de CX-4945, 30 μ M, y se incubaron a diferentes tiempos, 0, 4, 8, 16, 24 horas.

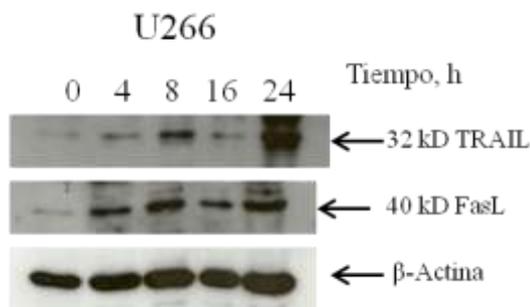


Figura 4.11.- Expresión de los ligandos mortales tras el tratamiento con CX-4945. La línea celular U266 se trató con 30 μ M de CX-4945 y se incubó a diferentes tiempos, 0, 4, 8, 16 y 24h. Transcurrido este tiempo, se realizaron los extractos de proteínas totales y se analizó la expresión de los ligandos mortales FasL y TRAIL mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de la muestra cargada se normalizó mediante la detección de la β -actina.

La Figura 4.11 muestra que tras el tratamiento con CX-4945, aumenta la expresión de los ligandos mortales, siendo a las 24 h, el aumento más significativo el ligando mortal TRAIL. A tiempos cortos, sin embargo se observó mayor inducción de FasL. Esto conduce a pensar, que tal vez, el CX-4945 aumente indirectamente la secreción de estos ligando por la propia célula y la activación de la vía extrínseca, como se ha descrito para otros fármacos (Quan Chen and Hussein 2001).

Para comprobar esta hipótesis, se comprobó la expresión de los receptores mortales y su acción en la muerte inducida por CX-4945.

4.4.2 Expresión de DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en la membrana plasmática de las células de mieloma.

La expresión en la membrana de receptores de TRAIL (DR4 y DR5) en las células U266 se analizó por citometría de flujo.

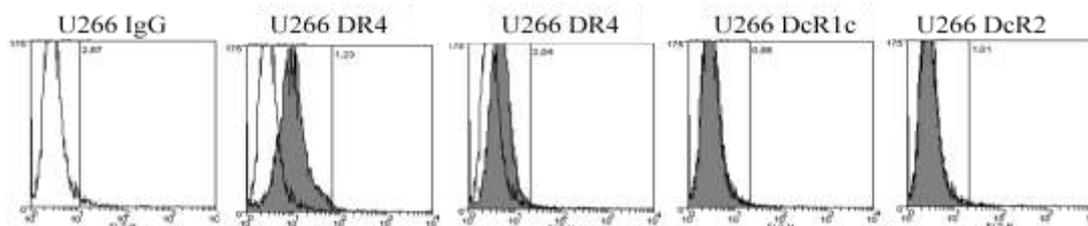


Figura 4.12.- Expresión en la membrana de los receptores Apo2L/TRAIL. Las células U266 (2×10^5 células) se incubaron con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-DR4-PE, anti-DR5-PE, anti-DcR1-PE o anti-DcR2-PE. Como control de usó una IgG1-PE de ratón. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo.

El análisis mostró que las células U266 expresaban ambos receptores, siendo la expresión mayor para el receptor DR4 que para el DR5. Estos datos confirman los obtenidos en el artículo (Gómez-Benito María 2007) y demuestran que las células U266 utilizadas en este trabajo no han perdido la expresión de los receptores de TRAIL.

4.4.3 Contribución de DR4 y DR5 a la señal apoptótica por Cx-4945.

Para determinar la contribución de los receptores mortales a la transducción de la señal apoptótica inducida por CX-4945 en la línea celular U266, se utilizaron quimeras recombinantes solubles específicas para cada receptor, Fc-R1 (DR4), Fc-R2 (DR5) y anti-FasL (Fas-Fc^γ), las cuales interactúan con TRAIL y FasL, previniendo la interacción a sus respectivos receptores.

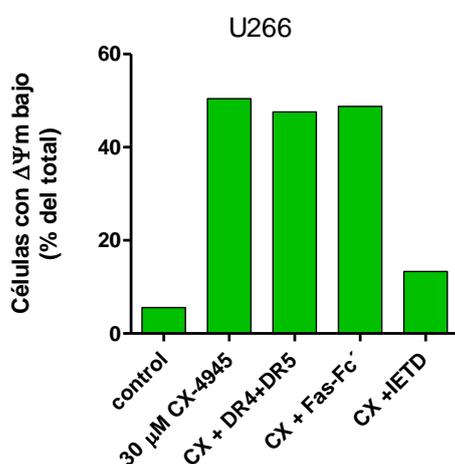


Figura 4.13.- Contribución de DR4, DR5 y FasR a la apoptosis inducida por CX-4945. Las células U266 se trataron con 30 μ M de CX-4945 en combinación de las quimeras DR4 y DR5, la quimera de Fas, y como control, con inhibidor de la caspasa 8, IETD. Pasada las 24 horas se analizó por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos indicaron que ninguna de las quimeras utilizadas redujo la apoptosis inducida por CX-4945. Esto puede deberse a dos hechos, primero, a que las quimeras no hayan funcionado correctamente, o segundo, que realmente no se lleve a cabo la activación de la vía extrínseca por TRAIL.

Para comprobar si las células U266 son sensibles a la vía Fas y si la quimera funcionaba correctamente, se procedió al siguiente experimento, en el que las células se trataron con tres concentraciones diferentes de CH11, un anticuerpo monoclonal anti-Fas, que tiene función agonista sobre las células, produciendo apoptosis. Además, se combinó este anticuerpo con Fas-Fc, la quimera de Fas, el cual se une a CH11, impidiendo la unión al receptor y la posterior activación.

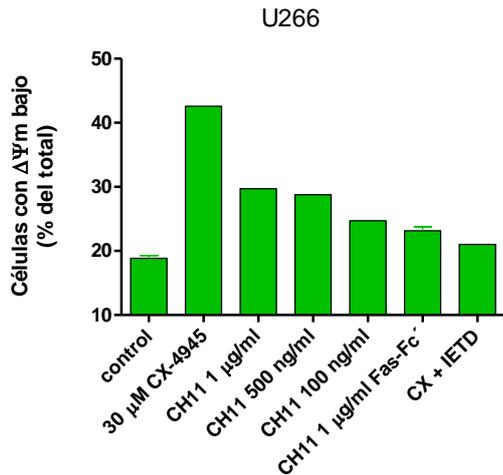


Figura 4.14.- Sensibilidad al anticuerpo citotóxico anti-Fas (CH11). Las células U266 se trataron con diferentes concentraciones de CH11, con CH11 a concentración fija, en combinación con Fas-Fc' y con el inhibidor de caspasa-8. Pasado el tiempo de incubación se analizó por citometría de flujo.

En la Figura 4.14 se observa que el tratamiento de las células U266 con CH11 provoca una caída del potencial mitocondrial menor que la producida por el tratamiento con 30 μ M de CX-4945 indicando que estas células son moderadamente sensibles a la vía Fas. Además se observó que la quimera de Fas (Fas-Fc'), reduce parcialmente la apoptosis inducida por CH11. En conjunto estos resultados, parecen indicar que la vía Fas funciona correctamente en las células U266, pero no contribuye al efecto tóxico de CX-4945. En cuanto a la vía TRAIL, estudios previos del grupo había demostrado la sensibilidad de las células a este ligando (Gómez-Benito María 2007), pero los resultados con las quimeras (Figura 4.13) parecen descartar que esta vía contribuya a la apoptosis inducida por CX-4945. Por lo tanto, la activación de la caspasa-8 observada en las primeras etapas del tratamiento con este fármaco podría estar provocada bien por la trimerización de los receptores en ausencia de sus ligandos (Mundle SD 2002), bien por otra vía como la formación del ripoptosoma en la que también se ha descrito que se activa esta caspasa-8.

4.5 Análisis del uso potencial del CX-4945 en terapia combinada

En la práctica habitual se suelen emplear combinaciones de fármacos con diferentes dianas terapéuticas para obtener mejores resultados y evitar la aparición de células resistentes y las recaídas. En este trabajo se ha analizado el efecto citotóxico del CX-4945 combinado con un fármaco inhibidor específico del mTOR, el PP242.

Se estudió el efecto de dos concentraciones fijas del inhibidor de mTOR (PP242) en combinación con concentraciones crecientes de CX-4945, en dos líneas celulares del mieloma múltiple, U266 y NCI-H929, para analizar si el CX-4945 tenía algún efecto sinérgico en la apoptosis inducida por PP242.

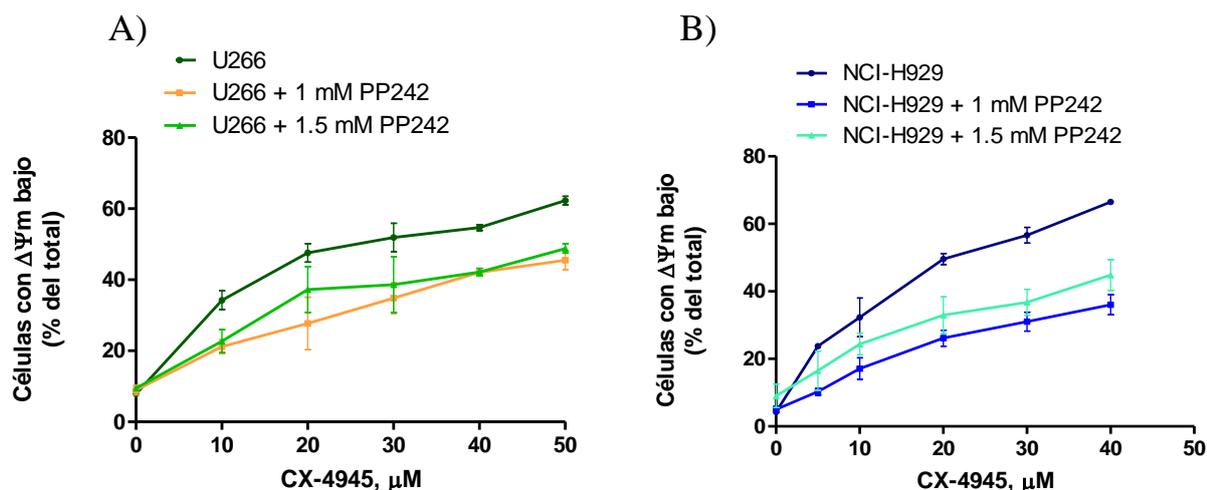


Figura 4.16.- Efecto de la combinación del tratamiento en las células de mieloma múltiple de PP242 (48h) seguido de CX-4945 (24h). Las dos líneas celulares se incubaron 24h con dos concentraciones fijas de PP242 seguidas de 24 h mas con concentraciones crecientes de CX-4945. Después de 48 h de incubación se midió la caída del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$), en las líneas celulares U266 (A), y en NCI-H929 (B). Los resultados son la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Como muestra la Figura 4.16, en ambas líneas celulares, la adición del inhibidor del mTOR en combinación con CX-4945 reduce, de manera significativa, la acción apoptótica del CX-4945 sin combinar.

La hipótesis inicial era que puesto PP242 inhibe mTOR y CX-4945 inhibe CK2, la combinación de ambos produciría un aumento de la apoptosis. Sin embargo, los resultados obtenidos indican claramente que PP242 tiene un efecto antagónico con el de CX-4945. En estudios recientes se ha demostrado que el bloqueo de mTOR resulta en una retroalimentación negativa que activa las vías de supervivencia Akt y Ras/Raf/MEK/ERK lo que podría reducir la apoptosis (Carracedo Arkaitz 2008). Puesto que la molécula CK2 está implicada en la activación de dichas vías, al ser inhibida por CX-4945, se reduciría la supervivencia y se aumentaría la apoptosis. Nuestros resultados parecen indicar sin embargo que la combinación de ambos inhibidores prevalece el posible efecto protector de PP242 sobre la inhibición de las vías de señalización por el CX-4945.

5. CONCLUSIONES

- El CX-4945 es capaz de inducir apoptosis en todas las líneas celulares de mieloma múltiple analizadas.
- A las 8 horas de incubación de las líneas de MM con CX-4945 comienza a caer el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y exponerse la fosfatidilserina, siendo máximo estos fenómenos a las 24 h o 48 h, dependiendo de la línea celular.
- La sobreexpresión de las proteínas Mcl-1 y bcl-xL no es suficiente para evitar completamente la muerte en la línea celular RPMI 8226 tras el tratamiento con CX-4945.
- En todas las líneas celulares del mieloma múltiple, excepto MM.1S, se reduce con el inhibidor general de caspasas, Z-VAD-fmk, la apoptosis inducida por CX-4945.
- La necroptosis podría contribuir parcialmente a la muerte inducida por CX-4945 en las líneas MM.1S y NCI-H929.
- Las líneas celulares de mieloma múltiple U266 y RPMI 8226, la apoptosis inducida por CX-4945 es dependiente de caspasas, y que la caspasa-8 parece ser la iniciadora.
- El tratamiento con CX-4945 en la línea celular MM.1S induce apoptosis independiente de caspasas, aunque estas no están inactivadas
- El tratamiento con CX-4945 induce la expresión de Apo2L/TRAIL y FasL.
- La unión de estos ligandos a sus receptores mortales no contribuye significativamente la apoptosis inducida por CX-4945.
- La combinación de los inhibidores de mTOR de nueva generación con CX-4945 disminuye la actividad citotóxica de esta droga.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Almagro M.C, V. D. (2012). "The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy." Exp Onco **34**(3): 200-211.
- Alnemri ES, L. D., Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell Death Differ **87**: 171.
- Ashkenazi A., D. V. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**: 1305-1308.
- Boatright KM, D. C., Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS. (2004). "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)." Biochem **382**: 651-657.
- Bommert K, B. R., Stuhmer T. (2006). "Signaling and survival pathways in multiple myeloma." Eur J Cancer **42**: 1574-1580.
- Borgo C, C. L., Salizzato V, Ruzzene M, Massimino ML, Pinna LA, Donella-Deana A. (2013). "Aberrant signalling by protein kinase CK2 in imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells: biochemical evidence and therapeutic perspectives." Mol Oncol **7**(6): 1103-15.
- Brian, G. M. a. D., M.D (2006). "Concise Review of the disease and treatment options." International Myeloma Foundation Publications.
- Buontempo F, O. E., Martins LR, Antunes I, Lonetti A, Chiarini F, Tabellini G, Evangelisti C, Melchionda F, Pession A, Bertaina A, Locatelli F, McCubrey JA, Cappellini A, Barata JT, Martelli AM (2013). "Cytotoxic activity of the casein kinase 2 inhibitor CX-4945 against T-cell acute lymphoblastic leukemia: targeting the unfolded protein response signaling." Leukemia: 1-11.
- Carracedo Arkaitz, B. J., and Pandolfi Pier Paolo (2008). "Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors." Cell Cycle. **7**(24): 3805–3809. **7**(24): 3805-3809.
- Clancy Lauren, M. K., Archer Kristinn, Woelfel Melissa , Mongkolsapaya Juthathip, Screaton Gavin, J. Lenardo Michael, and Ka-Ming Chan Francis (2005). "Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18099-104.
- Conradt B, X. D. (2005). "Programmed cell death." WormBook **6**: 1-13.
- Crook NE, C. R., Miller LK. (1993). "An apoptosis -inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**: 2168-2174.
- Daniel Nika N, K. S. J. (2004). "Cell Death: Critical control points." Cell **116**: 205-2019.
- de la Puente Pilar, M. B., Azab Feda, Luderer Micah, and Azab Abdel Kareem (2014). "Molecularly Targeted Therapies in Multiple Myeloma." Hindawi Publishing Corporation
- Fonseca R, B. P., Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, Morgan G, Van Ness B, Chesi M, Minvielle S et al. (2009). "International Myeloma working group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review." Leukemia **23**: 2210-2221.
- Galluzzi Lorenzo, K. O. a. K. G. (2009). "RIP Kinases initiate programmed necrosis." Journal of Molecular Cell Biology **1**: 8-10.
- García-Sanz, R. (2006). "Thalidomide in multiple myeloma." Expert Opin Pharmacother **7**(2): 195-213.

- Gómez-Benito María, M.-L. M. J., Anel Alberto, Marzo Isabel, Naval Javier (2007). "Membrane expression of DR4, DR5 and caspase-8 levels, but not Mcl-1, determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL." Experimental cell Research **313**: 2373-2399.
- Gómez Benito, M. (2006). "Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor de farnesil-transferasas BMS-214662, Apo2L/TRAIL e Interferón -alfa en el mieloma múltiple humano. Aplicaciones Terapéuticas." Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias.
- Green, S. T. a. D. (2008). "Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut." Oncogene **27**: 6452-6461.
- Kerr J. F. R. , W. A. H., and Currie A. R (1972). "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kimberley FC, S. G. (2004). "Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors." Cell Res **14**: 359-372.
- Kroemer G, G. L., Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **3**: 3-11.
- Ku Jeong Min, P. J. W., Ryu Byng Jun, Son Young-Jin, Kim Seong Hwan and Lee Sang Yeol (2013). "CK2 inhibitor induces sequential inactivation of proteins in the signaling pathways related with cell migration and suppresses metastasis of A549 human lung cancer cells." bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **23**: 5609-5613.
- L Galluzzi, I. V., J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, T M Dawson, V L Dawson, W S El-Deiry, S Fulda, E Gottlieb, D R Green, M O Hengartner, O Kepp, R A Knight, S Kumar, S A Lipton, X Lu, F Madeo, W Malorni, P Mehlen, G Nuñez, M E Peter, M Piacentini, D C Rubinsztein, Y Shi, H-U Simon, P Vandenabeele, E White, J Yuan, B Zhivotovsky, G Melino, and G Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." Cell Death Differ **19**(1): 107-120.
- Laubach JP, R. P., Anderson KC (2010). "The evolution and impact of therapy in multiple myeloma." Med Oncol **27** (1): S1-6.
- Lavrik Inna N, G. A., KrammerPeter H. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death." J Clin Invest **115**(10): 2665-2672.
- Leif, K. W. M. B. P. (2002). "Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions." Nature Reviews Cancer **2**: 175-187.
- López-Royuela Nuria, B. P., Galán-Malo Patricia, Anel Alberto, Marzo Isabel, Naval Javier (2010). "Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells." Elsevier **1803**(2): 311-322.
- López-Royuela Nuria, P.-G. P., Galán-Malo Patricia, J YusteVictor, Anel Alberto, A Susín Santos, Naval Javier, Marzo Isabel (2010). "Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells." Biochemical pharmacology **79**(12): 1746-58.
- Mace PD, S. S., Day CL (2010). "Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins." Cell Death Differ **17**: 46-53.

- Martinez-Lorenzo MJ, A. A., Gamen S, Monle NL, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Alava MA, Naval J. (1999). "Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles." J Immunol **163**: 1274-1281.
- Mueller, T. B. a. C. (2003). "Apoptosis in disease: about shortage and excess." Essays Biochem **39**: 119-130.
- Mundle SD, R. A. (2002). "Defining the dynamics of self-assembled Fas-receptor activation." Trends Immunol **23**(4): 187-94.
- Piazza F1, M. S., Ruzzene M, Pinna LA, Gurrieri C, Semenzato G. (2012). "Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways." Leukemia **26**(6): 1174-9.
- Pierre F, C. P., O'Brien SE, Siddiqui-Jain A, Bourbon P, Haddach M, Michaux J, Nagasawa J, Schwaebe MK, Stefan E, Vialettes A, Whitten JP, Chen TK, Darjania L, Stansfield R, Bliesath J, Drygin D, Ho C, Omori M, Proffitt C, Streiner N, Rice WG, Ryckman DM, Anderes K. (2011). "Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer." Mol Cel Biochem **356**: 37-43.
- Quan Chen, B. G., Ashraf S. Mahmoud-Ahmed, Aimin Zhou, Eric D. Hsi, Mohamad and a. A. A. Hussein (2001). "Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma." Blood **98**(7): 2183-92.
- Quotti Tubi Laura, G. C., Brancalion Alessandra, Bonaldi Laura, Bertorelle Roberta, Manni Sabrina, Pavan Laura, Lessi Federica, Zambello Renato, Trentin Livio, Adami Fausto, Ruzzene Maria, Pinna Lorenzo A, Semenzato Gianpietro and Piazza Francesco (2013). "Inhibition of protein kinase CK2 with the clinical-grade small ATP-competitive compound CX-4945 or by RNA interference unveils its role in acute myeloid leukemia cell survival, p53-dependent apoptosis and daunorubicin-induced cytotoxicity." Jounal of Hematology & Oncology **6**: 78.
- Rajkumar, S. (2011). "Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management." Am J Hematol **87**: 78-88.
- Ramirez Labrada, A. G. (2013). "Mecanismo de la apoptosis inducida por el inhibidor de las quinasas Sorafenib en células de mieloma humano." Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias.
- Roset Ramon, O. L., Gil-Gomez Gabriel (2007). "Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice." Frontiers in Bioscience **12**: 4722-4730.
- S.Nagata (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**: 355-365.
- Safa, A. (2012). "c-FLIP, a ,master anti-apoptotic regulator." Exp.Oncol **34**(3): 176-84.
- Savill J, F. V. (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-788.
- Shibue T, T. T. (2006). "BH3-only protein:integrated control point of apoptosis." Int J Cancer **119**: 2036-2043.
- Son YH, S. J., Kim SH, Kim J. (2013). "Pharmacokinetic characterization of CK2 inhibitor CX-4945." Arch Pharm ResJul **36**(7): 840-845.
- Ting Pan, S. W., Xin He, Haihua Luo, Yijun Zhang, Miaomiao Fan, Guannan Geng, Vivian Clarke Ruiz, Jim Zhang,Lisa Mills,Chuan Bai mail, Hui Zhang mail (2014). "Necroptosis Takes Place in Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected CD4+ T Lymphocytes." PLoS ONE **9**(4).

- Vandenabeele P, G. L., Vanden Berghe T, Kroemer G (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Bio **11**: 700-714.
- Vasalli, P. (1992). "The pathophysiology of tumor necrosis factors." Annu Rev Immunol **10**: 411-452.
- Xiao-Fang Tian, M.-X. C., Shi Wei Yang, Yu-Jei Zhou and Da-Yi Hu (2013). "Cell Death, dysglycemia and myocardial infarction." Biomedical Reports **1**(3): 341-346.
- Zanin Sofia, B. C., Girardi Cristina, O'Brien Sean E., Miyata Yoshihiko, Pinna Lorenzo A., Donella-Deana Arianna, Ruzzene Maria (2012). "Effects of the CK2 Inhibitors CX-4945 and CX-5011 on Drug-Resistant Cells ".