



**Universidad**  
Zaragoza

# Estudio de la muerte inducida por el inhibidor de CDKs Dinaciclib en células de mieloma múltiple

---

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autora:**

Ángela de Benito Bueno

**Directores:**

José Javier Naval Iraberri

Diego de Miguel Samaniego

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias





**Universidad**  
Zaragoza

D. José Javier Naval Iraberri, Profesor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y D. Diego de Miguel Samaniego, Investigador del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Estudio de la muerte inducida por el inhibidor de CDKs Dinaciclib en células de mieloma múltiple” ha sido realizado por **Ángela de Benito Bueno** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado y que cumple los objetivos recogidos en las Directrices de TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Junio 2016

Fdo: José Javier Naval Iraberri

Fdo: Diego de Miguel Samaniego



## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	1
ANTECEDENTES.....	2
INTRODUCCIÓN .....	4
MIELOMA MÚLTIPLE.....	4
MUERTE CELULAR.....	4
CDKs Y DINACICLIB.....	7
OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
LÍNEAS CELULARES .....	11
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	11
TINCIÓN CON HOESCHT 33342 Y VISUALIZACIÓN.....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN GENERAL.....	19
CONCLUSIONES .....	22
CONCLUSIONS.....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23



## RESUMEN

### RESUMEN

El mieloma múltiple es una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolada de células B monoclonales que se acumulan en la médula ósea donde proliferan de forma lenta pero con una alta supervivencia. Diversos tratamientos se encuentran disponibles hoy en día, pero la enfermedad sigue siendo incurable ya que la inestabilidad característica de esta neoplasia hace que las células se vuelvan resistentes a las señales apoptóticas mediante diversos mecanismos.

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son reguladores positivos de la progresión del ciclo celular, lo que las convierte en una diana oncológica prometedora debido a la desregulación del ciclo celular que se observa en el desarrollo del cáncer. El dinaciclib es una potente molécula inhibidora de diversas CDKs, razón por la cual se ha propuesto como un prometedor fármaco para el tratamiento del mieloma múltiple.

En este trabajo fin de grado se ha estudiado el efecto citotóxico y la capacidad que presenta el dinaciclib para inducir apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple. Además, se ha evaluado la combinación de dinaciclib con otros fármacos como idelalisib (CAL-101) y dos formulaciones de la proteína TRAIL (soluble y acoplado a nanopartículas lipídicas) para explorar posibles mecanismos de sensibilización.

### ABSTRACT

Multiple myeloma is a B-cell malignancy characterized by the accumulation of malignant plasma cells within the bone marrow, where they proliferate slowly and show an extended lifespan. Some treatments are available nowadays but the disease remains incurable. There is an urgent need for novel therapies, since myeloma cells become resistant to the apoptotic signals triggered by the therapeutic agents used so far in the clinic.

Cyclin dependent kinases (CDK) are key positive regulators of cell cycle progression and so they are attractive targets in oncology since the dysregulation of the cell cycle is a common feature of cancer's development. Dinaciclib is a strong and novel small molecule inhibitor of multiple cyclin-dependent kinases and could be a potential drug for the treatment of multiple myeloma.

During the present final project thesis, the ability to activate apoptosis and the cytotoxic effect of Dinaciclib in multiple myeloma cell lines has been studied. Furthermore, combination of Dinaciclib with other agents such as Idelalisib (CAL-101) and two formulations of TRAIL (soluble and liposome-bound TRAIL) was also explored in order to identify sensitization mechanisms and possible synergisms.

## ANTECEDENTES

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANNV (Annexin V Alexa Fluor 647 Conjugate)
- Apo2L/TRAIL (Apo2 Ligand // TNFrelated apoptosis inducing ligand)
- Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)
- CARD (Caspase recruitment domain)
- CDKs (Cycline-dependent kinase)
- cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein)
- DD (Death domain)
- DED (Death effector domain)
- Din(Dinacilib)
- DISC (Death inducing signaling complex)
- DR4 (Death Receptor 4 // Death Receptor of TRAIL 1)
- DR5 (Death Receptor 5 // DeathReceptor of TRAIL 2)
- EDTA (ácido etildiaminotetraacético)
- FADD(Fas-Associated protein with Death Domain)
- IAPs (Inhibitors of apoptosis proteins)
- LUV (Large unilamellar vesicle)
- LUV-TRAIL (LUV con TRAIL acoplado a su superficie)
- Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein)
- MTT ( 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1)
- PI(Propidium Iodide)
- PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinases)
- Smac/DIABLO (Second mitochondriaderived activator of caspases // Direct)
- sTRAIL (TRAIL soluble)
- TMRE (Tetramethylrhodamine Ethyl Ester Perchlorate)
- TNF (Tumor necrosis factor)
- TRAIL-His6 (TRAIL soluble con cola de 6 histidinas, es sTRAIL)
- UPR (Unfolded Protein Response)
- XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

## ANTECEDENTES

En los años 60 del siglo pasado, la combinación de los fármacos melfalán (agente alquilante) y prednisona (glucocorticoide) fue introducida como primer tratamiento de quimioterapia para el mieloma múltiple. Este tratamiento fue hasta hace pocos años un tratamiento estándar y aún se utiliza en personas de avanzada edad. [1]

Sin embargo, el tratamiento del mieloma múltiple ha cambiado mucho en la última década con la introducción de dos nuevos agentes terapéuticos: los inhibidores del proteasoma y los fármacos inmunomoduladores (IMiDs).

La inhibición del proteasoma mediante fármacos como el bortezomib produce una acumulación de proteínas disfuncionales en la célula, lo que da lugar a la inducción de muerte celular por apoptosis [2]. Por otro lado, los IMiDs son compuestos análogos a la talidomida (una ftalimida sintética), con propiedades anti-angiogénicas y anti-inflamatorias que disminuyen la proliferación de las células B malignas y la producción de citoquinas [3].

Gracias a estos fármacos de nueva generación los pacientes de mieloma múltiple han aumentado muy significativamente su esperanza de vida. Sin embargo, estos nuevos fármacos no consiguen eliminar los clones malignos de células B, lo que subraya la necesidad de nuevos agentes terapéuticos [4]. En esta situación, cobran cada vez más importancia los estudios de caracterización de los mecanismos moleculares que controlan la supervivencia y proliferación de las células de mieloma múltiple para que las principales proteínas implicadas puedan ser utilizadas como dianas para el desarrollo de estos nuevos fármacos.

## ANTECEDENTES

Un fenómeno característico de las neoplasias, observado también en las células de mieloma múltiple, es la desregulación de los sistemas de control del ciclo celular producidos principalmente por la pérdida de función fisiológica de la familia de proteínas CDKs, proteínas reguladoras críticas del progreso del ciclo celular. De esta forma, las células tumorales evitan los sistemas de control celulares frente a daños en el DNA u otros daños fisiológicos favoreciendo la proliferación de las células tumorales. La inhibición de la actividad de las CDKs se ha propuesto, en consecuencia, como alternativa prometedora para el tratamiento del mieloma múltiple [5, 6].

En los últimos años se han desarrollado inhibidores de las CDKs, como el flavopiridol, fármaco de naturaleza flavonoide que compite por el ATP en el sitio activo de las CDK, induciendo de esta forma el arresto del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis. [7] Desafortunadamente, el flavopiridol no ha demostrado actividad clínica significativa, a pesar de haber demostrado una potente actividad en líneas celulares de mieloma múltiple [8]. Recientemente se ha introducido un inhibidor de mayor especificidad que los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas de primera generación. La mejora de especificidad se traduce en una disminución de los efectos secundarios adversos.

Este fármaco, el dinaciclib, ha sido evaluado en ensayos clínicos de fase I en pacientes de leucemia linfocítica crónica, donde ha mostrado un índice terapéutico favorable, lo que justifica su desarrollo adicional como candidato potencial para su uso en clínica [9]. Además, se han desarrollado estudios de fase I/II en pacientes con mieloma múltiple en los que se han obtenido resultados prometedores para su utilización en combinación con otros fármacos. En estos ensayos clínicos se ha demostrado actividad del dinaciclib como monoterapia para pacientes de mieloma múltiple refractario en los que se consiguió una disminución o estabilización de la secreción de proteína M, marcador característico del mieloma múltiple [4].

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, en este trabajo fin de grado se ha analizado el mecanismo de la acción anti-neoplásica del inhibidor de CDKs Dinaciclib en células de mieloma múltiple humanas, planteándonos los siguientes objetivos:

1. Evaluar la citotoxicidad del fármaco Dinaciclib en células de mieloma múltiple, concretamente en las líneas celulares MM.1S y RPMI 8226 y caracterizar el tipo de muerte que el dinaciclib pudiese inducir sobre las células de mieloma múltiple.
2. Explorar las posibles combinaciones de dinaciclib con otros potenciales agentes antitumorales como el inhibidor de PI3K Idelalisib (CAL-101) o la proteína recombinante TRAIL para sensibilizar la apoptosis, buscando así una posible actuación de forma sinérgica con Dinaciclib sobre las células de mieloma múltiple.

## INTRODUCCIÓN

### INTRODUCCIÓN

#### MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad hematológica causada por la proliferación maligna de células plasmáticas monoclonales que conlleva su expansión y acumulación en la médula ósea. Constituye el 10% de los tipos de cáncer que afectan a la línea hematopoyética y se caracteriza por una marcada inestabilidad cromosómica.[10]

El tratamiento de la enfermedad mediante quimioterapia reduce en la mayoría de los casos la carga tumoral, pero la enfermedad es todavía incurable, con una supervivencia media de en torno a seis años.[11]. El hecho de que se trate de una enfermedad sin cura ha determinado que sea necesario el estudio de nuevos fármacos que tengan una buena respuesta causando los menores efectos secundarios posibles.[12]

La médula ósea juega un papel muy importante en el desarrollo de esta neoplasia, ya que presenta el ambiente idóneo para la proliferación celular, la supervivencia de las células plasmáticas malignas y su resistencia a los fármacos.

#### MUERTE CELULAR

El primer ser vivo en el que se descubrió este fenómeno fue en el nemátodo *C.elegans*, gracias al cual se descubrió un mecanismo homeostático mediante el cual las células infieren su propia muerte. Este proceso es esencial en los organismos eucariotas ya que permite el mantenimiento de los tejidos así como la eliminación de células dañadas o infectadas por algún microorganismo.[13]

Hay diversos criterios establecidos por el NCCD (Nomenclature Comitee on Cell Death) a tener en cuenta para determinar que una célula está muerta. Atendiendo a estos postulados es posible clasificar el tipo de muerte celular atendiendo a aspectos bioquímicos, funcionales e inmunológicos. La NCCD ha clasificado los diferentes tipos de muerte celular, siendo los más importantes la apoptosis, la muerte celular asociada a autofagia y la necroptosis.[14]

#### APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Se denomina apoptosis al conjunto de cambios morfológicos asociados a este tipo de muerte, entre los que se encuentran la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la contracción del citoplasma celular, la formación de “blebbings” o burbujas en la membrana plasmática y la formación de los cuerpos apoptóticos. El conjunto de todos los eventos citados conlleva la muerte celular.[15]

La apoptosis puede iniciarse en respuesta a estímulos diversos como la presencia de radicales libres de oxígeno, radiaciones, fármacos, ausencia de factores de crecimiento o daño al DNA. [16] Defectos en la muerte celular apoptótica pueden contribuir a la aparición de diversas patologías como cáncer, fallos cardíacos, enfermedades autoinmunes y neurodegeneración. [17]

## INTRODUCCIÓN

### CASPASAS

---

Las moléculas efectoras en este proceso son principalmente una familia citoplasmática de cisteína-proteasas denominadas caspasas, responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan este fenómeno. Se han identificado más de una docena de caspasas en la especie humana y dos tercios de ellas han sido relacionadas con los mecanismos apoptóticos. [18]

Las caspasas se presentan en células sanas como zimógenos, precursores inactivos de la forma efectora de la proteasa [19]. Las caspasas involucradas en la apoptosis se dividen en dos categorías, las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Las caspasas iniciadoras se caracterizan por poseer un prodominio N-terminal de alrededor de 90 aminoácidos que contiene motivos reguladores como el dominio efector de muerte (DED) presente en las caspasas 8 y 10 y el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) en las procaspasas 2 y 9. [20] En cambio, las caspasas efectoras contienen 20-30 residuos en el prodominio N-terminal. [21].

Además del prodominio N-terminal, las caspasas contienen un dominio catalítico compuesto por la subunidad pequeña p10 (10-12 kDa) y la subunidad grande p20 (17-20 kDa). La activación de las caspasas efectoras se produce por una caspasa iniciadora (activada previamente por autocatálisis) mediante el corte proteolítico en un residuo de aspártico interno que escinde el zimógeno liberando las dos subunidades p10 y p20. Finalmente, la caspasa activada forma un heterotetrámero que consiste en dos p10/p20 heterodímeros y dos sitios activos.

### PROTEÍNAS REGULADORAS: LA FAMILIA BCL-2

---

La familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma-2 proteins) tiene un papel esencial en la regulación de la apoptosis por la vía intrínseca, ya que regula la liberación del citocromo c de las mitocondrias. La familia Bcl-2 se subdivide en tres familias, que contienen entre uno y cuatro dominios de homología BH denominados BH1, BH2, BH3 y BH4.

- Proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-W, Bcl-B y A1. Contienen los cuatro dominios BH.
- Proteínas proapoptóticas multidominio: Bax y Bak, contienen tres dominios BH.
- Proteínas sólo-BH3: Bid, Bad, Puma, Noxa, Bmf, Hrk y Bik. Sólo contienen un dominio, BH3, como su propio nombre indica.

Las proteínas antiapoptóticas, como su propio nombre indica, inhiben la apoptosis. Contienen un dominio hidrofóbico que les permite permanecer unidas a estructuras membranosas, como el retículo endoplasmático, la membrana nuclear y la membrana externa mitocondrial. [22] La estructura tridimensional de esta subfamilia genera un núcleo hidrofóbico interno que permite interaccionar con las proteínas sólo-BH3, lo que impide la oligomerización de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak.

La subfamilia sólo-BH3 actúa inhibiendo mediante interacción directa con proteínas antiapoptóticas, o proteínas multidominio. Se puede discernir entre proteínas sensibilizadoras, ya que únicamente interactúan con proteínas antiapoptóticas y activadoras directas, que interaccionan con las antiapoptóticas pero también con Bax y Bak induciendo así la apoptosis. [23]

## INTRODUCCIÓN

Por último, las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak promueven la apoptosis mediante la formación del poro mitocondrial. Estas proteínas son activadas en los primeros estadios de la apoptosis mediante interacción con proteínas sólo-BH3, lo que genera la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, liberando las proteínas del espacio intermembrana del orgánulo.[24]

Existen dos vías para la activación de las caspasas, denominadas vía intrínseca y vía extrínseca. Ambas rutas confluyen en la activación de las caspasas efectoras, responsables de la proteólisis que genera la muerte celular.[24].

### VÍA INTRÍNSECA

---

También denominada vía mitocondrial. Se desencadena a partir de malfunciones irreversibles intracelulares como daño irreparable en el DNA. Estas alteraciones son detectadas por las mitocondrias que provocan la activación de la apoptosis. La caída del potencial de la membrana mitocondrial es considerado el punto de no-retorno de la cascada de la muerte celular apoptótica. [25]

Ante estas situaciones de estrés celular se activan varios miembros de la familia sólo-BH3, lo que produce la inhibición de las proteínas antiapoptóticas y la formación del poro mitocondrial (MOMP, Mitochondrial Outer Membrane Pore) por la dimerización en la membrana externa mitocondrial de Bax y Bak. Este poro mitocondrial permite la salida al citoplasma de proteínas apoptogénicas como Smac/Diablo, el citocromo c o AIF (Apoptosis Inducing Factor).

En el citosol, el citocromo c induce la formación del macrocomplejo denominado apotosoma, que está formado por un heptámero de la proteína adaptadora Apaf-1(Apoptosis protease activating factor 1) que se une estequiométricamente a la procaspasa 9 y al propio citocromo c. El ensamblaje de dicho complejo molecular permite la activación de la caspasa 9 que activará a su vez a la caspasa ejecutora 3, la cual proteolizará diferentes sustratos en el citosol. [24]

El efecto apoptótico en esta ruta se optimiza mediante la liberación desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma de la proteína Smac/Diablo, que se une a proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), y en particular a XIAP, proteína que se une por defecto a las caspasas 3, 7 y 9 inhibiéndolas basalmente. Mediante su unión a estas IAPs Smac/Diablo permite actuar a las caspasas. [17]

### VÍA EXTRÍNSECA

---

Esta ruta comienza con la activación de receptores mortales anclados en la membrana celular como el receptor del TNF (Tumour Necrosis Factor) o Fas por unión a sus respectivos ligandos. Cuando estos receptores se unen a su ligando se produce la oligomerización de receptores que reclutan en la región citoplasmática proteínas adaptadoras FADD (Fas Associated Death Domain) a través de sus respectivos dominios DD (Death Domains) [18]

Estas proteínas adaptadoras a su vez reclutan monómeros de procaspasa 8 y procaspasa 10 por interacción de los respectivos dominios DED. Este complejo citoplasmático que se genera se denomina DISC (Death Inducing Signal Complex). Es en este momento cuando las caspasas

## INTRODUCCIÓN

iniciadoras se activan por autoproteólisis, lo que permite que estas activen a sus sustratos, las caspasas ejecutoras 3 y 7 que producirán el desmantelamiento de la célula [24]

La regulación de la formación del DISC se realiza por una proteína citosólica denominada c-FLIP (FADD-Like Interleukin-1-β-converting enzyme- Inhibitory Protein), que presenta una estructura análoga a la caspasa 8 y compite con ella bloqueando así la activación de la caspasa 8. [18]

Cabe añadir que existe una conexión entre ambas vías a nivel de la activación de la caspasa 3. La proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 denominada Bid sufre un corte proteolítico por acción de la caspasa 8, que la activa. La forma truncada de Bid (tBid, truncated Bid) se transloca a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c al citoplasma. [26]

## CDKs Y DINACICLIB

La familia de proteínas formada por las serin-treonin quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, Cyclin Dependent Kinase) juega un papel muy importante en la célula a dos niveles. En primer lugar, estas proteínas regulan la progresión del ciclo celular, controlando de forma específica el paso entre las distintas fases del ciclo. En segundo lugar, regulan la transcripción génica a nivel de la RNA polimerasa II. Las CDKs forman generalmente heterodímeros con otra familia proteica, las ciclinas, para crear un complejo activo ciclina-CDK. [27]

En la regulación del ciclo celular intervienen principalmente las CDKs CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6. Dichas proteínas se unen a sus correspondientes ciclinas para controlar el paso entre las distintas fases del ciclo. La ciclina E/CDK2 regula la entrada en la fase S del ciclo desde G<sub>1</sub>, mientras que el heterodímero ciclina A/CDK2 se forma antes de salir de la fase de síntesis del DNA. [5]

Las CDKs regulan además la transcripción mediante la fosforilación del dominio carboxiterminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II. Este dominio contiene varias repeticiones de motivos susceptibles de fosforilación ricos en serinas, treoninas y tirosinas. Los complejos proteicos ciclina H/CDK7 y ciclina T/CDK9 son los más importantes en la realización de esta función mediante la fosforilación de la RNA polimerasa II activan la iniciación de la transcripción y la elongación transcripcional respectivamente. La actividad de la RNA polimerasa II se encuentra regulada durante el ciclo celular en función del grado de fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II. [28, 29]

El complejo ciclina T/CDK9 produce la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II de forma que recluta el factor de elongación denominado pTEFb (positive transcription elongation factor b).. [30] Por otra parte, CDK7, también denominada p40, desempeña un papel dual en la célula: Así, CDK7 está involucrada en el control transcripcional mediante la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II y además fosforila diversas CDKs reguladoras del ciclo celular. CDK7 es un componente del complejo trimérico CAK (CDKs Activating Kinase) que genera la activación del factor de transcripción general TFIIH (transcription factor II H), esencial en la iniciación de la transcripción. Además, interviene en la regulación del ciclo celular por fosforilación de las ciclinas CDK1 y CDK2, imprescindibles para la progresión del ciclo celular.[31]

Un fenómeno característico de las neoplasias es la desregulación de los sistemas de control del ciclo celular producida principalmente por la pérdida de función fisiológica de las CDKs. De esta forma, las células cancerosas evitan los sistemas de control celulares frente a daños en el DNA o a otros daños fisiológicos favoreciendo la proliferación de las células tumorales. [5]

## INTRODUCCIÓN

En el caso particular del mieloma múltiple se produce la desregulación del ciclo celular por la alteración de diversas ciclinas, y de una forma más evidente la ciclina D, y además por la pérdida de varios inhibidores endógenos de CDKs [4, 32] Por esta razón, se ha propuesto que el desarrollo de moléculas inhibidoras de CDKs podría ser una nueva y esperanzadora estrategia en el tratamiento de esta patología.[5, 6]

En esta línea de investigación se encuentra dinaciclib, un potente inhibidor molecular de las CDKs 1, 2, 5 y 9, aunque presenta una mayor especificidad por la CDK 9, que produce la parada de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II, lo que a su vez causa un descenso en los niveles de proteínas anti-apoptóticas tales como Mcl-1 y Bcl-2. El dinaciclib ha demostrado una inhibición más selectiva que los fármacos de su mismo tipo como el flavopiridol, disminuyendo con ello los efectos secundarios adversos que generaban los inhibidores de CDKs de primera generación. [6]

## OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS

Otros fármacos actualmente en desarrollo y evaluación para el posible tratamiento del mieloma, son el inhibidor de la PI3K $\delta$  CAL-101/Idelalisib o preparaciones modificadas genética y químicamente del mensajero mortal Apo2L/TRAIL. Los introduciremos brevemente a continuación.

### CAL-101

La fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) es una proteína de transducción de señal formada por dos subunidades, la reguladora p85 y la catalítica p110. La subunidad p85 es una proteína adaptadora unida al extremo N-terminal de p110 $\delta$  cuya función es la de mediar la activación de PI3K por unión de sus dominios SH2 a residuos de tirosina fosforilados en receptores tipo tirosin-quinasa asociados a receptor de factores de crecimiento, citoquinas, antígenos y moléculas coestimuladoras.

La subunidad catalítica p110 se expresa en tres isoformas p110 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . La isoforma p110 $\delta$  es la mayoritaria en las células hematopoyéticas. La PI3K $\delta$  produce la fosforilación en el grupo hidroxilo situado en posición 3 de la molécula de fosfatidil inositol. Se ha demostrado que en pacientes de mieloma múltiple se da un aumento de la expresión de p110 $\delta$ , hecho que se produce también en otros tipos de cáncer como leucemias, glioblastoma y cáncer de mama.[33]

El Idelalisib/CAL-101 inhibe el centro activo de p110. Experimentos realizados con enzimas recombinantes sugieren que es p110 $\delta$  la isoforma afectada en la vía de señalización iniciada por la PI3K en células de mieloma múltiple y en otros casos de cáncer de origen hematológico [34, 35] La inhibición de PI3K bloquea la ruta de supervivencia celular e induce a su vez la muerte por apoptosis dependiente de caspasas. La citotoxicidad de CAL-101 tanto *in vivo* como *in vitro*.

Este fármaco es un inhibidor de la PI3K, enzima que fosforila al fofatidil-4,5-bisfosfato presente en la semicapa interna de la membrana plasmática. Esta fosforilación genera un sitio de reclutamiento para proteínas con dominios de homología con pleckstrina como es la serín-treonín quinasa PKB/Akt (Protein Kinase B).

PKB/Akt necesita ser fosforilado en dos posiciones diversas para que se active. Por una parte, es fosforilado por PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1), que es una quinasa que necesita ser reclutada, también por interacción con PIP3 de la membrana para ejercer su función sobre la misma. La segunda fosforilación la lleva a cabo el mTOR en forma de complejo mTORC2.

## INTRODUCCIÓN

PKB/Akt activada fosforila posteriormente diversos factores reguladores de la supervivencia celular y factores de transcripción como FOXO, factor de transcripción que inhibe la proliferación celular e induce la muerte celular. Cuando es fosforilado, es reclutado por chaperonas citosólicas haciendo que deje la localización nuclear inhibiendo así la transcripción de genes proapoptóticos. Además, PKB/Akt produce la fosforilación de la proteína proapoptótica multidominio Bad, de forma que queda inactiva. Otra proteína fosforilada por PKB es GSK3 (Glycogen synthase kinase-3), enzima activa constitutivamente con sustratos diversos como la glucógeno sintasa, c-Myc y la ciclina D. Mediante la fosforilación de la GSK3 se produce su inhibición y la consecuente activación de sus sustratos que llevan a la entrada en ciclo celular [36]

La ruta de transducción de señales PI3K/Akt se encuentra sobreactivada en cáncer y es crucial en su desarrollo ya que estimula la supervivencia y el crecimiento celular. Estudios genéticos han determinado que diversas mutaciones en el gen de la PI3K están presentes en las células cancerosas. Además, diversas mutaciones activadoras en la proteína PKB/Akt han sido descritas en cáncer de mama.[37]

La ruta de señalización de la PI3K se ha propuesto por tanto como una buena diana para el estudio de inhibidores de la misma, como es el caso de CAL-101, en el tratamiento del cáncer, y en concreto en el mieloma múltiple por la elevada expresión de la misma en las células de mieloma.

## TRAIL SOLUBLE Y LUV-TRAIL

---

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) pertenece a la familia de ligandos proapoptóticos que se unen a una parte de la familia de receptores del TNF induciendo así la vía extrínseca de la apoptosis. Este ligando mortal se une a miembros de la subfamilia de receptores mortales (DR; Death Receptors). Los receptores que transducen la señal apoptótica son DR4 y DR5, proteínas transmembrana con un dominio rico en cisteína en el dominio extracelular y un dominio citoplasmático de tipo DD. La unión de TRAIL a su receptor se realiza en forma trimérica, lo que genera la correspondiente trimerización del receptor en la membrana y el reclutamiento de con dominio DD como las proteínas adaptadoras FADD, desencadenando así la apoptosis celular por la vía extrínseca. [38]

El hecho de que Apo2L/TRAIL sea capaz de inducir apoptosis predominantemente en células tumorales y no en células normales ha permitido que se proponga como un posible agente proapoptótico adecuado para el tratamiento del cáncer. En una primera aproximación, se pensó en utilizar TRAIL recombinante soluble para el tratamiento antitumoral, pero esta idea se desechó al observar la ausencia de eficacia significativa en ensayos clínicos. No obstante, se ha demostrado que el modo de liberación de esta molécula por parte de los linfocitos T activados no es en forma libre, sino adosada a unas partículas lipídicas denominadas exosomas. [39]

De esta forma, se han desarrollado nanopartículas lipídicas artificiales basadas en la generación de liposomas en los cuales se han insertado monómeros de TRAIL. Estas nanopartículas lipídicas, denominadas LUV-TRAIL han demostrado una potente inducción de apoptosis en células malignas de la estirpe hematológica, entre otros tipos de células tumorales, proponiéndose como un potente agente antitumoral para su uso en terapia humana. [40]

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo han sido las siguientes:

- MM.1S y RPMI 8226: líneas de mieloma humano amablemente proporcionadas por el Dr. Atanasio Pandiella (CIC, Salamanca).

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Sigma). Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador termostatizado (Heareus Cell). Todas las manipulaciones celulares se realizaron en campana de flujo laminar vertical (Telstar).

#### CONTAJE Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para la determinación de la viabilidad celular así como de la densidad celular del cultivo se ha utilizado la técnica de tinción por exclusión con Azul Trypan al 0,4% diluido en NaCl 0.15 M. Este colorante penetra únicamente en las células que tengan dañada su membrana, de forma que es posible diferenciar las células muertas, que se teñirán de azul, de las vivas, que permanecen impermeables al colorante. Para realizar el conteo se utilizó la cámara de Neubauer o hemocitómetro en la que se dispuso una mezcla 1:1 de Azul Trypan y cultivo celular. La determinación de la densidad celular así como de la viabilidad del cultivo se realizó con la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$
$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

#### ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

##### Determinación de la proliferación celular: ensayo de reducción del MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio realizada por las deshidrogenasas mitocondriales y del retículo endoplásmico a un compuesto coloreado denominado azul de formazán. La conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazán (púrpura e insoluble) sólo se puede producir por la actuación de las enzimas de las células vivas. Esta reducción permite analizar la supervivencia y proliferación celular de un cultivo ya que la cantidad de células vivas después de aplicar el tratamiento con el fármaco es proporcional a la cantidad de azul de formazán producido, que se puede cuantificar por la lectura de la absorbancia en un lector de placas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se dispusieron en placa de 96 pocillos de fondo redondo un volumen de 50  $\mu$ l de cultivo en cada pocillo a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  cél/ml. Cada pocillo se incubó en un volumen final de 100  $\mu$ l en presencia o ausencia de fármaco. La placa se incubó durante el tiempo estipulado en estufa a 37°C. Trascurrido este tiempo, se añadieron 10  $\mu$ l de MTT a una concentración 5 mg/ml en PBS en cada pocillo y se dejó incubar durante 2-3h. Tras centrifugar la placa a 4.500 rpm durante 5 min se retiraron 70  $\mu$ l de sobrenadante y se añadieron 50  $\mu$ l de isopropanol en HCl 0,05M. Los cristales se disolvieron en este medio orgánico con la ayuda de un agitador de placas (Bioblock) y posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo).

### Determinación simultánea del potencial mitocondrial y la translocación de fosfatidilserina. Cuantificación de apoptosis mediante marcaje con Anexina V y TMRE

La anexina V es una proteína de la familia de las anexinas que se une específicamente a la fosfatidilserina, lípido de membrana que se encuentra en la cara interna de la membrana celular y que es translocado a la cara externa en los primeros estadios de apoptosis. Mediante el acoplamiento de un fluoróforo es posible determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células muertas.

Las células viables poseen un potencial de membrana mitocondrial alto y constante, de en torno a 140 mV debido a la diferencia de potencial entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana producido por el bombeo constante de protones a través de la membrana interna mitocondrial. La pérdida de la integridad de membrana mitocondrial es otro de los eventos tempranos de la apoptosis, por lo que se utilizó la sonda fluorescente roja lipofílica TMRE (Tetrametilrodamina metil éster,  $\lambda_{abs}=549$  nm,  $\lambda_{em}=574$  nm) para determinar el potencial de membrana mitocondrial. Este fluorocromo posee carga positiva, por lo que tenderá a internalizarse en las mitocondrias de las células viables que mantendrán la matriz mitocondrial cargada negativamente.

En este ensayo se sembraron 50  $\mu$ l de una suspensión celular con densidad  $5 \times 10^5$  cél/ml en placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añadió la dilución de fármaco correspondiente para obtener la concentración final deseada en un volumen final de 100  $\mu$ l. Este ensayo se realizó a tiempos de incubación variables dependiendo del experimento.

Para realizar el marcaje se recogieron las células en tubos de citometría y se centrifugaron a 3.500 rpm durante un minuto. Cada tubo se resuspendió en 100  $\mu$ l de una disolución ABB (Anxin Binding Buffer) a la cual se añadió 1  $\mu$ l de anexina y 0,5  $\mu$ l de TMRE. Se incubaron los tubos en oscuridad y a 37°C durante 15 minutos y se procedió a realizar la lectura en el citómetro de flujo (FACScalibur, BD). Los resultados obtenidos se interpretaron usando los software CellQuest y FlowJo 7.6.1.

### Análisis del ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular se dispusieron  $1 \times 10^6$  células por punto experimental en una placa de 6 pocillos donde fueron tratadas a diferentes concentraciones de fármaco durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con suero fisiológico (Phosphate-buffered saline, PBS) estéril y se fijaron las células con etanol al 70% previamente enfriado en baño de hielo. El etanol se añadió despacio, gota a gota y en agitación a baja velocidad en vórtex. Una vez adicionado, se incubó en hielo durante 30 minutos para después centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS estéril y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de

## MATERIALES Y MÉTODOS

solución de yoduro de propidio (PI)/RNAsa (0.5 µg/ml RNAsaA, 20 µg/ml PI en PBS). Tras la incubación durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad se procedió al análisis por citometría de flujo.

### Análisis de la expresión de proteínas mediante *Western Blotting*

#### 1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.

Se dispusieron  $5 \times 10^6$  células por pocillo, que fueron tratadas o no y se dejaron incubar durante 24 horas con la droga a diferentes concentraciones. Estas células se recogieron y se lavaron con 1 ml de PBS estéril. Una vez realizado el lavado, se resuspendieron en tampón de lisis, en un volumen de 20 µl/ $1 \times 10^6$  células, es decir, en 100 µl. Este tampón de lisis contiene Tritón-X-100 al 1%, NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM pH= 7,6, glicerol al 10% v/v, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetsulfonio 1 mM, compuestos necesarios para la lisis celular e inhibidores de proteasas y fosfatases. Se incubaron 30 min en baño de hielo con dicho tampón y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C.

De este centrifugado se recogieron 90 µl del sobrenadante en tubos Eppendorf donde se añadieron 45 µl de tampón de lisis 3x, que contiene Tris/HCl 150 mM pH=7,4, SDS 3%, molibdato de sodio 0,3 mM, pirofosfato sódico 30 mM, fluoruro de sodio 30 mM, glicerol al 30% v/v, β-mercaptoetanol 30% v/v y azul de bromofenol 0,06% p/v. Por último, los lisados celulares se incubaron a 95°C durante 5 minutos en baño seco (Selecta) y se guardaron a -20°C para su posterior análisis.

#### 2. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Para la separación de proteínas en función de su peso molecular se utilizaron geles de acrilamida/bisacrilamida al 12% o al 6% con SDS. Dicho gel contiene dos partes diferenciadas por el tamaño del poro y el pH: el gel concentrador (stacking gel) y el gel de resolución (resolving gel). El gel de concentración contenía acrilamida/bisacrilamida al 5%, Tris-HCl 125 mM pH= 6,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico al 0,1%, TEMED al 0,01%. La composición del gel de resolución es la siguiente: acrilamida/bis 10% o 15% Tris-HCl 370mM pH 8,8, SDS al 0,1%, persulfato amónico 0,1%, TEMED al 0,01%.

Una vez gelificado, se dispuso el gel en la cubeta de electroforesis (Hoefer) y se cargaron 16 µl de muestra por carril y se llevó a cabo la electroforesis a 80 V y 20 mA durante 10 minutos para que las proteínas atravesaran el gel concentrador y a 180 V y 20 mA durante 75 minutos para que atravesasen el gel de resolución. La composición del tampón de electroforesis consiste en Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%. Las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE HealthCare) en un sistema de electrotransferencia semiseca (Bio-Rad). El gel y la membrana de nitrocelulosa se dispusieron entre papeles Whatman formando un sándwich, humedecidas previamente en tampón de transferencia (Tris/HCl 48 mM pH= 8,3, glicina 39 mM, 0,037% SDS, 20% metanol). Dicho sándwich se dispuso en un cassette de transferencia semiseca y se conectó a una fuente de electroforesis para realizar la transferencia de proteínas a la membrana durante una hora a 20 V y 400 mA. La membrana fue recuperada y se bloqueó con leche al 5% en tampón B (Tris/HCl 10 mM pH= 8, NaCl 0,12 M, Tween-20 0,1%, timerosal) durante una hora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3. Análisis de proteínas por *Western blotting*

Tras el bloqueo de la membrana se realizaron tres lavados rápidos con tampón B y tres lavados de 5 minutos en agitación. Después del lavado se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico dirigido frente a la proteína a analizar diluido 1:10.000 en una mezcla de tampón B con 5% de BSA y 0,05% de azida de sodio. La incubación se realizó a 4°C en agitación durante la noche.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se procedió al lavado de la membrana que consistió en tres lavados rápidos y tres lavados de 5 minutos, todos ellos con tampón B. Después se incubó con el anticuerpo secundario, dirigido contra el primario, durante una hora a temperatura ambiente y en agitación a la concentración indicada por la casa comercial, diluido en tampón B con un 2,5% de leche descremada en polvo. Dichos anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con peroxidasa de rábano para la posterior detección de las bandas de proteínas. Una vez incubado se realizó el mismo lavado que con el anticuerpo primario y se procedió al revelado de la membrana mediante quimioluminiscencia, método basado en la detección de la luz emitida por un sustrato tras su oxidación química.

La membrana fue incubada con el sustrato (Pierce ECL Western blotting Substrate, Thermo) correspondiente durante 2 minutos y se transfirió a una funda de plástico transparente dispuesta en un cassette de revelado radiológico eliminando previamente el exceso de sustrato. El revelado fotográfico se realizó en cuarto oscuro utilizando película fotográfica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) la cual se dispuso sobre la funda de plástico. El tiempo de exposición fue variable en función del anticuerpo primario usado. Una vez finalizado el tiempo de exposición, se reveló mediante inmersión secuencial en líquido revelador (100 ml revelador, 350 ml agua destilada), agua destilada y líquido fijador (100 ml fijador, 400 ml agua destilada, Kodak). Tras el revelado la película se secó al aire.

Anticuerpo	Tipo/especie	Proveedor	Anticuerpo	Tipo/especie	Proveedor
Caspasa 8	Ratón	BD Pharmingen	IgG anti-conejo PO	Ratón	Sigma
Caspasa 3	Conejo	Cell-Signaling	IgG anti-ratón PO	Cabra	Sigma
PARP	Ratón	ENZO Life Sciences	Actina	Ratón	BD Pharmingen

### TINCIÓN CON HOESCHT 33342 Y VISUALIZACIÓN

Se dispusieron  $5 \times 10^5$  cél/pocillo en una placa de 24 pocillos que fueron tratadas con diversas concentraciones de fármaco overnight. Una vez tratadas, se trasvasaron a una placa de 24 pocillos que contenían en su interior cubreobjetos revestidos de polilisina. Dicha placa fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se fijaron las células al cubre con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a 4°C. Una vez fijadas, las células se lavaron con PBS y el cubreobjetos se dispuso de forma invertida sobre un portaobjetos en el cual había depositada una gota de Mowiol (Sigma) contenido Hoechst 33342 a 20 µg/ml. Una vez colocado el cubre, se incubaron las preparaciones a temperatura ambiente durante 15 min y se procedió a su examen utilizando un microscopio de fluorescencia (E600/E400, Nikon) provisto de una videocámara utilizando el programa de fotografía Nikon ACT-1.

## RESULTADOS

### RESULTADOS

#### 1. Efecto del inhibidor de CDKs Dinaciclib sobre células de mieloma múltiple

##### 1.1      Dinaciclib induce inhibición de la proliferación en células de mieloma múltiple

Primero se analizó la capacidad citotóxica del inhibidor de CDKs dinaciclib sobre las líneas celulares de mieloma múltiple MM1.S y RPMI 8226. Para ello, se realizaron ensayos dosis-respuesta en el rango de 9 a 200 nM y se analizó la inhibición de la proliferación celular mediante el método de reducción de Mossman (MTT).

Como se puede observar en la **Figura 1.A**, el dinaciclib produjo una fuerte inhibición de la proliferación en la línea celular MM.1S, con una IC<sub>50</sub> de 7,5 nM. En el caso de la línea celular RPMI 8226 (**Figura 2.A**) se produjo una inhibición de la proliferación todavía más pronunciada, mostrando una IC<sub>50</sub> de en torno a 3 nM.

##### 1.2      Dinaciclib induce muerte celular por apoptosis en células de mieloma múltiple.

A pesar de que el dinaciclib inhibe de manera preferente CDKs implicadas en regulación de la síntesis de proteínas como CDK9 o CDK7, el dinaciclib también inhibe significativamente otras CDKs implicadas en la regulación del ciclo celular como CDK1 y CDK2 [6].

Para averiguar si el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular observado mediante MTT se correspondía con un efecto citotóxico, o si por el contrario sólo se producía un efecto citostático, se analizó directamente la inducción de muerte celular. Para ello se caracterizó el mecanismo de inducción de apoptosis mediante la detección de la translocación de la fosfatidil serina (PS) en la membrana plasmática y la caída del potencial mitocondrial, eventos relacionados con los primeros estadios de la apoptosis. Ambos fenómenos se analizaron a través del marcaje con anexina V-Alexa647 y la sonda TMRE respectivamente mediante citometría de flujo tras el tratamiento con concentraciones crecientes de dinaciclib durante 24 horas.

Tal y como se muestra en el Anexo I, se observa que el tratamiento con dinaciclib produce un aumento de la translocación de PS en la membrana plasmática y la caída del potencial de membrana mitocondrial de forma dosis-dependiente tanto en MM.1S (**Figura 1.B**) como en RPMI 8226 (**Figura 2.B**). Así, se puede concluir la inhibición de crecimiento observada en los ensayos de reducción del MTT se debe a la inducción de muerte celular por apoptosis en ambas líneas celulares.

Como ya se ha mencionado anteriormente, otra de las características celulares prototípicas del mecanismo apoptótico es la condensación del material genético nuclear y su posterior fragmentación. Para caracterizar de manera más completa la muerte celular observada se analizó la condensación y fragmentación nuclear en MM1.S y RPMI 8226 tras el tratamiento con dinaciclib mediante la tinción nuclear con la sonda Hoechst 33342.

En la **Figura 3** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. En ellas se observa que el dinaciclib indujo la condensación y la fragmentación de la cromatina en ambas líneas celulares. En las células control en ausencia de fármaco se pueden observar núcleos uniformes y cromatina difusa mientras que cuando las células son expuestas al fármaco se produce la fragmentación nuclear y la condensación cromatínica y la fragmentación nuclear, hechos que se confirman por la aparición de tinciones más intensas. Se aprecia además la disminución de la densidad celular tras el tratamiento con dinaciclib . Este hecho puede deberse a una pérdida de células al realizar

## RESULTADOS

la tinción o a una fragmentación total de las células al haber sido expuestas a una concentración de dinaciclib (2 nM) suficientemente elevada para observar este efecto.

Los resultados de estos experimentos nos permiten llegar a la conclusión de que el dinaciclib induce la muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de mieloma múltiple MM.1S y RPMI 8226.

### 1.3 Análisis del efecto de Dinaciclib en el ciclo celular

Dinaciclib es, como ya se ha dicho con anterioridad, un fármaco inhibidor de CDKs [4]. Estas CDKs ejercen, entre otras funciones fisiológicas, el control de la progresión del ciclo celular. Al inhibir la actividad de estas proteínas se podría esperar el arresto del ciclo celular previo a la inducción de la muerte por apoptosis. Por esta razón, se estudió el efecto del dinaciclib en la distribución del ciclo celular realizando ensayos dosis-respuesta con concentraciones variables de dinaciclib.

En el ciclo celular, analizado por citometría de flujo, se pueden distinguir diversas fases. En la fase sub-G<sub>0</sub> se encuentran los cuerpos apoptóticos y las células con una dotación génica inferior a la del estado diploide. En la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> la célula se prepara para la replicación del DNA, fenómeno que ocurre posteriormente en la fase S de síntesis del DNA. Por último, la fase G<sub>2</sub>/M es la previa a la mitosis celular y las células se encuentran en estado tetraploide.

En la **Figura 4.A**, se muestra el porcentaje de células presente en cada una de las fases del ciclo cuando se incuban con distintas concentraciones de dinaciclib. La representación gráfica de dichos datos (**Figura 4.B**) corresponde con los picos de los histogramas analizados mediante el software FlowJo. Así, se puede apreciar cómo el porcentaje de células en fase G<sub>1</sub> aumenta considerablemente conforme aumenta la concentración del fármaco disminuyendo simultáneamente el número de células en fase G<sub>2</sub>/M. Por otra parte, las células en fase subG<sub>0</sub> se mantienen constantes y se observa únicamente una ligera bajada de las células en fase S.

Estos resultados parecen indicar que el dinaciclib realiza el arresto del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, impidiendo así que la célula progrese a la fase S, fenómeno que provoca en consecuencia la inducción de muerte por apoptosis. Así pues, se corrobora el efecto inhibitorio que ejerce el dinaciclib sobre las CDK que intervienen en el paso de la fase G<sub>1</sub> a la fase S, es decir, las quinasas dependientes de ciclinas CDK1 y CDK2.

## Combinación de Dinaciclib con otros agentes potencialmente sinérgicos

### 2.1 Combinación con el inhibidor de la fosfatidil-inositol-3- quinasa (PI3K) CAL-101

#### 2.1.1 Estudio del carácter citotóxico de Idefalisib en células de mieloma múltiple.

Tras haber caracterizado la citotoxicidad producida por dinaciclib, nos propusimos utilizar otros fármacos o agentes en paralelo que pudiesen actuar de manera sinérgica, potenciando mutuamente su efecto citotóxico y disminuyendo así la concentración necesaria para inducir muerte. Dada la mayor resistencia de la línea celular MM1.S a dinaciclib, el estudio de combinación con distintos fármacos se centró en dicha línea celular.

Dada la sobreactivación de la PI3K en el mieloma múltiple que produce una estimulación de las rutas de supervivencia celular [41] se propuso en primer lugar el fármaco Idefalisib (CAL-101), un inhibidor de la PI3K como un candidato potencial para generar estudios de combinación con el dinaciclib [42]. La inhibición de la PI3K junto con la inhibición de la CDK9 mediada por el dinaciclib

## RESULTADOS

conllevaría el bloqueo de la síntesis proteica que rebajaría los niveles de proteínas con alto número de recambio como algunos factores antiapoptóticos.

En primer lugar se procedió a determinar la citotoxicidad individual del idelalisib (CAL-101), con el objetivo de elegir una dosis subtóxica de dicho fármaco y usarlo posteriormente en combinación con dinaciclib buscando así la sensibilización de las células de mieloma múltiple.

El carácter citostático y citotóxico de dicho fármaco se analizó por el método de reducción del MTT junto con la determinación de la translocación de PS y la caída del potencial mitocondrial, tal y como se había realizado con anterioridad para dinaciclib. En la **Figura 5** se muestran los resultados de ambos experimentos. Las gráficas muestran la ligera inhibición de la proliferación producida por el idelalisib en el rango de concentraciones estudiado, no llegándose a alcanzar la IC<sub>50</sub> ni a la dosis máxima ensayada de 20 µM. Los resultados de citometría muestran una ligera inducción de muerte por apoptosis, pero dada la alta muerte basal no se puede afirmar que el incremento de la muerte observado sea significativo.

### **2.1.2 Estudio del efecto combinado de Idelalisib y Dinaciclib en células de mieloma múltiple.**

Una vez estudiado el efecto citotóxico de idelalisib en solitario, se procedió a estudiar el posible efecto sinérgico de la combinación de dinaciclib con idelalisib. Así, se eligió una dosis de 2 nM de dinaciclib en combinación con las dos dosis más altas de idelalisib estudiadas (10 y 20 µM) para la realización de estudios de combinación con ambos fármacos.

Se comenzó analizando la combinación idelalisib y dinaciclib probando con las dos dosis más altas 10 µM y 20 µM de idelalisib y una dosis de 2 nM de dinaciclib. Se escogió esta dosis de dinaciclib por haber demostrado ser la dosis subtóxica más alta sobre la línea celular MM1.S. Para estos experimentos se analizó la translocación de PS en la membrana celular, al haber quedado patente en los experimentos anteriores que los niveles de translocación de PS y la pérdida de potencial mitocondrial eran prácticamente idénticos en todos los casos. Como se puede observar en la **Figura 6A**, prácticamente toda la muerte celular observada se debió a la acción del dinaciclib en solitario, por lo que no se pudo apreciar un efecto sinérgico entre ambos fármacos. Así pues, se disminuyó la cantidad de dinaciclib utilizada, empleando una concentración de 0,8 nM. Sin embargo, la combinación de dinaciclib a 0,8 nM con idelalisib no produjo ningún efecto citotóxico sobre las células MM1S (**Figura 6B**).

En conclusión, estos resultados nos llevaron a pensar que el inhibidor de la PI3K no es un buen candidato para actuar en combinación con dinaciclib. Este hecho puede ser debido a que existiera alguna otra isoforma redundante de PI3K que complementara la vía de transducción de señal de la que forma parte la PI3K y que mantiene la supervivencia celular.

## **2.2 Combinación de Dinaciclib con el mensajero mortal Apo2L/TRAIL**

### **2.2.1 Estudio del carácter citotóxico de TRAIL soluble y TRAIL adosado a nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL) en células de mieloma múltiple**

Al no observar una actividad citotóxica combinada en los ensayos de sinergia con dinaciclib e idelalisib se estableció otro posible candidato para estudios de citotoxicidad combinada. En este caso se optó por buscar un agente que activara la vía apoptótica extrínseca como sensibilizador de las células de mieloma múltiple a la apoptosis. Para activar la vía extrínseca de la apoptosis se usó el ligando mortal TRAIL en forma soluble (sTRAIL) y anclado a nanopartículas lipídicas de tipo liposomal (LUV-TRAIL).

## RESULTADOS

El ligando mortal TRAIL se ha propuesto como candidato para sensibilizar a la línea celular MM.1S ya que puede actuar en combinación con el dinaciclib. Como ya se ha detallado con anterioridad, el dinaciclib posee como diana la CDK 9, quinasa que actúa en la activación de la RNA polimerasa II [6]Al inhibir la CDK9 se produce un bloqueo de la transcripción, lo que lleva a un rápido descenso de la concentración de proteínas de vida media corta al bloquear la síntesis de las mismas. Entre estas se encuentran dos proteínas clave en la regulación de la apoptosis, como la proteína antiapoptótica Mcl-1 (homóloga de Bcl-2) y el inhibidor de la caspasa 8 cFLIP [43]. La disminución de la transcripción de estas proteínas conduciría finalmente a la inducción de la apoptosis por la vía extrínseca debida por una parte a la inactivación de c-FLIP y por otra a la activación directa de los receptores mortales por la acción del ligando mortal TRAIL.

Primero se caracterizó el efecto citotóxico de sTRAIL y LUV-TRAIL sobre ambas líneas celulares RPMI 8226 y MM.1S. Como se puede observar en las Figuras 7.A y 7.B, la línea celular RPMI 8226 resultó ser muy sensible a la formulación liposomal de TRAIL, mientras que las células MM.1S mostraron mayor margen de sensibilización. En consecuencia, se seleccionó la línea celular MM.1S para los estudios de combinación ya que presenta menor sensibilidad a TRAIL.

Para analizar el posible efecto sinérgico de TRAIL con dinaciclib se realizaron ensayos dosis respuesta de sTRAIL y LUV-TRAIL por separado en ausencia y en presencia de dinaciclib previa incubación durante 1 hora con el mismo. El descenso de la viabilidad celular se analizó por el ensayo de reducción del MTT. En la **Figura 8** se representan los resultados obtenidos de la combinación de ambos agentes. Se observa en primer lugar el estudio de la combinación de dinaciclib con sTRAIL en el cual no se observa una diferencia significativa en la disminución de la viabilidad celular (**Figura 8A**). Por otra parte, el estudio de la combinación con LUV-TRAIL tampoco llevó a un efecto sinérgico entre ambos fármacos.

### 2.2.2 Activación de la vía extrínseca de la apoptosis por la combinación de Din con TRAIL

A pesar de no haber observado un claro efecto sinérgico entre dinaciclib y TRAIL en las células MM.1S, de todas formas se procedió a analizar de manera más detallada la vía apoptótica extrínseca para confirmar que esta se estaba activando de manera correcta, y si el pre-tratamiento con dinaciclib en efecto se traducía en una mayor activación de la caspasa-8. Así, se analizó la activación de las principales proteínas activadas por la vía extrínseca de la apoptosis mediante Western blot (**Figura 8**). En este caso se usó una dosis máxima de 1.000 ng/ml de sTRAIL y LUV-TRAIL en combinación con dinaciclib a una concentración de 0,8 nM.

Como se muestra en la **Figura 9**, la caspasa-8 se activó de manera similar con sTRAIL y LUV-TRAIL como se puede observar por la aparición de los fragmentos procesados (p43/41), y el pre-tratamiento con dinaciclib no supuso una mayor activación de dicha caspasa. De manera similar, la activación de la caspasa-3 mostró un patrón análogo, no pudiendo advertirse diferencias entre los distintos tratamientos. Finalmente, el procesamiento de PARP1, un sustrato específico de la caspasa-3, corroboró lo observado en las caspasas -8 y -3.

En conclusión, el análisis de la activación de la vía extrínseca por Western blot no permitió apreciar diferencias significativas entre sTRAIL y LUV-TRAIL, ni en solitario ni en combinación con dinaciclib, por lo que debería ser llevado a cabo un estudio más detallado con otra línea de mieloma para llegar a conclusiones definitivas.

## DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se ha realizado el análisis de la capacidad citotóxica de dinaciclib, un inhibidor de CDKs de última generación sobre células de mieloma múltiple. En estudios recientes, se obtuvieron prometedores resultados utilizando dinaciclib en pacientes con mieloma múltiple refractario.[4], por lo que nosotros nos propusimos comprobar y caracterizar su potencial terapéutico mediante la inducción de toxicidad, así como probar potenciales tratamientos combinados con otros agentes sobre dos líneas celulares tumorales provenientes de mieloma múltiple, MM.1S y RPMI 8226.

En primer lugar, se analizó la inhibición de la proliferación celular producida por dinaciclib en ambas líneas celulares donde se observó que en ambos casos dinaciclib ejercía una acción inhibitoria parecida, siendo más pronunciada en el caso de la línea RPMI 8226. En estas células se observa que la viabilidad permanece constante a las dos dosis más bajas y a dosis mayores se produce un pronunciado descenso de la viabilidad celular relativa. En cambio, en la línea celular MM.1S se observa un descenso algo más escalonado, llegando prácticamente a la pérdida total de viabilidad a una concentración de 22 nM.

Por otro lado, se caracterizó hasta qué punto la reducción de la viabilidad relativa observada en ambas líneas celulares se debía a un efecto citostático (derivado de una posible parada del ciclo celular, esperable al inhibir las CDKs) o si además también había un efecto citotóxico. Así, se realizaron ensayos dosis-respuesta midiendo esta vez parámetros característicos de apoptosis como son la exposición de PS y la reducción del potencial mitocondrial. Nuestros resultados confirmaron que el dinaciclib induce apoptosis en ambas líneas celulares, MM.1S y RPMI 8226, ya que tras el tratamiento con el fármaco se observó la translocación de la PS a la semicapa externa de la membrana plasmática y la caída del potencial mitocondrial. En la línea celular MM.1S se observa un repentino aumento de la translocación de la PS a una dosis de 7,4 nM mientras que en el caso de las RPMI 8226 el aumento de la translocación de la PS es más escalonado a medida que aumenta la concentración del fármaco. En ambas líneas celulares, la dosis de 7,4 nM parece ser la dosis mínima que induce apoptosis tras 24 horas de tratamiento. En cualquier caso, los resultados de citotoxicidad correlacionaron casi por completo con los resultados de inhibición de crecimiento obtenidos mediante la reducción del MTT, corroborando que el efecto sobre la viabilidad celular se podía atribuir casi en su totalidad a un efecto citotóxico.

Asimismo, se comprobó que el dinaciclib producía la condensación y fragmentación de la cromatina, dos eventos característicos del proceso de apoptosis. En ambas líneas celulares se observa que, tras el tratamiento con dinaciclib durante 24 horas a una concentración subtóxica de 2 nM se produce la condensación del núcleo, siendo más evidente en la línea RPMI 8226 ya que en el caso de la línea celular MM.1S se produjo una disminución de la densidad celular. Esta inesperada reducción de la densidad celular se podría atribuir a la propia manipulación de las células a la hora de montar las muestras para microscopía o bien a un efecto tóxico excesivo del fármaco que produjo a 24 horas un efecto apoptótico mayor que en otras ocasiones.

Desde un punto de vista molecular, el dinaciclib es un inhibidor específico de CDKs, presentando mayor especificidad por CDK2 ( $IC_{50}= 1$  nM), CDK5 ( $IC_{50}= 1$  nM), CDK1( $IC_{50}= 3$  nM) y CDK9 ( $IC_{50}= 4$  nM). Así, el dinaciclib afecta tanto a las CDKs involucradas en el control del ciclo celular como a CDKs implicadas en la regulación de la transcripción [6]. Su acción a nivel de ciclo celular consiste en el arresto del mismo, lo cual inhibe la división celular descontrolada, fenómeno

## DISCUSIÓN GENERAL

característico de la progresión tumoral. Así, además de caracterizar la capacidad citotóxica del dinaciclib, también analizamos qué efecto causaba sobre el ciclo celular. En concreto, analizamos su efecto sobre las células MM.1S donde encontramos que el dinaciclib producía la parada del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, impidiendo así que se produjera la replicación del DNA para la subsiguiente división celular.

Una vez caracterizada la citotoxicidad de dinaciclib en ambas líneas celulares se exploró la posibilidad de utilizar dicho fármaco en conjunción con otros agentes que pudieran actuar en sinergia con él. Así, primero se estudió la combinación de dinaciclib con Idelalisib, un inhibidor de la PI3Kδ, quinasa clave en el inicio de la principal vía de supervivencia celular. [42] Desafortunadamente, la combinación de ambos fármacos no produjo sensibilización al menos a las dosis usadas. Una posible explicación para este efecto sería que al inhibir la PI3Kδ se produzca algún mecanismo compensatorio como la inhibición de PTEN, fosfatasa que cataliza la reacción contraria a la PI3K. Puede ser que dinaciclib indujera una disminución en los niveles de PTEN citoplasmático por lo que todo el PIP<sub>3</sub> que haya en la célula seguirá fosforilado aunque se inhiba la PI3K, compensando por tanto la acción inhibidora del idelalisib. Otra posibilidad es que exista en las células de mieloma otra isoforma de la PI3K como por ejemplo la PI3Kα que se active de forma compensatoria.

Por otra parte, se exploró también la posibilidad de utilizar dinaciclib como sensibilizador al ligando mortal TRAIL, tanto en su forma soluble (sTRAIL) como acoplado a nanopartículas lipídicas de tipo LUV (LUV-TRAIL). A este respecto, estudios llevados a cabo en el grupo Apoptosis Inmunidad y Cáncer del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza resultaron en el desarrollo de una nueva formulación del ligando mortal TRAIL basada en la inmovilización de TRAIL sobre la superficie de nanopartículas lipídicas de tipo liposomal de unos 100 nm de diámetro llamados LUVs (*"Large Unilamellar Vesicles"*), obteniéndose así el llamado LUV-TRAIL. Esta nueva formulación de TRAIL ha demostrado un mayor efecto citotóxico en comparación con sTRAIL en diversos modelos experimentales sobre células tumorales. [39, 40, 43-45]

Esto es debido a la disposición tridimensional del ligando mortal, ya que en la forma adosada a liposomas TRAIL se dispone de manera que genera un agrupamiento (*clusterización*) de receptores mortales en la célula tumoral que conlleva una activación más efectiva de la vía apoptótica extrínseca . A priori, se espera que en las líneas celulares de mieloma múltiple MM.1S y RPMI 8226 se diera también una mayor citotoxicidad para el tratamiento con LUV-TRAIL.

El estudio de combinación sTRAIL y LUV-TRAIL con dinaciclib sobre la línea celular RPMI 8226 no permitió realizar estudios de sinergia ya que esta línea celular es muy sensible de partida a la acción de LUV-TRAIL. Sin embargo, la línea celular MM.1S no es tan sensible a la acción de TRAIL por lo que se seleccionó para realizar ensayos de combinación. Sin embargo, no se observó ningún efecto sinérgico entre ambos agentes, al menos a las condiciones estudiadas. Además, sorprendentemente se pudo observar que LUV-TRAIL no ejerció una acción citotóxica significativamente superior a sTRAIL, que hubiera sido lo esperable. Teniendo en cuenta que la principal diferencia entre sTRAIL y LUV-TRAIL es su distinta eficiencia para activar su receptor, DR5, esta similitud entre sTRAIL y LUV-TRAIL podría deberse a que las células MM.1S presenten un patrón de expresión de los receptores de TRAIL DR4 y DR5 que pudiera explicar este efecto.

Además, cabría la posibilidad de que sTRAIL fuera más efectivo que la formulación liposomal LUV-TRAIL activando a DR4 en estas células y que en comparación, por tanto, tenga una citotoxicidad similar. Para poder dilucidar en detalle este fenómeno primero habría que realizar un

## DISCUSIÓN GENERAL

análisis de expresión superficial de ambos receptores, y si ambos estuviesen expresados habría que analizar la contribución de cada uno de ellos a la muerte inducida por sTRAIL o LUV-TRAIL. De todas formas, aunque a efectos de muerte celular no se pudieron encontrar diferencias, cabía la posibilidad de que aun así el dinaciclib fuera capaz de promover una mayor activación de la vía extrínseca que luego fuera neutralizada por proteínas reguladoras de la apoptosis que actuaran secundariamente a la activación del DISC, como las proteínas de la familia Bcl-2 o XIAP. Así, se realizó el estudio de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis para ver si se observaba un patrón de activación distinto en diversas proteínas involucradas en la apoptosis. Dicho estudio no permitió discernir efectos sinérgicos en los ensayos de combinación. De cualquier manera, habría que realizar un estudio más detallado de dinaciclib sobre células de mieloma para poder sacar conclusiones definitivas. Para empezar, habría que ampliar el número de líneas celulares a estudiar incluyendo líneas como las U266 o las H929, ampliamente utilizadas en estudios sobre mieloma múltiple. Además, habría que profundizar en los efectos que el dinaciclib puede producir en las células de mieloma múltiple. Por ejemplo, habría que caracterizar con precisión el efecto del dinaciclib sobre los niveles de expresión de proteínas como cFLIP, Mcl-1, Bcl-2 o XIAP, de las cuales ya se ha descrito previamente que disminuyen rápidamente su expresión tras inhibición de CDK9 mediante otros inhibidores de CDKs como flavopiridol [46, 47] o SNS-032 [48].

Por otro lado, recientemente se ha descrito un efecto inhibidor del dinaciclib sobre la llamada “respuesta a proteínas mal plegadas” (Unfolded Protein Response, UPR)[49]. Este mecanismo se encarga de mantener la homeostasis de la célula en condiciones de estrés en el retículo endoplásmico producido por una elevada producción de proteínas no correctamente plegadas.

De hecho, la UPR es un proceso de especial importancia en células de mieloma, que presentan una elevada producción basal de inmunoglobulinas. [50] Así, una inhibición de este mecanismo mediada por la inhibición conjunta de CDK1 y CDK5 puede llevar rápidamente a una situación en la que grandes cantidades de inmunoglobulinas mal plegadas se acumulen en el retículo endoplasmático, provocando un estrés que acabe induciendo la muerte celular. El estudio de este proceso y su posible utilización para sensibilizar a las células de mieloma a otros agentes es otro aspecto que sería muy interesante explorar en el futuro.

Finalmente, cabe mencionar que el dinaciclib ya ha sido testado en diversos ensayos clínicos en fase I y II en pacientes con mieloma múltiple refractario. Los resultados de estos ensayos demostraron que el dinaciclib tiene una actividad alta actuando en monoterapia en pacientes de mieloma múltiple, incluyendo la respuesta al tratamiento satisfactoria en pacientes con la enfermedad de carácter refractario. [4] El dinaciclib también ha sido probado en pacientes de leucemia linfocítica crónica refractaria, donde se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos de fase III. [51] Estos datos son un buen punto de partida para el desarrollo de combinaciones racionales de fármacos para la mejora de la esperanza de vida de los pacientes de mieloma múltiple.

## CONCLUSIONES

1. El inhibidor de CDKs Dinaciclib induce muerte por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple MM.1S y RPMI.
2. El inhibidor de CDKs Dinaciclib produce el arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de forma dependiente de la dosis en la línea celular MM1.S.
3. La combinación de Dinaciclib con el inhibidor de la fosfatidil-inositol-3-quinasa CAL-101 no produce una sinergia significativa en la línea de mieloma múltiple MM.1S.
4. En la combinación de Dinaciclib con el ligando mortal TRAIL en forma soluble y en forma adosada a la superficie de liposomas LUV-TRAIL no se advirtió un efecto sinérgico significativo.

## CONCLUSIONS

1. The CDKs inhibitor Dinaciclib has cytotoxic activity by inducing apoptosis in the multiple myeloma cell lines MM.1S and RPMI.
2. The CDKs inhibitor Dinaciclib produces a blocking effect in the progress of the cell cycle through the stop in the G0/G1 phase in a dose-dependent manner..
3. The combination of Dinaciclib with the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor CAL-101 did not induce any sensitizing effect on the multiple myeloma cell line MM.1S.
4. The combination of Dinaciclib with the death ligand TRAIL, either in its soluble form or attached to lipid nanoparticles (LUV-TRAIL) did not induce any sensitizing effect on the multiple myeloma cell line MM.1S.

## BIBLIOGRAFÍA

### BIBLIOGRAFÍA

1. Facon, T., et al., *Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial*. The Lancet. **370**(9594): p. 1209-1218.
2. Moreau, P., et al., *Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later*. Blood, 2012. **120**(5): p. 947-959.
3. Quach, H., et al., *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma*. Leukemia, 2009. **24**(1): p. 22-32.
4. Kumar, S.K., LaPlant, B., Chng, W. J., Zonder, J., Callander, N., Fonseca, R., ... & Stewart, A. K. , *Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma*. Blood, 2015. **125**(3): p. 443-448.
5. Deshpande, A., P. Sicinski, and P.W. Hinds, *Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2909-15.
6. Parry, D., et al., *Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(8): p. 2344-53.
7. Gojo, I., Zhang, B., & Fenton, R. G., *The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**(11): p. 3527-3538.
8. Dispenzieri, A., et al., *Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points*. Haematologica, 2006. **91**(3): p. 390-393.
9. Johnson, A.J., et al., *The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2012. **26**(12): p. 2554-7.
10. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2210-21.
11. Rollig, C., S. Knop, and M. Bornhauser, *Multiple myeloma*. Lancet, 2015. **385**(9983): p. 2197-208.
12. Kumar, S.K., et al., *Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2516-2520.
13. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
14. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 107-20.
15. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-3.
16. Portt, L., et al., *Anti-apoptosis and cell survival: A review*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2011. **1813**(1): p. 238-259.
17. Reed, J.C., *Mechanisms of Apoptosis*. The American Journal of Pathology, 2000. **157**(5): p. 1415-1430.
18. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-776.

## BIBLIOGRAFÍA

19. Wurster, M.L., M.A. Laussmann, and M. Rehm, *The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome*. *Exp Cell Res*, 2012. **318**(11): p. 1213-20.
20. Rupinder, S.K., A.K. Gurpreet, and S. Manjeet, *Cell suicide and caspases*. *Vascular Pharmacology*, 2007. **46**(6): p. 383-393.
21. Shi, Y., *Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis*. *Molecular Cell*, 2002. **9**(3): p. 459-470.
22. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 647-656.
23. Du, H., et al., *BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(1): p. 491-501.
24. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(3): p. 231-41.
25. Wang, C., & Youle, R. J. , *The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics*, 2009. **43**: p. 95-118.
26. Luo, X., et al., *Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 481-490.
27. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 153-66.
28. Oelgeschlager, T., *Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control*. *J Cell Physiol*, 2002. **190**(2): p. 160-9.
29. Manohar, S.M., et al., *Cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of Cdk9-TI and RNA polymerase II-dependent transcription*. *Leuk Res*, 2011. **35**(6): p. 821-30.
30. Bregman, D.B., R.G. Pestell, and V.J. Kidd, *Cell cycle regulation and RNA polymerase II*. *Front Biosci*, 2000. **1**(5): p. D244-57.
31. Ganuza, M., et al., *Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion*. *The EMBO Journal*, 2012. **31**(11): p. 2498-2510.
32. Bergsagel, P.L., et al., *Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma*. *Blood*, 2005. **106**(1): p. 296-303.
33. Ikeda, H., et al., *PI3K/p110 $\delta$  is a novel therapeutic target in multiple myeloma*. *Blood*, 2010. **116**(9): p. 1460-8.
34. Foster, F.M., et al., *The phosphoinositide (PI) 3-kinase family*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 15): p. 3037-40.
35. Lannutti, B.J., et al., *CAL-101, a p110 $\delta$  selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 591-4.
36. Cantley, L.C., J.A. Engelman, and K.-K. Wong, *The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway*. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1655-1657.
37. Wong, K.-K., J.A. Engelman, and L.C. Cantley, *Targeting the PI3K signaling pathway in cancer*. *Current opinion in genetics & development*, 2010. **20**(1): p. 87.
38. Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4752-4765.

## BIBLIOGRAFÍA

39. De Miguel, D., et al., *Liposomes Decorated with Apo2L/TRAIL Overcome Chemoresistance of Human Hematologic Tumor Cells*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(3): p. 893-904.
40. De Miguel, D., et al., *Immunotherapy with liposome-bound TRAIL overcomes partial protection to soluble TRAIL-induced apoptosis offered by down-regulation of Bim in leukemic cells*. Clinical and Translational Oncology, 2015. **17**(8): p. 657-667.
41. Dienstmann, R., et al., *Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(5): p. 1021-31.
42. Fruman, D.A. and L.C. Cantley, *Idelalisib--a PI3Kdelta inhibitor for B-cell cancers*. N Engl J Med, 2014. **370**(11): p. 1061-2.
43. De Miguel, D., et al., *Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells*. Leukemia Research, 2015. **39**(6): p. 657-666.
44. De Miguel, D., et al., *Improved Anti-Tumor Activity of Novel Highly Bioactive Liposome-Bound TRAIL in Breast Cancer Cells*. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2016. **11**(2): p. 197-214.
45. De Miguel, D., et al., *TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-small cell lung cancer cells*. Nanotechnology, 2016. **27**(18): p. 185101.
46. Fandy, T.E., et al., *Flavopiridol synergizes TRAIL cytotoxicity by downregulation of FLIPL*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2007. **60**(3): p. 313-319.
47. Rosato, R.R., et al., *Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation*. Leukemia, 2004. **18**(11): p. 1780-1788.
48. Lemke, J., et al., *Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1*. Cell Death Differ, 2014. **21**(3): p. 491-502.
49. Nguyen, T.K. and S. Grant, *Dinaciclib (SCH727965) Inhibits the Unfolded Protein Response through a CDK1- and 5-Dependent Mechanism*. American Association for Cancer Research, 2014. **13**(3): p. 662-674.
50. Obeng, E.A., et al., *Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4907-4916.
51. Flynn, J.M., et al., *Update on the Phase I Study of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib (SCH 727965) In Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Confirmation of Clinical Activity and Feasibility of Long-Term Administration*. Blood, 2010. **116**(21): p. 1396-1396.