

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Combinación de los inhibidores del proteasoma y
TRAIL como tratamiento antitumoral del
Mieloma Múltiple**

**Trabajo de fin de máster
2016-2017**

Autora: Ruth Soler Agesta

Directores: Ana Gallego Lleyda, Luis Martínez Lostao

Ponente: Javier Naval Irraberi

Abreviaturas seleccionadas

ΔΨ_m, potencial de membrana mitocondrial

ABB, tampón de unión de anexina (Annexin-Binding Buffer)

Apaf-1, factor activador de proteasas apoptóticas (Apoptotic protease activating factor 1)

Apo2L/TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TNF-Realated Apoptosis-Inducing Ligand)

BCA, Bicinchoninic Acid Assay

Bcl-2, B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 gene

BH, Bcl-2 Homology

cFLIP, proteína celular inhibitoria de FLICE (cellular FLICE Inhibitory Protein)

CRF, carfilzomib

dATP, desoxiadenosina trifosfato

DcR1/2, receptor señuelo 1/2 (Decoy Receptor 1/2)

DD, dominio mortal (Death Domain)

DED, dominio efector de muerte

DISC, complejo señalizador inductor de muerte (Death-Inducing Signaling Complex)

DMSO, dimetilsulfoxido

DOGS-NTA-Ni, (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3 {[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid]succinyl})

DR4/5, receptor mortal 4/5 (Death Receptor 4/5)

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FADD, dominio de muerte asociado a Fas (Fas-associated Death Domain)

IAPs, inhibidores de proteasas apoptóticas (Inhibitor of Apoptosis Protein)

Ig, inmunoglobulina

IL-6, interleuquina 6

LUV, Large Unilamellar Vesicle

LUV-TRAIL, Large Unilamellar Vesicle -TRAIL

Mcl-1, Myelod cell leukaemia-1

MLVs, Multillamelar Large Vesicles

MM, Mieloma Múltiple

MTT, bromuro de dimetil-tiazolil-difeniltetrazolio

NF-KB, factor nuclear KB (Nuclear Factor- KB)

NK, Natural Killer

OPG, osteoprotegerina

PARP1, poliadenosina difosfato ribosa polimerasa

PBS, suero fisiológico (Phosphate Buffered Saline)

PS, fosfatidilserina (PhosphatidylSerine)

PVDF, polyvinylidene difluoride

ROS, especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

rTRAIL-His₆, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF recombinante con cola de histidinas

SBF, suero fetal bovino (Scalf Bovine Serum)

SDS, dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulphate)

SMAC/DIABLO, Second Mitochondrial Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pl

sTRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF bajo forma soluble

TEMED, N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina

TNF, Tumor Necrosis Factor

TNF-α, factor de necrosis tumoral tipo α (Tumor Necrosis Factor- α)

XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Z-VAD-fmk, benciloxicarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona

Índice

1. Introducción	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Mieloma múltiple	1
1.2.1 Definición, características e incidencia	1
1.2.2 Sintomatología del MM.....	3
1.2.3 Diagnóstico, marcadores y clasificación.....	4
1.2.4 Terapias actuales contra el MM.....	4
1.2.5 Nuevas terapias contra el cáncer	5
1.3 Muerte celular programada o apoptosis	6
1.3.1 Vía intrínseca o mitocondrial:	7
1.3.2 Vía extrínseca	8
1.3.3 Apo2L/TRAIL.....	10
1.3.4 LUVs-TRAIL	12
1.3.5 Proteasoma	14
1.4 Antecedentes	16
1.5 Objetivos	17
2. Materiales y métodos	18
2.1 Cultivos celulares.....	18
2.2 Congelación y descongelación de células	18
2.2 Preparación de los LUVs y los LUV-TRAIL.....	19
2.4 Ensayo de viabilidad celular	19
2.5 Ensayo de citotoxicidad mediante citometría de flujo	20
2.6 Expresión de los receptores DR4 y DR5	21
2.7 Análisis de proteínas mediante <i>Western-blot</i>	22
2.8 Microscopía de fluorescencia.....	24
2.9 Análisis estadístico	25
3. Resultados.....	26
3.1 Carfilzomib inhibe la proliferación celular en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	26
3.2 Carfilzomib induce apoptosis en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	27
3.3 Estudio de la citotoxicidad de sTRAIL y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	30

3.4 El efecto de carfilzomib aumenta la expresión de los receptores de TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	33
3.5 Análisis proteico del efecto del tratamiento combinado de carfilzomib y TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	37
3.6 Estudio de la citotoxicidad inducida por los tratamientos combinados de carfilzomib con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	39
3.7 Estudio de la activación de la vía extrínseca por TRAIL en la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple	42
4. Discusión.....	44
5. Conclusiones.....	48
6. Conclusions	49
7. Bibliografía	50
8. Anexo	52
8.1 Composición del gel de poliacrilamida-SDS	52
8.2 Composición de los LUVs	52

Resumen

El cáncer es una de las patologías más comunes y con mayor tasa de mortalidad, entre las cuales encontramos el mieloma múltiple (MM), un tipo de cáncer hematológico que representa el 10% de neoplasias sanguíneas y afecta principalmente a mujeres de raza negra con una edad media de diagnosis de entre 65 y 70 años.¹

Durante años, los tratamientos clásicos utilizados para tratar esta patología han sido los agentes alquilantes, que inhiben la replicación del ADN, los glucocorticoides, que aumentan la expresión de genes proapoptóticos como Bim², o el trasplante de células autólogas.

Actualmente, los fármacos inhibidores del proteasoma son el tratamiento estándar para tratar el MM, entre los cuales se encuentra carfilzomib. Este fármaco de segunda generación parece tener un efecto positivo en la regresión de las células mielomatosas gracias a un mecanismo de acción bloqueando el proteasoma. En estudios realizados con carfilzomib se ha constatado que además de activar la muerte celular a través de vía intrínseca, esta droga podría tener un efecto sensibilizante a la terapia con ligandos mortales, en concreto con Apo2L/TRAIL. Este ligando mortal, utilizado previamente en ensayos para el tratamiento de otros cánceres, es capaz de activar la vía extrínseca de la apoptosis en células que expresan sus receptores mortales DR4 y DR5³.

En la última década, la inmunoterapia basada en el uso de ligandos mortales ha evolucionado hasta el punto de desarrollar diferentes formulaciones de ligando mortal TRAIL (bajo una forma soluble recombinante, asociado a liposomas, etc.) con el objetivo de potenciar su citotoxicidad en una gran variedad de células cancerosas⁴.

En este trabajo se plantea el estudio del mecanismo de inducción de apoptosis de una terapia que combina carfilzomib con diferentes formulaciones de TRAIL en líneas celulares tumorales humanas de MM.

Summary

Cancer is one of the most common pathologies with the highest mortality rate, including multiple myeloma (MM), a type of hematologic cancer that represents 10% of blood neoplasm and mainly affects black women with an average age of diagnosis between 65 and 70 years¹.

Over the years, the classical treatment used to treat this pathology has been alkylating agents, which blocks the DNA replication, glucocorticoids, which increase the expression of proapoptotic proteins such as Bim², or transplantation of autologous cells.

Currently, proteasome inhibitor drugs are the standard treatment for MM, including carfilzomib. This second generation drug has a positive effect on the regression of myeloma cells through a proteasome blocking mechanism. In studies performed with carfilzomib, it has been observed that in addition to activating cell death mediated by intrinsic pathway of apoptosis, it could have a sensitizing effect combined with therapy using deadly ligands, specifically Apo2L/ TRAIL. This deadly ligand, previously used in trials in order to treat other cancerous pathologies, has a power of action in the activation of the extrinsic pathway of apoptosis in cells expressing the DR4 and DR5 deadly receptors³.

In the last decade, immunotherapy based on the use of deadly ligands has evolved to the point of developing different formulations of deadly ligand TRAIL (in a soluble recombinant form, associated with liposomes, etc.) with the aim of increasing its cytotoxicity in a great variety of cancer cells⁴.

In this work we have analyzed the mechanism of induction of apoptosis in combinatorial therapy with carfilzomib and different formulations of TRAIL in multiple myeloma.

1. Introducción

1.1 Cáncer

Una de las características de las células tumorales es su capacidad de escapar de la señalización de la apoptosis, regulada por el sistema inmunitario y así proliferar de manera descontrolada. La mayoría de células cancerosas tienen esta vía de señalización de muerte alterada, siendo la principal causa de estas anomalías las alteraciones genéticas entre las que destaca la mutación o delección del gen de supresión tumoral p53⁵.

Igualmente existen otros factores que intervienen en el desarrollo de esta patología, entre los cuales se encuentran mutaciones genéticas que intervienen de manera directa en la cascada de señalización de la apoptosis. Un ejemplo es la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 que se encuentran como punto de regulación negativa en la vía intrínseca de la apoptosis. En concreto, se ha constatado que la proteína Mcl-1 de la familia Bcl-2 se expresa de manera elevada en células tumorales del mieloma múltiple (MM)⁶.

La intervención de múltiples factores en la regulación post-transcripcional de la expresión de estos genes hace que su estudio sea más complicado y laborioso. Uno de los factores conocidos es el proteasoma, un complejo proteico que se encarga de eliminar las proteínas defectuosas y mantener la homeostasis celular. Este complejo citosólico tiene un papel fundamental en la regulación proteica y por lo tanto suele ser una diana potencial para el tratamiento de diversas patologías incluido el cáncer. Sus características y funciones serán detalladas a lo largo de este trabajo.

1.2 Mieloma múltiple

1.2.1 Definición, características e incidencia

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica localizada en la médula ósea de los huesos largos. Se caracteriza por la proliferación maligna de células plasmáticas (células B diferenciadas) genotípicamente alteradas, derivadas de un clon, habitualmente con capacidad de sintetizar y secretar grandes cantidades de unas inmunoglobulinas monoclonales. Estas células se acumulan en distintos puntos de la médula ósea formando los

plasmocitomas, llegando a dañar la estructura del hueso. En estadios más avanzados pueden incluso diseminarse en otros órganos y encontrarse en el torrente sanguíneo dando origen a una leucemización del MM.

Como se ha dicho, esta enfermedad deriva de una célula B con una alteración cariotípica, hallada en el centro germinal de la médula, pudiendo evolucionar a mieloma intramedular pasando por un estadio de mieloma "latente". El mieloma intramedular se asocia a un número elevado de células plasmáticas anormales en distintos lugares del hueso, angiogénesis anómala, anemia, disfunciones renales y lisis parcial del tejido óseo. En estadios más avanzados el tumor puede llegar a colonizar el sistema vascular, el líquido pleural y la piel. En este estadio de la enfermedad se habla de mieloma extramedular (fig.1). Para que se produzca este cambio, las células mielomatosas deben crecer y diferenciarse en un micro-ambiente favorable. Este micro-ambiente medular está compuesto por una matriz extracelular que alberga distintos tipos celulares. Las interacciones positivas y negativas entre las mismas y las células mielomatosas son mediadas por citoquinas y otras moléculas que permiten la supervivencia y desarrollo tanto de las células cariotípicamente normales como de las anormales⁷.

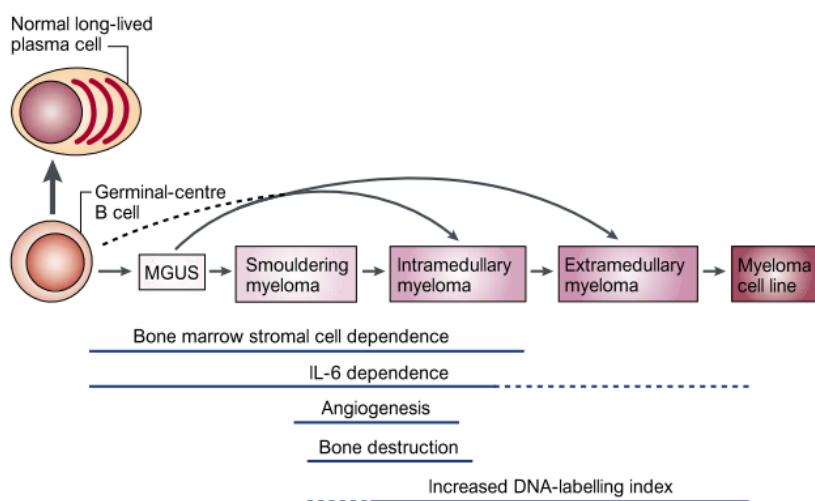


Figura 1. Estadios del mieloma múltiple. La célula B precursora deriva del centro germinal de la médula ósea. Su transformación en MGUS (gammapatía monoclonal de significación indeterminada), un estadio premaligno donde las células son tumorales pero aún no proliferan. Tras esta etapa, aparece el mieloma múltiple latente (smouldering myeloma) donde un porcentaje de las células empiezan a proliferar. Finalmente aparece el mieloma intramedular que evoluciona a mieloma extramedular para acabar provocando una leucemia de células plasmáticas⁷.

La característica principal de una célula mielomatosa es la producción de una inmunoglobulina monoclonal llamada proteína M o para-proteína con secuencias anormales de aminoácidos en sus cadenas ligeras. Esta proteína se encuentra en exceso en la sangre y

orina e interfiere en diversas propiedades de la sangre, en el normal funcionamiento de los riñones y favorece el desarrollo de infecciones. El exceso de células plasmáticas puede lesionar los huesos y llegar a desplazar a las células sanas de la médula ósea¹.

La esperanza de vida media de los afectados sin tratamiento es de entre tres a cuatro meses. Se considera como la segunda neoplasia hematológica más común en la población y la primera en términos de mortalidad. El mieloma múltiple constituye la neoplasia de células plasmáticas más frecuente y suele afectar predominantemente a personas de edad avanzada, siendo la media de edad 65 años⁸.

1.2.2 Sintomatología del MM

El MM puede tener un cuadro clínico muy variado. Esta neoplasia puede permanecer de manera asintomática durante un largo periodo de tiempo cuando el MM se encuentra en estadio “latente” y los síntomas que permiten el diagnóstico no suelen aparecer hasta estadios más avanzados. Esta es la razón por la cual se dificulta un diagnóstico precoz y tratamiento temprano, como puede ser una extracción quirúrgica que permitiría eliminar el tumor antes de producirse metástasis y agravar el pronóstico del paciente. El síntoma más evidente es el dolor óseo pero puede variar en función de una gran cantidad de factores. A continuación se mencionan los síntomas más comúnmente observados:

-Alteraciones óseas debido a una destrucción del hueso por lo que los pacientes pueden sufrir dolores, fragilidad y fracturas. La destrucción del hueso viene acompañada por un aumento de calcio en la sangre y la orina.

-Alteración renal: Los riñones sufren disfunción tubular lo que propicia la pérdida de proteínas mediante la orina (proteinuria).

-Aumento de la cantidad de proteínas en sangre como la β2-microglobulina, IL-6 y proteína C reactiva en suero y disminución de la concentración sérica albúmina.

-Alteraciones en el hemograma debido al desplazamiento de las células precursoras hematopoyéticas en la médula. De hecho, el 75% de los pacientes sufren anemia.

-Disfunción neurológica por la compresión de la médula espinal debido a la invasión de plasmocitomas. El síntoma más común suele ser dolor de cabeza, visión borrosa y vértigos.

-Susceptibilidad a contraer infecciones bacterianas por un descenso de la producción de inmunoglobulinas normales.

1.2.3 Diagnóstico, marcadores y clasificación

Los marcadores de pronóstico suelen ser niveles elevados en sangre de β 2-microglobulina y de proteína C reactiva, la presencia de un gran número de células mielomatosas y un aumento de la microvascularización de la médula ósea. Para ello se realizan hemogramas completos, análisis de orina en búsqueda de proteínas, biopsias medulares y estudio del estado óseo mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía axial computarizada (TAC).

Con el fin de diferenciar los diferentes estadios de la enfermedad se ha establecido un sistema internacional de clasificación:

Clasificación internacional	
Estadio I	β 2-microglobulina sérica < 3,5mg/ml Albúmina sérica > 3,5g/dl
Estadio II	β 2-microglobulina sérica 3,5 - 5,5mg/ml y albúmina normal o albúmina sérica < 3,5g/dl y β 2-microglobulina sérica < 3,5mg/ml
Estadio III	β 2-microglobulina sérica > 5,5mg/ml

Tabla 1. Clasificación internacional de los estadios clínicos del mieloma múltiple⁹.

1.2.4 Terapias actuales contra el MM

A lo largo de estos últimos años, han sido muchos los esfuerzos que se han llevado a cabo para elucidar los mecanismos celulares que se encuentran implicados en el desarrollo de esta enfermedad para identificar nuevas dianas terapéuticas.

Actualmente se ha conseguido alargar la esperanza y calidad de vida de los pacientes pero a pesar de las terapias que se han desarrollado sigue siendo una enfermedad incurable. El

tipo de terapia elegida para tratar un paciente depende principalmente del estadio en el que se encuentra la enfermedad, pero también de la posibilidad de un trasplante hematopoyético después de administrar dicho tratamiento. A continuación se citan brevemente las terapias más comúnmente utilizadas:

- Quimioterapia y radioterapia
- Trasplante de precursores hematopoyéticos
- Tratamiento de mantenimiento

Durante un largo periodo de tiempo se ha utilizado la quimioterapia, cuyo objetivo es frenar la proliferación e inducir la muerte de las células tumorales, siendo los fármacos como el melfalán y la prednisona los tratamientos por excelencia del MM¹. El principal problema de estas terapias es que no sólo atacan a las células cancerosas sino que provocan la muerte y la inhibición del crecimiento de las células sanas. Además de su citotoxicidad en tejidos sanos, las células cancerosas acaban adquiriendo en muchos casos resistencia a estas terapias de modo que las células cancerosas puedan seguir dividiéndose⁴.

1.2.5 Nuevas terapias contra el cáncer

En la investigación relativa al cáncer se ha desarrollado nuevas terapias antitumorales, más selectivas, que han llegado hasta diferentes fases en ensayos clínicos siendo los tratamientos basados en la inmunoterapia, una alternativa adecuada por su menor toxicidad y mayor selectividad.

Entre las alternativas terapéuticas basadas en la inmunoterapia cabe destacar la terapia celular adoptiva, los anticuerpos monoclonales, las vacunas de células dendríticas y las vacunas de DNA. Su objetivo general es la activación del sistema inmunitario del paciente contra antígenos propios de las células cancerosas, consiguiendo así un menor daño de las células sanas.

Un ejemplo de inmunoterapia pasiva es el uso de ligandos mortales como FasL o Apo2L/TRAIL. Estos ligandos mortales son secretados por las células citotóxicas del sistema inmune durante su acción antitumoral y activan la vía extrínseca de la apoptosis en las células cancerosas¹⁰. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la activación de la vía Fas-FasL en un

modelo experimental en ratones indican que el tratamiento con FasL es letal debido a su gran hepatotoxicidad¹¹.

El descubrimiento del ligando mortal Apo2L/TRAIL (TRAIL) impulsó de nuevo la idea del uso de los ligandos mortales como terapia antitumoral al revelarse como un ligando mortal capaz de inducir apoptosis en células tumorales pero no en células normales¹² y no presentar hepatotoxicidad *in vivo*¹³. Sin embargo, se observó que la forma soluble de esta proteína (sTRAIL) empleada como agente terapéutico no tenía un efecto citotóxico significativo debido a su inestabilidad y unas propiedades físico-químicas limitadas, por lo que finalmente no superó los ensayos clínicos más allá de fase 2¹⁴.

1.3 Muerte celular programada o apoptosis

La apoptosis es una vía de muerte celular programada en organismos eucariotas multicelulares superiores con el fin de controlar el desarrollo, crecimiento y homeostasis de la célula. La principal función de la apoptosis en un individuo adulto es la eliminación de aquellas células que han sufrido un daño irreparable. Esta interviene también en fenómenos tan esenciales como la separación de los dedos de las manos durante el desarrollo embrionario de *Homo sapiens*. Durante el desarrollo embrionario la apoptosis es un fenómeno esencial para la modelar distintas partes del organismo pero en individuos adultos interviene fundamentalmente en el mantenimiento de la homeostasis celular de modo que alteraciones en la apoptosis se asocian a patologías severas en las cuales se encuentra el cáncer. En este último caso la vía de la apoptosis se encuentra afectada o la célula ha desarrollado mecanismos para evadir las señales apoptóticas y así poder proliferar de manera descontrolada.

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías celulares: la primera, **la vía extrínseca** activada por una señal exterior a la célula y la segunda, **la vía intrínseca** activada tanto por una señal de origen interno como por la vía extrínseca mediante la activación de la proteína citosólica Bid.

En ambas vías intervienen las caspasas, unas proteínas de la familia de las cisteín proteasas con especificidad de corte después de un ácido aspártico. Entre ellas se encuentran las caspasas iniciadoras como la -8 y -10 y las efectoras como la -3, -7 y -9. Para alcanzar su forma activa, la forma no activa, llamada también procaspasa, debe de sufrir un corte entre

certos dominios lo que propicia la posterior formación de un heterotetrámero que resulta ser la forma activa de las caspasas¹⁵.

La actividad de estas está regulada por proteínas como las IAPs, entre las cuales se encuentra XIAP capaz de unirse a las caspasas ejecutoras promoviendo su degradación o la proteína cFLIP capaz de inhibir la activación de la caspasa-8¹⁶.

El inicio de la apoptosis debuta con la condensación del citosol y la compactación de la cromatina (picnosis) originando agregados en las proximidades de la membrana celular. Seguidamente las endonucleasas digieren el ADN en fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases. Al mismo tiempo, el retículo endoplásmico se dilata y forma vesículas que fusionan con la membrana celular dándole una morfología característica (*blebbing*). Finalmente la célula se divide en fragmentos llamados cuerpos apoptóticos que expresan la señal “cómeme” que consiste en la exposición de la fosfatidilserina en la membrana externa de la célula. Esta señal será reconocida por los macrófagos que acabarán por fagocitar la célula¹⁷. El resultado final es una muerte *limpia*, sin que el material citoplasmático salga al exterior de la célula y por tanto sin la generación de un proceso inflamatorio.

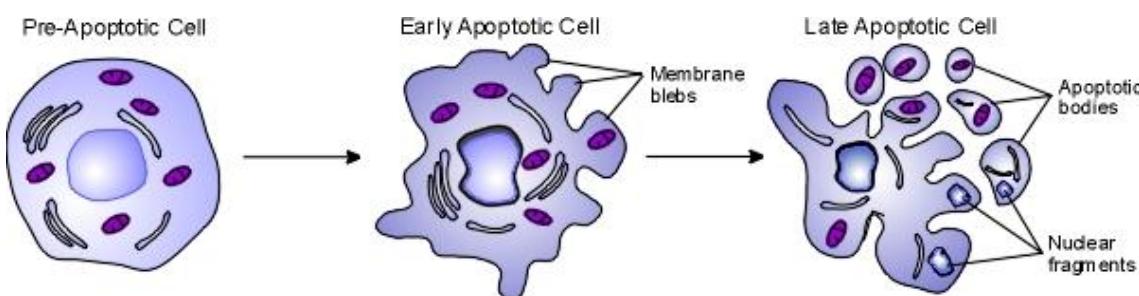


Figura 2. Evolución de la morfología celular durante el proceso de apoptosis. Modificado de Universidad de Toronto

1.3.1 Vía intrínseca o mitocondrial:

La vía intrínseca de la apoptosis es la vía más conservada en términos evolutivos, también conocida como vía mitocondrial, ya que el principal punto de regulación es la mitocondria. Se trata de una muerte celular autónoma, propia a la célula, en respuesta a determinados estímulos (ausencia de factores de crecimiento, radiaciones ionizantes, estrés oxidativo (ROS), daño en el ADN, etc)¹⁷.

Tras un determinado estímulo dañino para la célula, las proteínas de la familia Bcl-2, Bax y Bak, dimerizan, formando un poro en la membrana mitocondrial externa provocando la liberación de citocromo c y SMAC/DIABLO. El escape de estas moléculas al citoplasma provoca una caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El citocromo c junto a Apaf-1, dATP y la procaspasa-9 forman un complejo llamado Apoptosoma en la que se activa la casapasa iniciadora-9. La presencia de SMAC/DIABLO en el citosol le permite interaccionar con los IAPs (inhibidores de caspasas), inhibiendo su función y como consecuencia permitiendo la activación de las caspasas.

Esta ruta celular se controla gracias a proteínas reguladoras entre las cuales encontramos las de la familia Bcl-2, las cuales se agrupan en tres subfamilias definidas por su homología en cuatro dominios BH1, BH2, BH3 y BH4:

-Proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1). Estas actúan asociándose a las proteínas pro-apoptóticas e inhibiendo su acción.

-Proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax y Bak). Activadas por un estímulo apoptótico, Bax (que se encuentra en el citosol) y Bak (asociada a la membrana mitocondrial) dimerizan formando canales en la membrana mitocondrial.

-Proteínas pro-apoptóticas solo BH3 (Bid, Bad, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOXA, entre otras). Poseen dos funciones, la primera consiste en su asociación con las proteínas anti-apoptóticas inhibiendo su función (en concreto, Bim y PUMA) y la segunda asociándose directamente a las proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax y Bak)¹⁸.

1.3.2 Vía extrínseca

La activación de esta vía de la apoptosis es provocada por la unión de los ligandos mortales FasL y Apo2L/TRAIL a sus receptores de membrana. Estos ligandos mortales pertenecientes a la familia TNF (*Tumor Necrosis Factor*) se unen a sus receptores específicos (pertenecientes a la familia del receptor de TNF) expresados en la superficie celular iniciando así esta vía apoptótica.

Los receptores de los ligandos mortales tienen un dominio intracelular DD que interacciona con el dominio DD de la proteína adaptadora FADD. A su vez, FADD contiene los dominios efectores de muerte (DED), que son capaces de interaccionar con los dominios DED

de las procaspasas iniciadoras -8 y-10. La interacción homotípica entre estas proteínas forma el complejo llamado DISC⁴.

En el caso de Apo2L/TRAIL, su unión a sus receptores mortales (DR4 o DR5), induce oligomerización de estos y el reclutamiento de varias proteínas entre las cuales se encuentra cFLIP (FADD-Like Interleukin-1-β-converting enzime (FLICE)-inhibitory protein). Esta proteína presenta varias isoformas con dominios DED de estructura similar a la parte N-terminal de la procaspasa-8 que son reclutados por el DISC y pueden competir con las caspasas iniciadoras en su unión a FADD¹⁹.

La activación de la procaspasa-8 induce a la activación de las procaspasas efectoras -3 y -7 y en algunos casos la activación de la vía intrínseca mediante el procesamiento de la proteína Bid generando Bid truncado (tBid). Esta proteína es el punto de unión entre la vía extrínseca y la intrínseca y es la responsable de la dimerización de las proteínas Bax y Bak y de la formación de un poro en la membrana mitocondrial (MOMP).

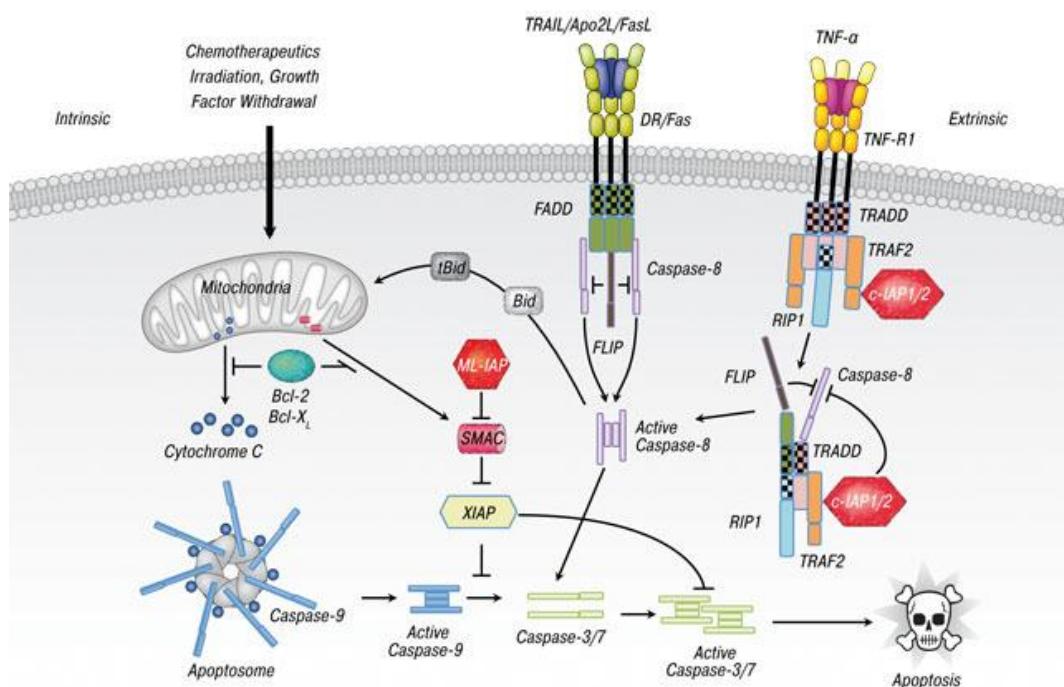


Figura 3. Esquema de la conexión de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Tal y cómo se puede apreciar, un gran número de proteínas intervienen en la regulación de cada una de las etapas. Por ejemplo, Bcl-2 puede inhibir la liberación del citocromo c o la activación de la proteína SMAC/DIABLO. Otro ejemplo es la proteína XIAP que inhibe la activación de la caspasa-3 y -7 por la caspasa-9²⁰.

Según la activación de esta conexión, se ha descrito que en condiciones *in vitro*, las células pueden clasificarse en dos tipos. En las células del tipo I la presencia de la caspasa-8 activa es suficiente para la activación de la caspasa-3 y así inducir la apoptosis. En cambio en las células de tipo II la forma activa de la caspasa-8 no es suficiente para activar la caspasa-3 y por lo tanto es necesaria la activación de la vía intrínseca para reforzar la señal¹⁶.

1.3.3 Apo2L/TRAIL

Apo2L/TRAIL (a partir de ahora referido como TRAIL) es un ligando mortal de la familia TNF, capaz de inducir de manera natural y específica la activación de la vía extrínseca en células tumorales de forma independiente de Fas. Se trata de una proteína compuesta por 281 aminoácidos secretada por células del sistema inmunológico (linfocitos T activados, células NK, células dendríticas, macrófagos) codificada por el gen TNFSF10 que se halla en el cromosoma 3q26. Su peso molecular en forma de monómero es de aproximadamente 32,5 kDa pero su forma completamente glicosilada tiene una masa de 41 kDa.

Se trata de una proteína homotrimérica, cuyos monómeros están formados por dos barriles beta antiparalelos. En el centro de esta se encuentra un átomo de zinc, rodeado por cada monómero, importante en la estabilidad, solubilidad y actividad de la proteína²¹.

TRAIL tiene cuatro receptores de membrana: **DcR1** o TRAIL-R3, **DcR2** o TRAIL R-2, **DR4** o TRAIL-R1, **DR5** o TRAIL-R2 y un receptor soluble, la osteoprotegerina (**OPG**), pero solo DR4 y DR5 son capaces de inducir la cascada de señalización de la apoptosis de una manera eficaz. En concreto, el receptor DR5 parece desempeñar un papel más importante que DR4 en ciertas patologías cancerosas como el MM. A la par, su localización y distribución en los “lipid-rafts” es esencial para una buena transducción de la señal apoptótica²².

En cuanto a la función de los receptores DcR1 y DcR2 no se conoce en profundidad pero parecen tener un efecto antagonista. Ciertos estudios apuntan que DcR2 induce la activación de la vía de supervivencia NF-KB. Estos receptores, también llamados receptores señuelo, carecen de un dominio mortal (DD) intracelular y compiten con los receptores DR4 y DR5 para su unión con TRAIL. Parece ser que la unión del ligando a los receptores DcR1 y DcR2 produce la internalización del ligando en la célula y por lo tanto evita que este pueda unirse a los receptores DR4 y DR5²³.

La forma fisiológica en la que TRAIL es secretado por los linfocitos T activados es como una proteína transmembrana, asociada a la bicapa lipídica de unas vesículas denominadas exosomas²⁴.

En el citoplasma de las células T activadas se encuentran cuerpos multivesiculares (MVB) que alojan en su interior exosomas lipídicos donde el ligando está unido a su membrana, asociados en trímeros. Cuando la célula es activada por la interacción con una célula presentadora de antígenos, los cuerpos multivesiculares se movilizan fusionándose con la membrana de la célula liberando los exosomas al exterior (fig.4)²⁵. De esta manera el trímero de TRAIL podrá unirse a tres receptores de membrana de una célula, inducir la formación del complejo supramolecular DISC e inducir la activación de la vía extrínseca de la apoptosis.

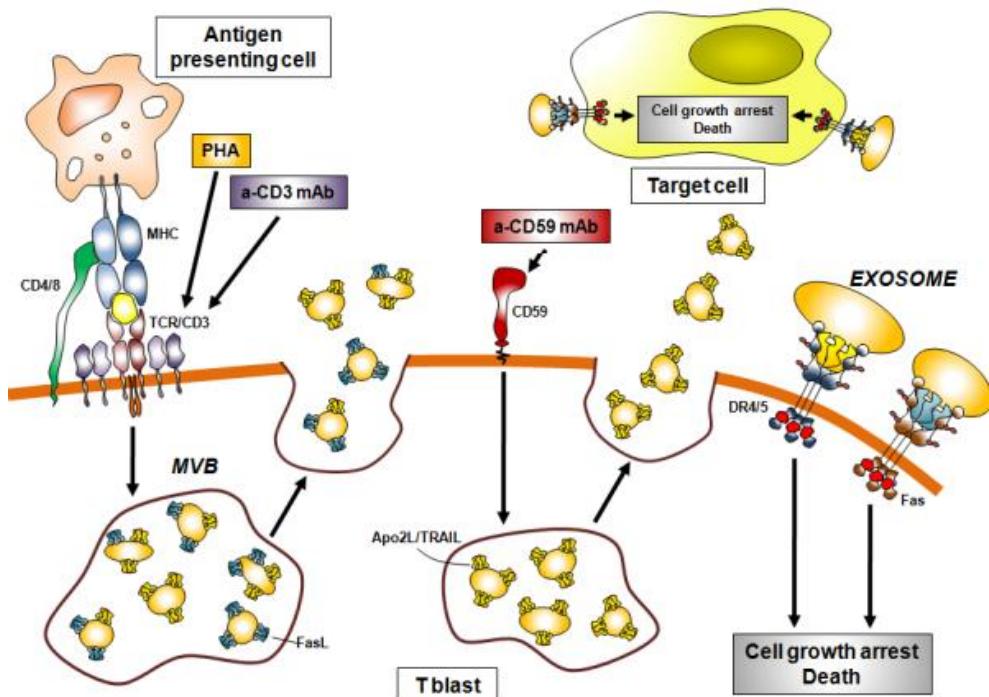


Figura 4. Esquema del mecanismo de secreción de TRAIL por una célula citotóxica. Martinez-Lostao L & Anel A, Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2011.³²

A parte de tener una función de activación de la apoptosis, se ha descrito que TRAIL interviene en vías llamadas pro-inflamatorias así como en la necroptosis. La activación del factor de transcripción NF-κB por parte del ligando implica una inhibición de la apoptosis, la

estimulación de la proliferación, la migración celular e invasión de tejidos en ciertas líneas cancerosas. Se ha observado que en condiciones de inhibición de las caspasas y por lo tanto del bloqueo de la apoptosis, TRAIL puede inducir necroptosis en algunos tipos celulares, de manera dependiente de la activación de la proteína PARP1. Esta proteína es también un sustrato de la caspasa-3 cuyo procesamiento indica el desmantelamiento de la célula²⁶.

1.3.4 LUVs-TRAIL

Como se ha indicado anteriormente, a pesar de las prometedoras expectativas del empleo de TRAIL como agente antitumoral, los ensayos clínicos empleando terapias basadas en este ligando mortal como el caso de la forma soluble de esta proteína (sTRAIL), mostraron que como agente terapéutico, TRAIL tenía un efecto citotóxico limitado debido a su inestabilidad y unas propiedades físico-químicas limitadas¹⁴. Es por ello que nuevas formulaciones de TRAIL con mayor bioactividad son necesarias para posibilitar el uso de ese ligando mortal como terapia antitumoral⁴.

Con la intención de aumentar el potencial citotóxico de TRAIL para su uso como terapia antitumoral, en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza se ha optimizado la generación de nanopartículas lipídicas asociadas a este ligando mortal. Estas nanopartículas llamadas LUV (*Large Unilamellar Vesicle*) están revestidas con Apo2L/TRAIL en su superficie externa imitando así el mecanismo de secreción fisiológico llevado a cabo por los linfocitos T activados descrito previamente²⁴.

En ensayos posteriores tanto *in vitro* como *in vivo*, se constató que la nueva formulación de Apo2L/TRAIL asociado a liposomas (LUV-TRAIL) tiene una mayor bioactividad, estabilidad y una unión más eficiente al receptor debido a la formación de un complejo supramolecular. Así se demostró que LUV-TRAIL tiene una mayor capacidad de inducir apoptosis *in vitro* en una gran variedad de tumores que expresan los receptores mortales DR4 y DR5 sin dañar a las células sanas (Revisado en De Miguel D et al, Cell Death Differ, 2016).

Para que esta terapia sea efectiva es imprescindible la correcta conformación y orientación espacial de TRAIL en la superficie de los liposomas, de forma a que se encuentren formando trímeros y puedan así interaccionar de manera eficiente con los receptores de membrana.

Los LUV están formados por una única bicapa lipídica, cuya composición detallada en el anexo, imita la de los exosomas secretados de manera fisiológica. Su tamaño es de 200 nm, en la superficie del cual se encuentra unido mediante un enlace de naturaleza iónica, una forma recombinante del ligando que corresponde a la porción soluble (rTRAIL-His₆) previamente purificado. Esta proteína compuesta por una cola de 6 histidinas en su extremidad C-terminal permite a la vez su purificación y su unión a los liposomas. La cola de histidinas establece un complejo de coordinación con el átomo de níquel del lípido DOGS-NTA-Ni (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3 {[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid]succinyl}) de tal manera que el rTRAIL permanece unido a la superficie de los liposomas permanentemente (fig.5).

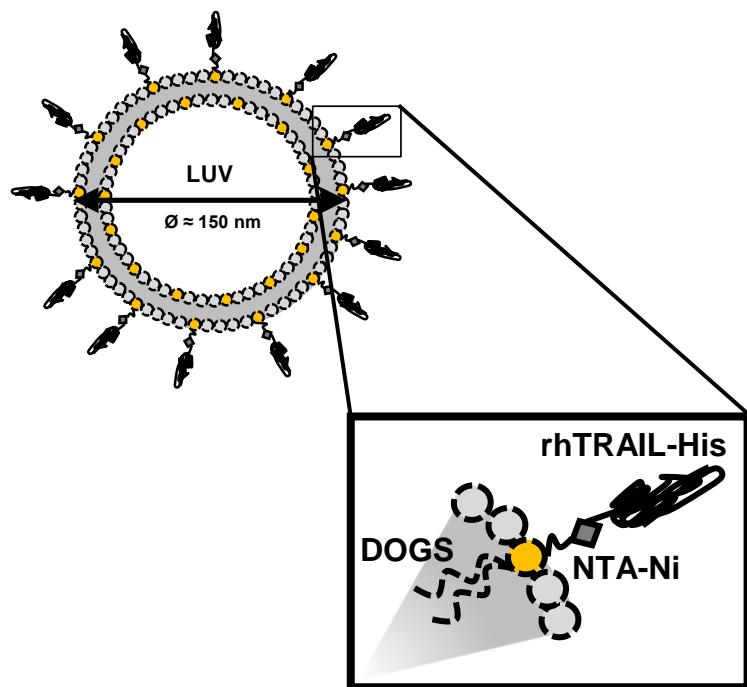


Figura 5. Esquema de la interacción entre el átomo de níquel y la cola de histidinas de rTRAIL formando LUV-TRAIL.

1.3.5 Proteasoma

El proteasoma 26S es un complejo proteico presente en células eucariotas, arqueas y algunas bacterias que se encarga de degradar las proteínas que se encuentran dañadas, mutadas, mal plegadas o ya no necesarias para la célula. Este complejo está formado por un núcleo 20S con diferentes sitios activos que se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos y una subunidad reguladora 19S. Para llevar a cabo su degradación es necesario que éstas sufran previamente una ubiquitinación, un proceso que consiste en su marcaje con la proteína ubiquitina. A continuación, la enzima ubiquitin-ligasa agrega ubiquitinas supplementarias, formando así una cadena poliubiquitínica que será reconocida por los receptores presentes en la subunidad 19S.

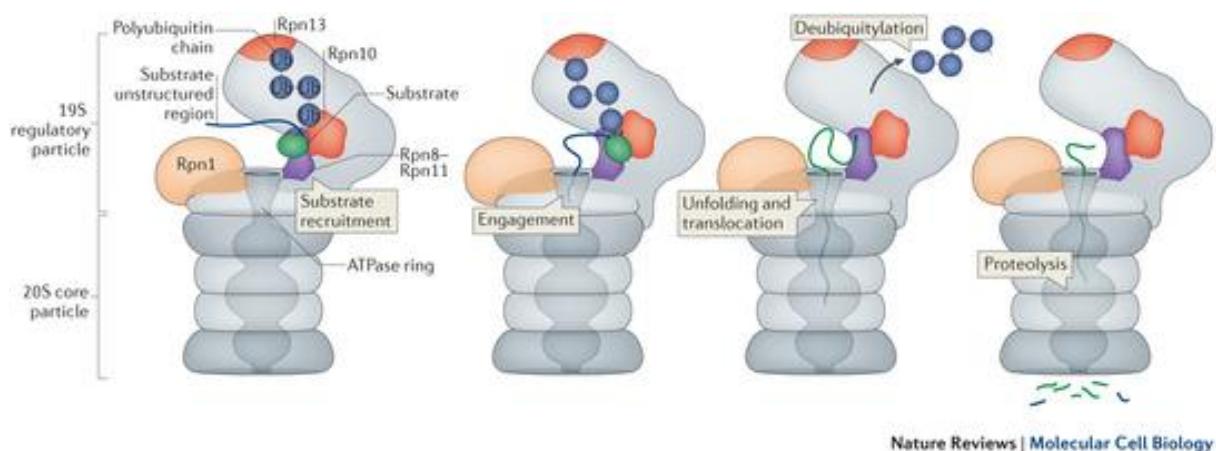


Figura 6. Proceso de degradación proteica. El proteasoma reconoce la proteína marcada por las ubiquitinas mediante sus receptores Rpn10 y Rpn13 e inicia la proteólisis. Las ATPasas impulsan la proteína a través del canal central de degradación, las ubiquitinas son eliminadas y la proteína es fragmentada²⁷.

Esta región se encarga de reconocer la cadena poliubiquitínica, desubiquitinárla e impulsar la proteína a través del canal proteolítico de la subunidad 20S. Este canal está compuesto por dos subunidades beta internas y dos subunidades alfa externas, ambas, en forma de anillos heptaméricos. Cada una de las subunidades beta presenta 3 sitios activos: $\beta 1$ con actividad caspasa, $\beta 2$ de tipo tripsina y $\beta 5$ de tipo quimiotripsina²⁸.

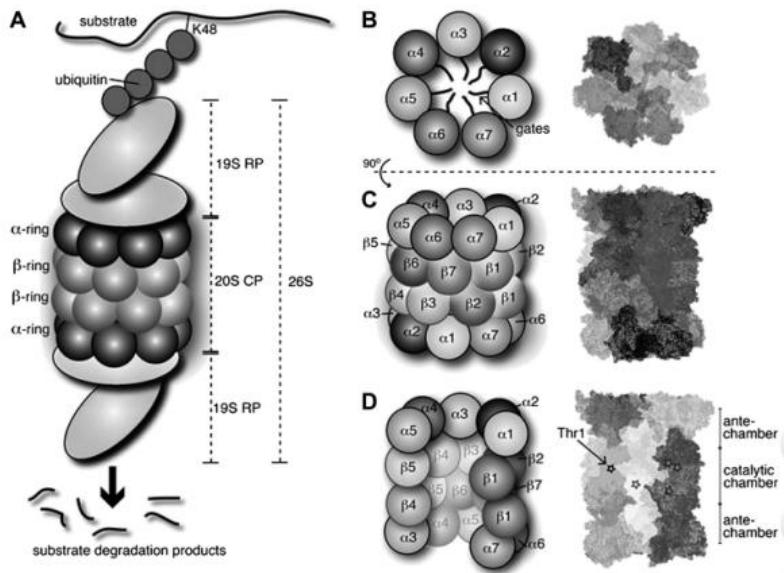


Figura 7. Esquema de la estructura del proteasoma 26S. A) Estructura general y función. B) Estructura vista desde arriba. C) Estructura externa. D) Estructura interna²⁸

Una de las características de las células tumorales es la necesidad de un recambio proteico más rápido comparado con las células sanas. En concreto, las células mielomatosas sintetizan grandes cantidades de immunoglobulinas anómalas, de modo que la inhibición de alguna de las subunidades del proteasoma desencadena la acumulación excesiva de proteínas provocando su muerte. Esta es la razón por la cual, los fármacos inhibidores del proteasoma son buenos candidatos para el tratamiento del MM.

El primer inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA para su uso en MM fue bortezomib. Este fármaco actúa en la subunidad $\beta 5$ de manera reversible pero a pesar de su potencial antitumoral, muchos de los pacientes han presentado resistencia o han desarrollado neuropatías²⁹. Por lo tanto, ha sido necesario desarrollar fármacos de segunda generación como carfilzomib, cuyo modo de acción se basa en inhibir la subunidad $\beta 5$ de manera irreversible. Carfilzomib se utiliza actualmente como tratamiento del MM y parece tener una mayor citotoxicidad frente a las células tumorales y menos efectos secundarios. Su mecanismo de acción parece ser análogo a bortezomib pero hasta la fecha no se ha elucidado por completo. En estudios recientes se ha demostrado que el mecanismo de carfilzomib en la inducción de la muerte celular está relacionado con la interacción de las proteínas PUMA y NOXA con Bax y Bak, la disminución del potencial mitocondrial, la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de la procaspasa 3, indicando que carfilzomib activa la vía intrínseca de la apoptosis³.

1.4 Antecedentes

Los fármacos inhibidores del proteasoma han sido ensayados *in vivo* e *in vitro* en combinación con otros fármacos con la esperanza de buscar efectos sinérgicos que aumentarían la citotoxicidad del tratamiento contra el cáncer. Entre estas combinaciones se ha observado que el empleo conjunto de carfilzomib y la chloroquina³ presenta un efecto claramente sinérgico *in vitro*.

En este mismo estudio se constató que carfilzomib tiene un efecto significativo en el incremento de los receptores mortales de TRAIL, DR4 y DR5, en líneas celulares MM.1S y U266 de mieloma³. Estos resultados llevan a pensar que una terapia que combinara el ligando mortal TRAIL junto con el fármaco carfilzomib potenciaría el efecto del tratamiento.

En este trabajo, la inmunoterapia basada en TRAIL combinada con carfilzomib se plantea como una estrategia para tratar el MM, con objetivo de observar un efecto citotóxico sinérgico, reduciendo así la dosis de fármaco quimioterapéutico y por lo tanto sus posibles efectos secundarios en futuros ensayos clínicos.

1.5 Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar si la combinación de carfilzomib con diferentes formulaciones de TRAIL tiene un efecto citotóxico sinérgico en mieloma múltiple. Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar el efecto de sTRAIL y LUV-TRAIL sobre las líneas celulares tumorales provenientes del mieloma múltiple (MM1.S y U266).
2. Analizar el efecto de carfilzomib sobre las líneas celulares provenientes de mieloma múltiple (MM1.S y U266).
3. Analizar el tipo de muerte celular inducido por los distintos tratamientos.
4. Evaluar si la combinación de carfilzomib con LUV-TRAIL y sTRAIL tiene un efecto citotóxico sinérgico en las líneas MM.1S y U266.
5. Estudiar los posibles mecanismos de la sensibilización por parte de carfilzomib a la muerte inducida por las distintas formulaciones de TRAIL.

2. Materiales y métodos

2.1 Cultivos celulares

Las líneas celulares tumorales humanas de MM.1S (linfoblastos B provenientes de una mujer de 42 años con MM) y U266 (linfocitos B tumorales provenientes de un varón de 56 años con MM) fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 (*Sigma*) con suplemento 10% de suero fetal bovino (SFB, *Sigma*), L-glutamina, penicilina (1000 U/ml), streptomicina (10mg/ml) (*PanBiotech*) (a partir de ahora denominado medio completo) en frascos de cultivo de 25 a 75 cm³ bajo condiciones estériles. Los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatizado (*Heraeus Cell*) a 37°C en aire saturado de humedad y con 5,6% de CO₂. El recuento de las células se efectuó aproximadamente cada 2 a 3 días y la viabilidad de estas se determinó con un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50i*) mediante el test de exclusión con azul tripán (*Sigma*) en una cámara de *Neubauer*. Este test se basa en la tinción de las células con la membrana dañada, lo que permite al colorante difundir en ellas dándoles una tonalidad azulada, permitiendo distinguir las células vivas de las muertas. La densidad de los cultivos se mantuvo entre 300.000 y 900.000 células/ml realizando subcultivos periódicos. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones estériles en una campana de flujo laminar vertical (*Telstar*).

2.2 Congelación y descongelación de células

La preservación y almacenamiento de las células se realizó en nitrógeno líquido o en congeladores a -80°C. Para ello se emplearon tubos de criopreservación en los cuales se añadieron aproximadamente 5x10⁶ células en un volumen de 1,5 ml de SFB suplementado con 10% de DMSO (*Sigma*) y se congelaron rápidamente.

La descongelación se realizó de manera gradual, añadiendo medio completo atemperado hasta aproximadamente 10-15 ml. La suspensión celular contenida en un tubo cónico de 15 ml se centrifugó a 600xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo completo.

2.2 Preparación de los LUVs y los LUV-TRAIL

La preparación de las nanopartículas lipídicas del tipo LUV (*Large Unilamellar Vesicle*) se realizó mezclando fosfatidílcolina, esfingomielina, colesterol y 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3 {[N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid]succinyl} (DOGS-NTA-Ni) disueltos en un solvente cloroformo/metanol (2:1) con los siguientes porcentajes 55:30:10:5 en un volumen final de 3 ml. A continuación se eliminó el disolvente cloroformo/metanol bajo una corriente de nitrógeno durante 10 minutos y posteriormente se dejó secar la muestra al vacío a 45°C durante 6h. Una vez seca la muestra se resuspendió en 3 ml de PBS, proceso que permite hidratar los lípidos para la formación de micelas, y se congeló con el objetivo de romper las distintas capas lipídicas que podrían haber generado MLVs (*Multi Lamellar Vesicle*). Finalmente se realizaron 10 ciclos de filtrado o extrusión a través de una membrana de policarbonato (*Whatman*) con una porosidad de 200 nm, bajo una corriente de nitrógeno, utilizando un Extruder (*Northen Lipids*). Este último paso permite obtener las vesículas de tipo LUV con un diámetro máximo de 200 nm. Estos se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

La preparación de las nanopartículas lipídicas revestidas con la proteína recombinante soluble (sTRAIL-His₆) previamente descrita en el apartado 1.3.4 se realizó mediante la incubación de 260 µl de sTRAIL purificado a partir de un plásmido pET-28c con 740 µl de LUVs en un baño de calor seco (*Selecta*) a 37°C durante 30 minutos a 800 xg. La muestra se almacenó a una temperatura de 4°C.

2.4 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular tras el tratamiento con carfilzomib (*Shellekchem*) en las líneas celulares MM.1S y U266 de MM se realizó el ensayo de *Mossman* (MTT, bromuro de dimetil-tiazolil-difeniltetrazolio, *Sigma*) en una placa de 96 pocillos con concentraciones seriadas del fármaco: 5, 10, 15 y 20 nM. Para ello se sembraron en cada uno de los pocillos 30.000 células en un volumen de 100 µl y se incubaron durante 24 horas a 37°C con las diferentes concentraciones del fármaco. Pasadas las 24 horas se añadió en cada uno de los pocillos 10 µl de MTT (5 mg/ml), un reactivo utilizado para evaluar la viabilidad celular en base a la capacidad de la de mantener la función de óxido-reducción. Las células activas convierten el MTT soluble en agua y en cristales de azul de formazán insolubles gracias a la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. De tal manera que cuanto mayor sea la

cantidad de células vivas mayor será la formación de cristales de formazán y por lo tanto mayor será la absorbancia espectrofotométrica en el pocillo. El reactivo MTT se incubó entre 2-3 horas hasta la formación de los cristales y posteriormente se solubilizaron en 100 µl de 2-propanol ligeramente acidificado con HCl 0,05 M. Finalmente se analizó la absorbancia a 550 nm de cada uno de los pocillos con un lector de placas ELISA (*Multiskan Ex*). En cada una de los puntos experimentales se realizaron cuadriplicados.

Para evaluar el porcentaje de viabilidad celular se restó el valor espectrofotométrico del blanco (medio de cultivo sin células) a los demás valores y se utilizó el valor del pocillo control como referencia. A partir de este valor se calcularon los demás porcentajes.

2.5 Ensayo de citotoxicidad mediante citometría de flujo

El fenómeno de apoptosis se puso en evidencia con anexina V-APC (purificada a partir de un plásmido y sintetizada en el laboratorio), un fluoróforo que en presencia de iones Ca²⁺ y Mg²⁺ se une de manera específica a la fosfatidilserina (PS) presente en la membrana externa de la célula. Para ello se sembraron 200.000 células/pocillo en una placa de 48 pocillos en los cuales se incubaron durante 24 horas con cada una las diluciones seriadas de carfilzomib (1-5, 10, 15 y 20 nM). Pasadas las 24 horas se transfirió cada punto a un tubo de citometría, los cuales se centrifugaron a 600 xg durante 5 minutos en una centrifugadora *Beckman and Coulter* (Rotor SX4750A). A continuación se eliminó el sobrenadante por inversión y se añadió en cada uno 2 µl de una dilución de anexina V-APC 1/25 disuelta en 49 µl de ABB 1x (*Annxin Binding Buffer (Sigma)*). Finalmente se incubó durante 15 minutos en la oscuridad, se añadieron 150 µl de PBS en cada punto y se analizó con el citómetro de flujo *FACSCalibur (BD Bioscience)* utilizando el canal FLH-4. Los datos fueron tratados con el programa *Flowjo* y *Prism*.

La citotoxicidad de la terapia combinada de carfilzomib junto con sTRAIL y LUV-TRAIL se evaluó mediante citometría de flujo. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas se puso en evidencia la exposición de la fosfatidilserina en la membrana externa de la célula gracias al fluoróforo anexina V-APC.

En este ensayo se sembraron 100.00 células/pocillo en una placa de 48 pocillos en los cuales se añadieron distintas dosis de carfilzomib (1,5 – 3 y 6 nM) y se dejaron incubando previamente 1 y 24 horas. Pasadas las horas de incubación se añadieron en los pocillos

correspondientes los fármacos sTRAIL y LUV-TRAIL a la concentración de un 1 µg/ml de manera a obtener todas las posibles combinaciones de fármaco: sTRAIL, LUV-TRAIL, sTRAIL + CRF 1,5 -3 y 6 nM y LUV-TRAIL + CRF 1,5 – 3 y 6 nM. Las distintas formulaciones de TRAIL se incubaron durante 16 y 24 horas. Así mismo se reservaron dos pocillos para el control y el control LUVs (1µg/ml), este último con el objetivo de verificar que los liposomas desnudos no tienen efecto citotóxico. Tras las incubación se transfirió cada punto a un tubo de citometría, los cuales se centrifugaron a 600xg durante 5 minutos en una centrifuga *Beckman and Coulter* (Rotor SX4750A). A continuación se eliminó el sobrenadante por inversión y se añadió en cada uno 2 µl de 1 dilución de anexina V-APC 1/25 disuelta en 49 µl de ABB 1x. Finalmente se incubó durante 15 minutos en la oscuridad, se añadieron 150 µl de PBS en cada punto y se analizó con el citómetro de flujo *FACSCalibur (BD Bioscience)* utilizando el canal FLH-4.

Para completar el estudio se realizó el mismo ensayo con una dosis fija de CRF (6 nM) combinando RIK (*BD Bioscience*) a 2,5 µg/ml, un agonista de TRAIL y Z-VAD-fmk (*BD Bioscience*) a 30 µM, un inhibidor general de caspasas. Tanto RIK como ZVAD se incubaron previamente durante una hora y *a posteriori* se añadió carfilzomib que se incubó durante 1 hora. Finalmente se añadieron los fármacos sTRAIL y LUV-TRAIL y se incubaron durante 16 y 24 horas. Todos los datos fueron tratados con el programa *Flowjo* y *Prism*.

2.6 Expresión de los receptores DR4 y DR5

La expresión de los receptores DR4 y DR5 tanto en células tratadas con distintas concentraciones de carfilzomib como sin tratar, se analizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos PE-Conjugated Anti-Human DR4 y DR5 (*eBioscience*) y Pierce Mouse IgG1 Isotype Control (*Thermo Scientific*). Para ello se sembraron en una placa de 6 pocillos, 1×10^6 células/pocillo resuspendidas un volumen de 2 ml de medio completo. Cada línea se incubó con concentraciones de 1,5 – 3 y 5 nM de fármaco y se reservó un pocillo con células sin tratar a modo de control de isotipo. Los análisis se realizaron a las 6 y 24 horas para las dosis 1,5 y 3 nM y 16 horas para la dosis 5 nM. Una vez pasado el tiempo de incubación se transfirió cada punto en un Falcon de 15 ml y se centrifugó a 600 xg durante 5 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS al 5% de SFB, el cual se transfirió a un Ependorff de 1,5 ml. Este último se volvió a centrifugar a 600xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 500 µl de PBS al 5% de SFB.

Finalmente se añadieron 100 µl de cada condición en una placa de 96 pocillos (control de isotipo, DR4, DR5, control de isotipo + carfilzomib, DR4 + carfilzomib y DR5 + carfilzomib).

En este experimento se utilizó una inmunoglobulina de tipo G del mismo isotipo que los anticuerpos utilizados contra los receptores, a modo de control de la fluorescencia inespecífica. La cadena variable de esta inmunoglobulina se une de manera inespecífica a los receptores Fc de superficie celular y por lo tanto la señal emitida por este permite eliminar aquellas señales provocadas por la unión inespecífica de los demás anticuerpos.

Para el marcaje con los anticuerpos se eliminó el medio de los pocillos centrifugando a 4105 xg durante 2 minutos y volcando la placa enérgicamente. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en PBS al 5% de SFB y se añadieron 50 µl en los respectivos pocillos. Estos se dejaron incubando durante 15 minutos a 4°C, un paso importante que evita que los anticuerpos sean internalizados en la célula y así puedan unirse a los receptores de superficie.

Con el fin de eliminar el excedente de anticuerpo tras el marcaje se realizaron 3 lavados con PBS al 5% de SFB. Finalmente se resuspendió el pellet en 150 µl de PBS y se transfirió cada punto a un tubo de citometría el cual se analizó posteriormente utilizando el canal FLH-4.

2.7 Análisis de proteínas mediante *Western-blot*

La técnica de Western-Blot permitió analizar la expresión de las proteínas cFLIP, caspasa 8 y 3, Bid, Mcl-1, XIAP y PARP1 en células del mieloma tratadas con las distintas combinaciones de fármaco (LUV-TRAIL, sTRAIL, carfilzomib 3nM para las células U266 y 1,5 para las células MM1S, carfilzomib 3nM y 1,5nM + sTRAIL y LUV-TRAIL).

Para ello se sembraron 20×10^6 células de cada línea en una placa de 6 pocillos resuspendidas en un volumen final de 12 ml. En cada uno de los pocillos se sembraron 2ml con aproximadamente $3,3 \times 10^6$ células, se trataron con las distintas combinaciones de fármacos y se incubaron durante 12 horas aproximadamente. Al día siguiente se evaluó la viabilidad celular de cada una de las condiciones mediante el test de exclusión azul tripán y se transfirió cada una a un Falcon de 15 ml que fue centrifugado a 600 xg durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de PBS estéril que fue transferido a un Ependorff de 1,5 ml para una segunda centrifugación a 600 xg durante otros 5 minutos. A continuación se eliminó el

sobrenadante cuidadosamente con una bomba de vacío y se añadieron 60 µl de una disolución 1x de tampón de lisis para la extracción de las proteínas (Triton-X-100 al 1%, *Sigma*; NaCl 150 mM, *Merck*; Tris/HCl 50 mM pH 7,6, *Sigma*; glicerol 10% v/v, *Scharlau*; EDTA 1mM, *Sigma*; ortovanadato sódico 1mM, *Sigma*; pirofosfato sódico 10 mM, *Sigma*; leupeptina 10 µg/ml, *Sigma*; fluoruro de sodio 10mM, *Sigma*; fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, *Sigma*) que se dejó actuar durante 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo de lisado se centrifugaron las muestras a 3724 xg durante 30 minutos a 4°C.

Finalmente se recogieron 60 µl del sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína mediante el ensayo BCA (*ThermoFisher*). Para ello se añadieron 2 µl de la muestra proteica junto a 100 µl de PBS y 100 µl del reactivo BCA en una placa de 96 pocillos y se dejó incubando 20 minutos a 60°C hasta la aparición de un color morado intenso. Posteriormente se midieron las absorbancias en cada uno de los pocillos con un lector de placas ELISA a 550 nm. Las absorbancias permitieron igualar las concentraciones de proteína en cada una de las muestras diluyendo las más concentradas con el tampón de lisis 1x. Finalmente se añadió ½ del volumen final de una disolución de tampón de lisado 3x (Tris/HCl 150 mM, *Sigma*; dodecilsulfato de sodio, SDS, *Merck*; molibdato de sodio 0,3 mM, *Sigma*; glicerol 30% v/v, *Scharlau*; pirofosfato sódico 30 mM, *Sigma*; fluoruro de sodio 30mM, *Sigma*; azul bromofenol 0,006 % p/v; 2-mercaptoetanol 30% v/v) y se conservaron a -20°C para su posterior uso.

La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida-SDS al 6% para la proteína PARP1 y al 12% para las demás. Se emplearon cubetas verticales de la marca *Hoefer (GE Healthcare)* y dejó correr el gel durante aproximadamente 2 horas a 120 V y 40 mA en un tampón de carrera (Trizma 19 mM, *Sigma*; glicina 192 mM; *Panreac*; 0,01% SDS, *Merck*). La composición del gel se detalla en el Anexo 1. Las muestras fueron hervidas previamente en un baño de calor seco (*Selecta*) a 95°C durante 5 minutos.

Una vez finalizada la separación de proteínas, se realizó la transferencia proteica con un equipo de transferencia semiseca (*GE Healthcare*) a una membrana de polivinil dufloruro (PVDF) (*Amersham HybondTM-P*, *GE Healthcare*) previamente tratada con metanol durante 5 minutos. La transferencia duró 1 hora y 15 minutos a 20 V y 400 mA. Seguidamente se bloqueó la membrana con una disolución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCl 10mM, pH 8, *Sigma*; NaCl 0,12 M, *Sigma*; Tween-20 0,1%, *Sigma*; timerosal 0,1g/L, *Merck*).

Para el análisis proteico se incubaron, en distintos días, los anticuerpos primarios específicos de la proteína de interés, cada uno, durante una noche en cámara fría a 4°C, en

agitación. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón B y se incubó con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón, conejo o cabra conjugado con la peroxidasa de rábano) durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón B, se añadió luminol como sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa (*Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific*) y se llevó a revelar en un cuarto oscuro con una película fotolitográfica (*High performance chemiluminescence film, GE Healthcare*) dentro de una *cassette* de revelado radiológico (*Hypercassette™, Amersham Bioscience*). En presencia de luminol, la peroxidasa de rábano convierte el sustrato en un producto que emite luz y que permite marcar la película fotolitográfica. Las películas se revelaron mediante inmersiones en disoluciones de revelador (*Sigma*), agua destilada y fijador (*Kodak*).

2.8 Microscopía de fluorescencia

Con el objetivo de observar el fenotipo nuclear de las células tratadas tanto con cada uno de los fármacos por separado como con las distintas combinaciones, se realizó un ensayo de microscopía de fluorescencia mediante la tinción con el fluoróforo *Hoechst 33342* (*Sigma*). Este fluoróforo permeable se difunde hasta el núcleo uniéndose de manera específica al surco menor del ADN. Su espectro de excitación es de alrededor de 350nm, en la región del ultravioleta y su longitud de onda máxima de emisión es de 461 nm.

Al tratarse de células en suspensión se utilizaron cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (*Sigma*) un polímero cuya carga positiva interacciona con las cargas negativas de la superficie celular y permite su adhesión al cubreobjetos. Para ello se utilizaron cubreobjetos estériles preservados en etanol al 70% los cuales se secaron a temperatura ambiente, se recubrió su superficie con 100 µl de poli-L-lisina y se dejaron secando 12 horas. Al día siguiente se introdujeron en una placa de 48 pocillos en la cual se sembraron 200.000 células/pocillo cada uno en un volumen de 500 µl de medio completo. Cada pocillo recibió un tratamiento distinto (LUVs, sTRAIL, LUV-TRAIL, CRF 1,5 o 3 nM sTRAIL + CRF 1,5 o 3 nM, LUV-TRAIL + CRF 1,5 o 3 nM). Para los pocillos con tratamientos combinatorios se pre-incubó 1 hora con carfilzomib antes de añadir sTRAIL y LUV-TRAIL. Se dejó incubando la placa toda una noche a 37°C y 5,6% de CO₂.

Pasadas aproximadamente 12 horas se centrifugó la placa a 4105 xg durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante con una bomba de vacío. Seguidamente se fijaron las células adheridas a los cubres recubiertos de polenisina añadiendo 200 µl de paraformaldéhido al 4% y dejando actuar durante 15 minutos a 4°C. Finalmente se realizó un lavado con agua miliQ y se marcaron las células con una dilución de 10 µg/ ml de *Hoeschst 33342* en agua miliQ durante otros 15 minutos en oscuridad. El excedente del marcaje se eliminó realizando un último lavado con agua miliQ. Cada uno de los portaobjetos fue depositado sobre un cubreobjetos en el cual se añadió 4 µl de Fluoromount-G (*SourthenBiotech*), un protector de fluorescencia, de tal manera que la cara del cubreobjetos donde las células están adheridas se encuentre en contacto con la gota de Fluoromount-G. A continuación se sellaron los bordes del cubreobjetos con laca de uñas y se realizaron fotografías con una cámara (DXM 1200F, Nikon) acoplada a un microscopio de fluorescencia (E600/E400 Nikon).

2.9 Análisis estadístico

Para las variables cuantitativas de experimentos que se han repetido varias veces se muestra la media ± desviación estándar (SD). En los casos en los que se han comparado variables de este tipo se aplicó el *test t de Student*, considerándose estadísticamente significativos los valores p<0,05. Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software Prism*.

3. Resultados

3.1 Carfilzomib inhibe la proliferación celular en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

El efecto de carfilzomib en la inhibición de la proliferación celular de las líneas MM.1S y U266 se analizó mediante un ensayo dosis-respuesta utilizando el método de Mossman (MTT). Las células se sembraron a una densidad de 600.000 cél/ml y fueron tratadas con distintas dosis de carfilzomib durante 24 horas.

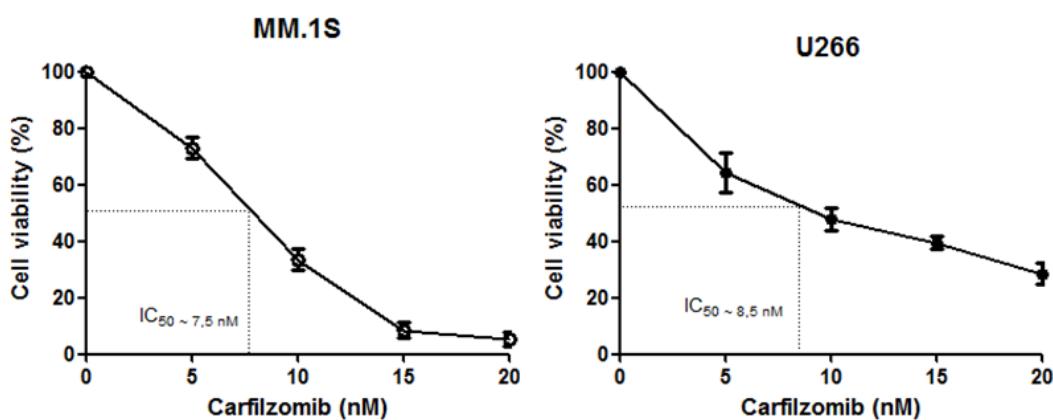


Figura 8. Efecto de carfilzomib en la proliferación de células mielomatosas. Las células MM.1S y U266 se incubaron con concentraciones crecientes de carfilzomib (5, 10, 15 y 20 nM) durante 24 horas y se analizó la viabilidad mediante el ensayo MTT. Los resultados se expresan en tanto por ciento para el crecimiento de las células tomando como 100% las células sin tratar (control) y corresponden a la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos muestran que carfilzomib tiene un efecto citotóxico significativo dosis dependiente en ambas líneas de MM (fig.8), con una IC₅₀ de aproximadamente 7,5 nM para la línea MM.1S y de 8,5 nM para la línea U266 lo que indica que la línea MM.1S presenta mayor sensibilidad al fármaco que la U266.

3.2 Carfilzomib induce apoptosis en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Con el objetivo de corroborar que el efecto anteriormente observado se debe a la inducción muerte celular por parte de carfilzomib, se realizó un ensayo de citotoxicidad analizando la exposición de la fosfatidilsíerenina en la membrana externa de la célula empleando un marcaje con anexina V-APC y su posterior análisis mediante citometría de flujo.

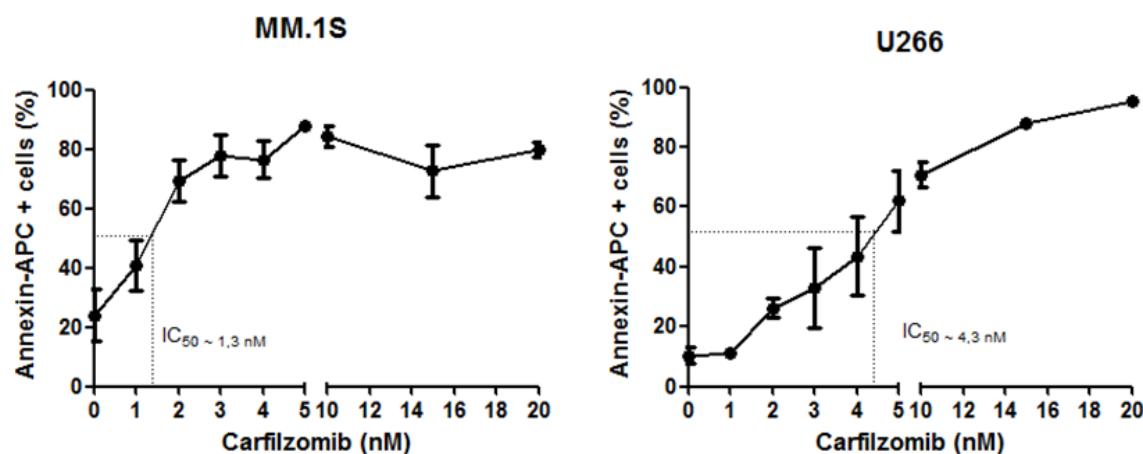


Figura 9. Cuantificación de apoptosis inducida por carfilzomib mediante citometría de flujo. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml, se trataron con distintas concentraciones de carfilzomib (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 nM) y se incubaron durante 24 horas. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en estos experimentos (fig.8 y 9) indican que carfilzomib induce la muerte celular en ambas líneas celulares con una curva dosis-respuesta que sigue la misma tendencia a la observada en el análisis mediante MTT. En este caso las IC₅₀ fueron de aproximadamente 1,3 nM para la línea MM.1S y de 4,3 nM para la línea U266.

La translocación de fosfatidilsíerenina a la cara externa de la membrana plasmática es un evento típico de una muerte celular por apoptosis. Para corroborar que efectivamente, la muerte celular observada tras el tratamiento con carfilzomib es una muerte por apoptosis, se realizó una tinción con *Hoechst 33342* que se analizó mediante microscopía de fluorescencia con el objetivo de observar la morfología nuclear. Las células de la línea MM.1S fueron

tratadas con una dosis de 1,5 nM y las U266 con 3 nM de carfilzomib y se incubaron durante 16 horas.

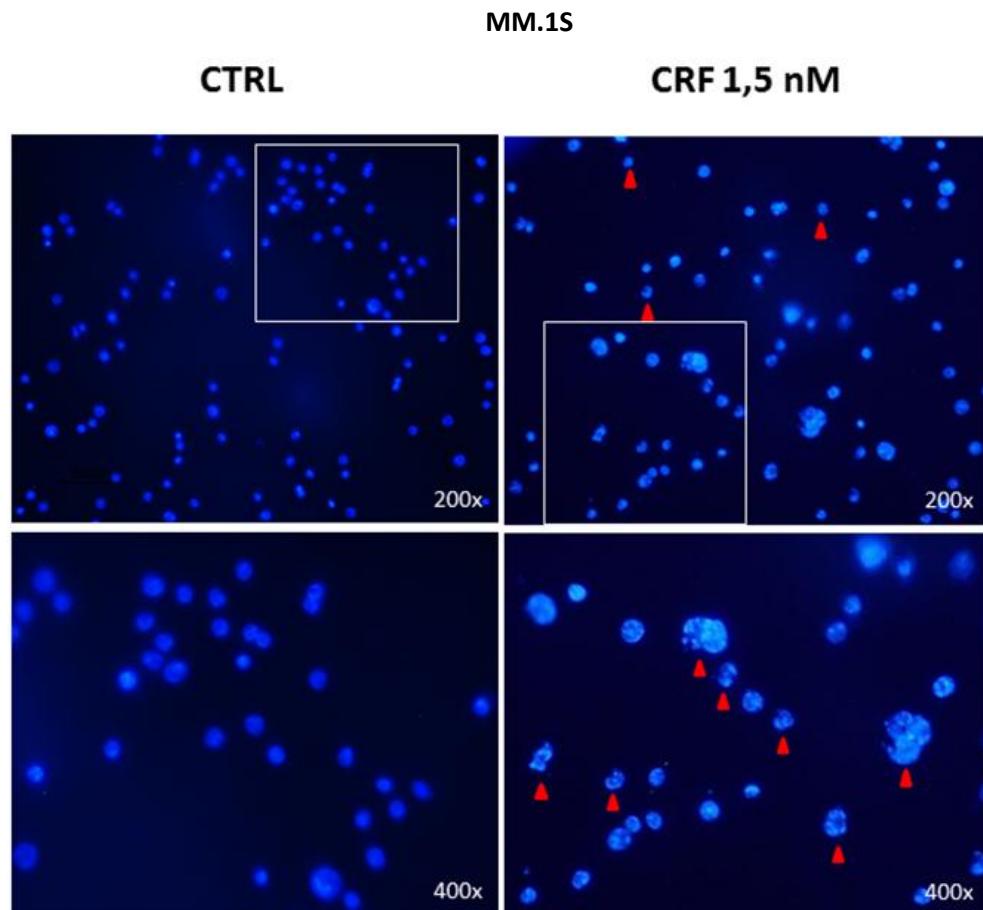


Figura 10. Análisis de la morfología nuclear de la línea MM.1S tras el tratamiento con carfilzomib. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml sobre un cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina y se incubaron durante 16 horas con una dosis de 1,5 nM de carfilzomib. Posteriormente, se tiñeron con la sonda fluorescente Hoechst 33342. A la izquierda, células sin tratar (CTRL) y a la derecha, células tratadas con carfilzomib. Las flechas rojas indican las células apoptóticas. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

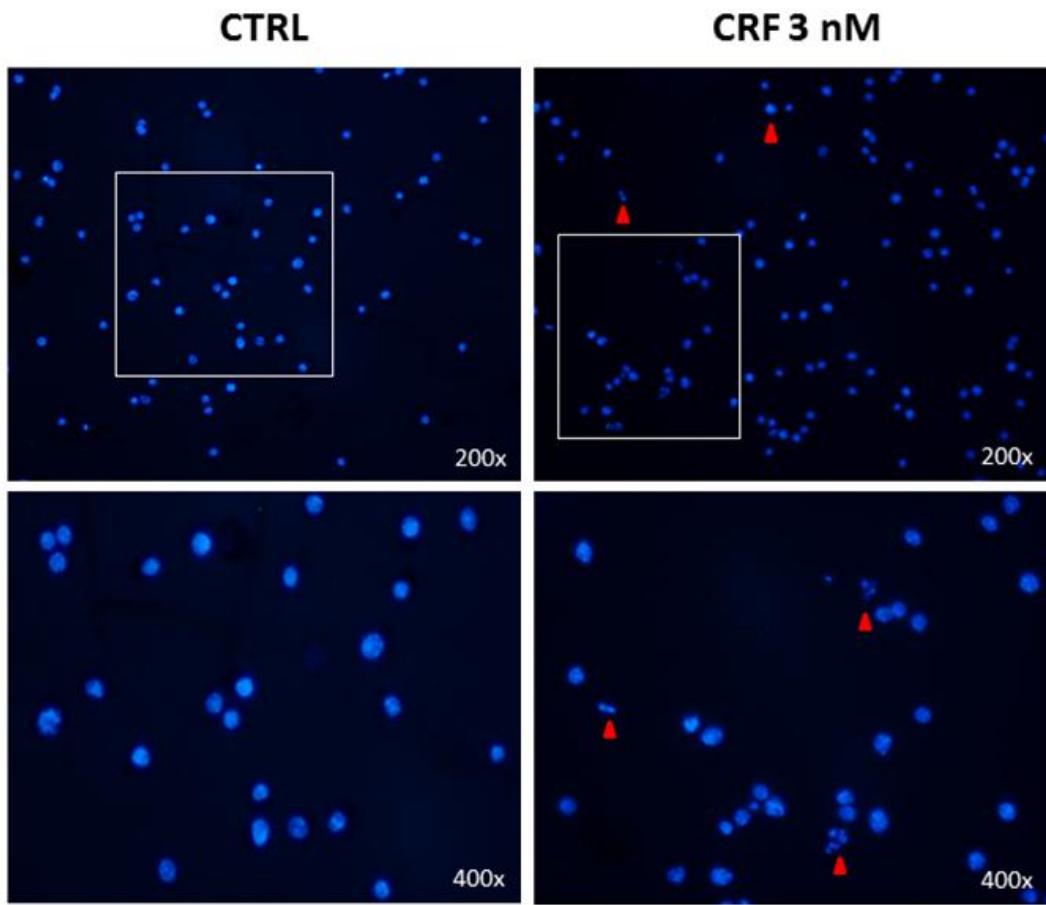


Figura 11. Análisis de la morfología nuclear de la línea U266 tras el tratamiento con carfilzomib. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml sobre un cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina y se incubaron durante 16 horas con una dosis de 3 nM de carfilzomib. Posteriormente, se tiñeron con la sonda fluorescente Hoechst 33342. A la izquierda, células sin tratar (CTRL) y a la derecha, células tratadas con carfilzomib (CRF). Las flechas rojas indican las células apoptóticas. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Las imágenes obtenidas ponen en evidencia que en ambas líneas tumorales, las células tratadas con carfilzomib muestran un fenotipo apoptótico presentando características típicas de un muerte por apoptosis: condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos (fig.10 y 11 dcha.). Estos datos junto con los obtenidos en los experimentos de citometría de flujo indican que la muerte celular inducida por carfilzomib en ambas líneas celulares de MM presenta características típicas de una muerte por apoptosis.

3.3 Estudio de la citotoxicidad de sTRAIL y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Posteriormente, se procedió a analizar el efecto citotóxico de las dos formulaciones de TRAIL empleadas en este trabajo, TRAIL soluble (sTRAIL) y asociado a liposomas (LUV-TRAIL) realizando ensayos dosis-respuesta y analizando la exposición de fosfatilserina empleando citometría de flujo. Para ello, las células se trataron con distintas dosis de ambas formulaciones durante 16 horas.

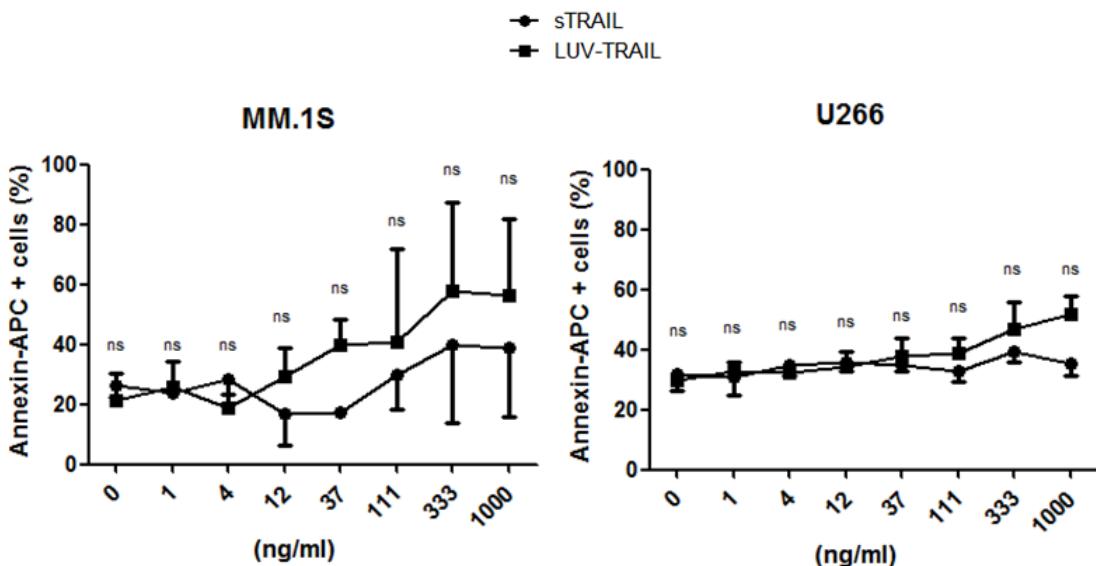


Figura 12. Estudio de citotoxicidad tras el tratamiento con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las células se sembraron a una densidad de 300.000 cél/ml y se incubaron con TRAIL soluble (sTRAIL) o TRAIL asociado a liposomas (LUV-TRAIL) a las dosis indicadas en las gráficas. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. ns= estadísticamente no significativo.

Los resultados obtenidos indican que ambas formulaciones inducen la muerte celular en las líneas MM.1S y U266 siendo LUV-TRAIL el más citotóxico a simple vista (fig.12). También se observa que la línea MM.1S presenta una mayor sensibilidad a los ligandos mortales que la línea U266, siendo esta última también más resistente a la acción citotóxica de carfilzomib. En cuanto a los análisis estadísticos, no se observan diferencias significativas en la capacidad citotóxica de ambos fármacos.

De nuevo, para completar el estudio del tipo de muerte inducida por las distintas formulaciones de TRAIL, se realizó un análisis de la morfología nuclear mediante tinción con Hoechst 33342 usando células sin tratar y células tratadas con LUVs (LUVs sin TRAIL en su superficie), sTRAIL y LUV-TRAIL.

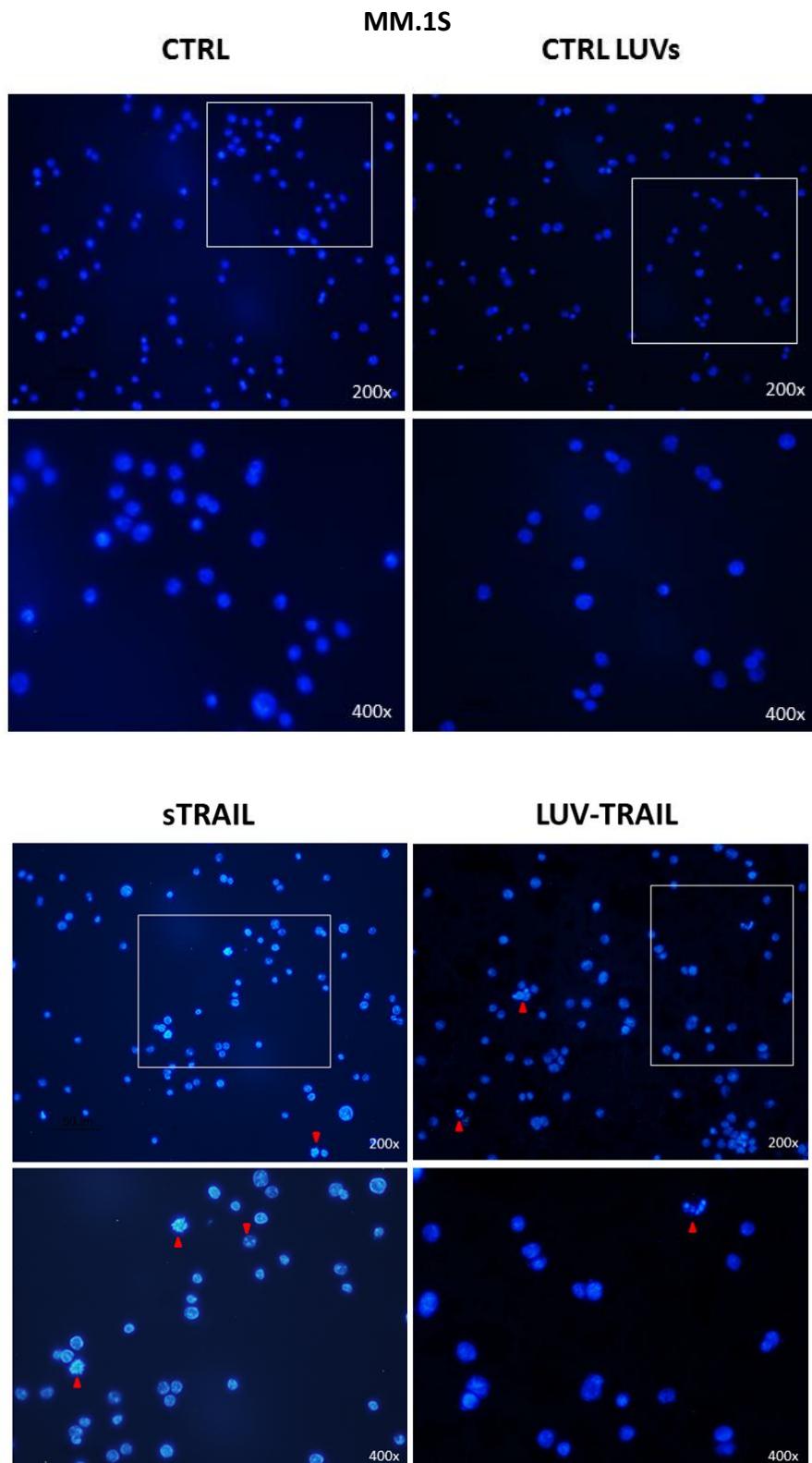


Figura 13. Análisis de la morfología nuclear de la línea MM.1S tras el tratamiento con las formulaciones de TRAIL.
 Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml sobre un cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina y se dejaron sin tratar (CTRL), o se trataron LUVs (LUVs sin TRAIL), TRAIL soluble (sTRAIL) o asociado a liposomas (LUV-TRAIL) a una concentración de 1 μ g/ml durante 16 horas. Posteriormente, se tiñeron con la sonda fluorescente Hoechst 33342. Las flechas rojas indican las células apoptóticas. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

U266

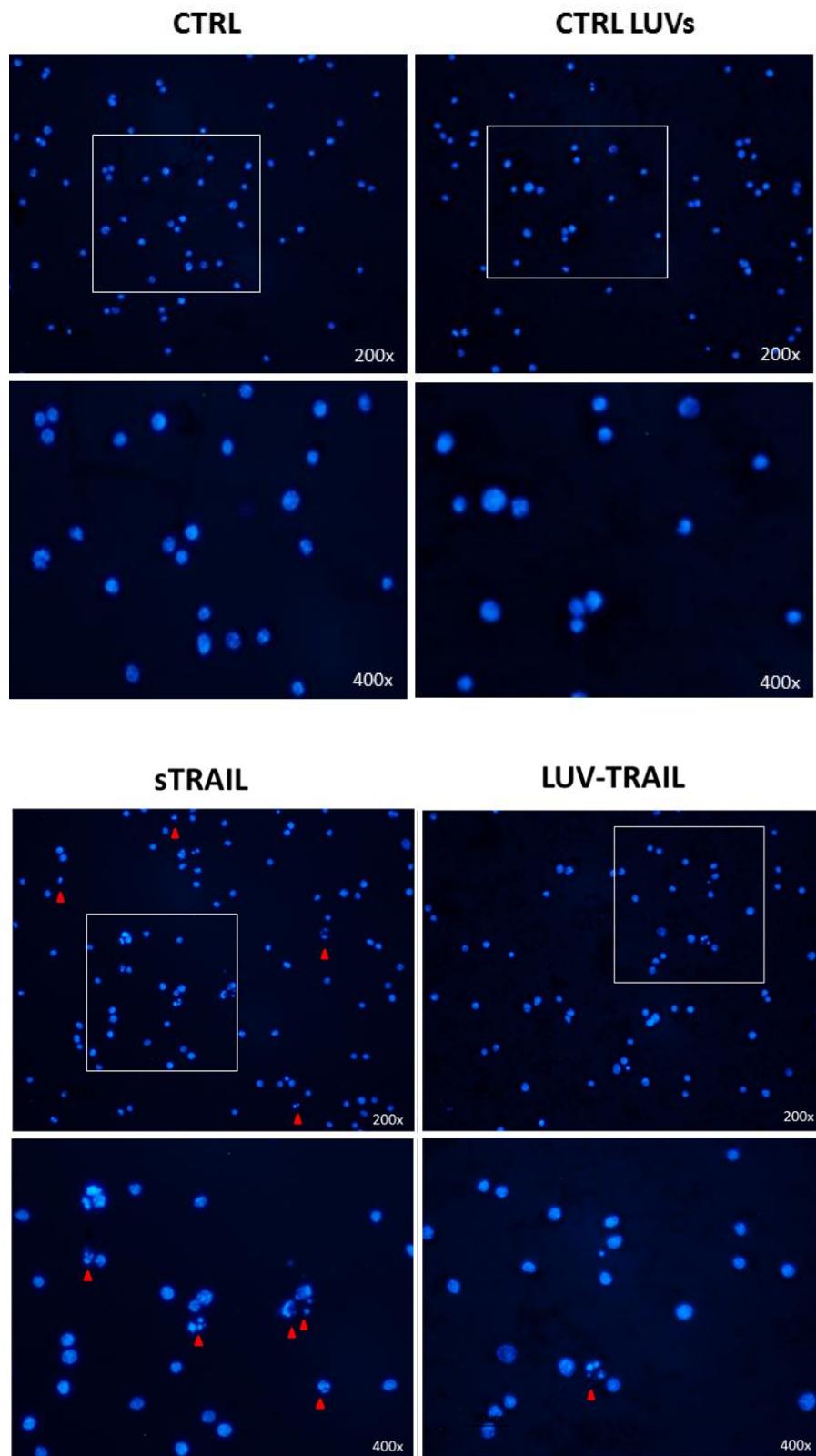


Figura 14. Análisis de la morfología nuclear de la línea U266 tras el tratamiento con las formulaciones de TRAIL. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml sobre un cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina y se dejaron sin tratar (CTRL), o se trajeron LUVs (LUVs sin TRAIL), TRAIL soluble (sTRAIL) o asociado a liposomas (LUV-TRAIL) a una concentración de 1 μ g/ml durante 16 horas. Posteriormente, se tiñeron con la sonda fluorescente Hoechst 33342. Las flechas rojas indican las células apoptóticas. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

Las imágenes de las figuras 13 y 14 muestran que tanto sTRAIL como LUV-TRAIL inducen una muerte con características típicas de una muerte por apoptosis en ambas líneas celulares (condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos). Resulta interesante que los liposomas sin TRAIL acoplado a su superficie (LUVs) no tienen ningún efecto citotóxico puesto que no se observan células apoptóticas en ninguna de las dos líneas celulares.

3.4 El efecto de carfilzomib aumenta la expresión de los receptores de TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Los análisis de la expresión de los receptores DR4 y DR5 realizados en estudios previos tras el tratamiento con carfilzomib, apuntan a que el fármaco inhibidor del proteasoma a una concentración 7 nM, tiene un efecto directo en el aumento de la expresión del receptor DR4 en la línea U266 y DR5 en MM.1S³.

Con el objetivo de verificar si estos resultados se reproducen empleando dosis de carfilzomib que no inducen una elevada citotoxicidad, se realizó el análisis con las dosis: 1,5 y 3 nM. Para ello, las células se incubaron con las dosis de carfilzomib indicadas durante 6 y 24 horas. El estudio se realizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos contra los receptores de TRAIL con el objetivo de analizar su expresión en la superficie celular (fig.15 y 16).

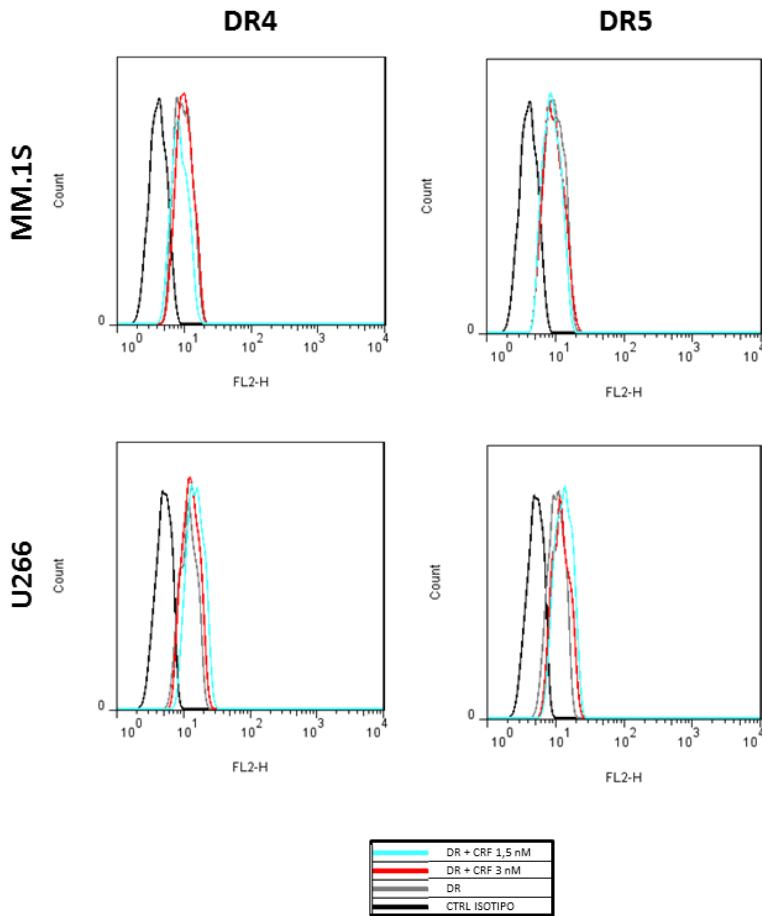


Figura 15. Análisis de la expresión de DR4 y DR5 en las líneas MM.1S y U266 tras el tratamiento durante 6 horas con carfilzomib. Se sembraron 300.000 cél/ml de las líneas celulares MM.1S y U266 y fueron tratadas con dosis 1,5 y 3 nM de carfilzomib (CRF) durante 6 horas. Posteriormente se analizó la expresión en la superficie celular de los receptores DR4 y DR5 mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Como control del experimento se incubaron las células con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que los anticuerpos específicos (CTRL ISOTIPO).

Tal y como se puede apreciar en la figura 15, ambas líneas celulares presentan una expresión basal tanto de DR4 como DR5. Tras el tratamiento con las dosis empleadas durante 6 horas la expresión de DR4 y DR5 no parece aumentar en ninguna de las dos líneas celulares.

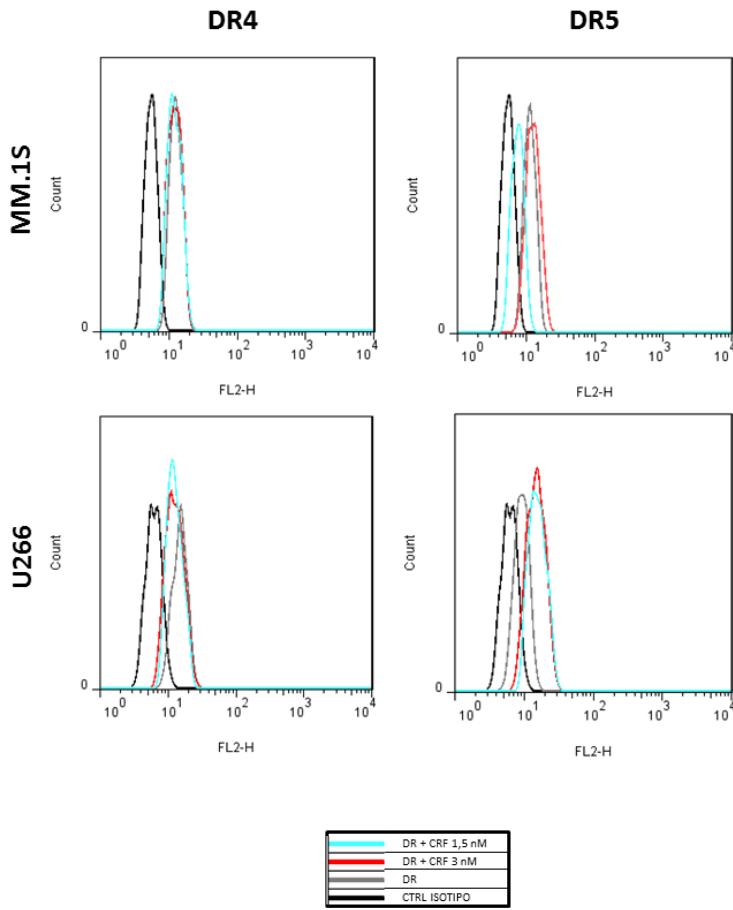


Figura 16. Análisis de la expresión de DR4 y DR5 en las líneas MM.1S y U266 tras el tratamiento durante 24 horas con carfilzomib. Se sembraron 300.000 cél/ml de las líneas celulares MM.1S y U266 y fueron tratadas con dosis 1,5 y 3 nM de carfilzomib (CRF) durante 24 horas. Posteriormente se analizó la expresión en la superficie celular de los receptores DR4 y DR5 mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Como control del experimento se incubaron las células con un anticuerpo irrelevante del mismo isótipo que los anticuerpos específicos (CTRL ISOTIPO).

Cuando el análisis de la expresión de los receptores se realiza pasadas 24 horas, se observa un aumento de la expresión de DR5 similar para las dosis 1,5 y 3 nM, en la línea U266 (fig.16, imagen inferior dcha.). En el caso de la línea celular MM.1S no se observa un aumento de la expresión de ninguno de los dos receptores e incluso el tratamiento con carfilzomib a la dosis de 1,5 nM produjo un descenso en la expresión de DR5. (fig.16, imagen superior dcha.).

A la vista de estos resultados, se analizó el efecto del fármaco con una dosis más elevada de carfilzomib (5 nM), con un tiempo de incubación intermedio (16 horas). Además se analizó la expresión de los receptores señuelo: DcR1 y DcR2. Los resultados del análisis se ilustran en la figura 17. En este caso se observa de nuevo un aumento de la expresión del receptor DR5 en la línea U266 indicando que esta línea podría beneficiosa terapia combinada de carfilzomib con TRAIL.

En cuanto a la expresión de los receptores señuelo no se observa ningún aumento tras el tratamiento con carfilzomib (fig.17 bloque inferior).

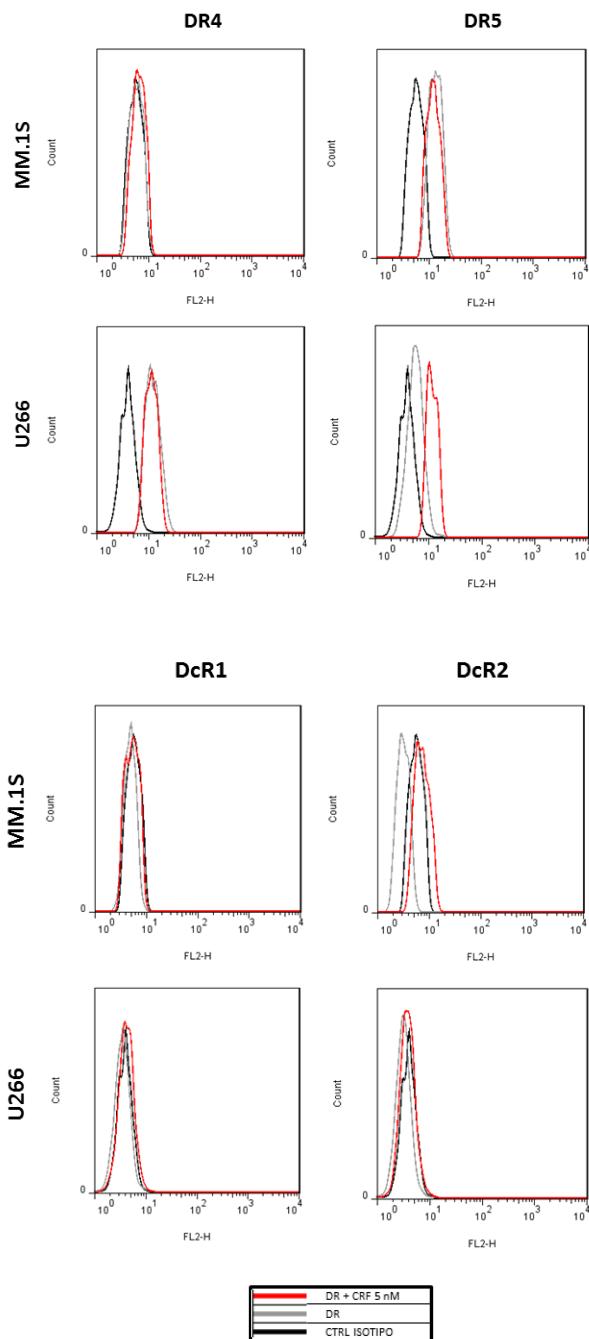


Figura 17. Análisis de la expresión de los receptores de TRAIL en las líneas MM.1S y U266 tras el tratamiento durante 16 horas con carfilzomib. Se sembraron 300.000 cél/ml de las líneas celulares MM.1S y U266 y fueron tratadas con una dosis 5 nM de carfilzomib (CRF) durante 16 horas. Posteriormente se analizó la expresión en la superficie celular de los receptores DR4, DR5, DcR1 y DcR2 mediante citometría de flujo empleando anticuerpos específicos. Como control del experimento se incubaron las células con un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que los anticuerpos específicos (CTRL ISOTIPO).

3.5 Análisis proteico del efecto del tratamiento combinado de carfilzomib y TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas juegan un papel crucial en la regulación de la apoptosis. La interacción entre las mismas determina que la célula muera o no por apoptosis. Por esta misma razón se analizó su expresión en células tratadas con carfilzomib, TRAIL (soluble y asociado a liposomas) o la combinación de carfilzomib con ambas formulaciones de TRAIL. Para ello se realizó un análisis de proteínas mediante la técnica *Western blot* utilizando un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

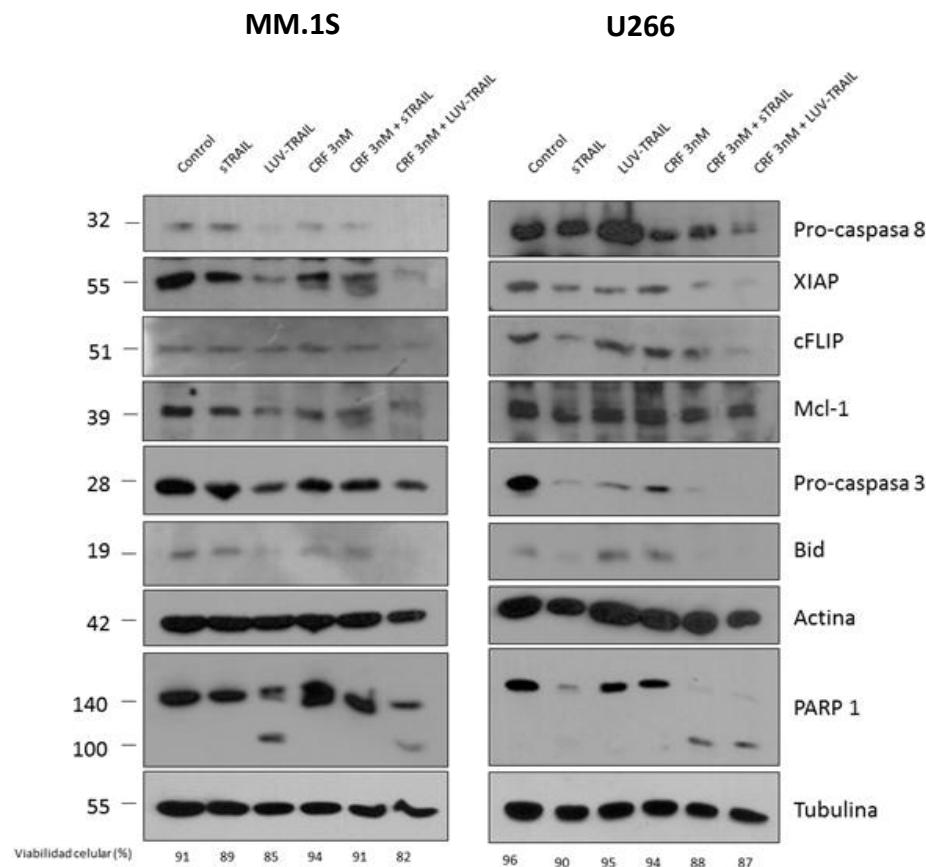


Figura 18. Análisis de la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas. Las células de la línea MM.1S y U266 se incubaron con 1,5 nM y 3 nM de carfilzomib (CRF) respectivamente así como TRAIL soluble (sTRAIL) a 1 µg/ml, LUV-TRAIL a 1 µg/ml, o la combinación de CRF con sTRAIL y LUV-TRAIL durante 16 horas. Posteriormente se realizó el análisis de las proteínas: pro-caspasa 8, XIAP, cFLIP, Mcl-1, pro-caspasa 3, Bid y PARP 1 mediante *Western blot*. Como control de carga se utilizó la tubulina en el caso de PARP 1 y la actina para las demás proteínas. Antes de realizar los lisados se determinó la viabilidad celular mediante el test azul tripán de cada uno de los puntos experimentales (indicado como % bajo cada uno de los carriles).

Tal y como se puede observar en la figura 18, en las células MM.1S tratadas con sTRAIL y LUV-TRAIL, se produce un descenso de la forma proactiva de la caspasa-8 y -3, de forma más pronunciada en el caso de las células tratadas con LUV-TRAIL. En los respectivos sustratos de ambas caspasas (Bid para caspasa-8 y PARP-1 para caspasa-3) también se observa un descenso tras el tratamiento con ambas formulaciones de TRAIL, siendo también más pronunciado en el caso de los LUV-TRAIL, en el que además se observa la presencia de un procesamiento de PARP-1.

Respecto a las proteínas anti-apoptóticas, el tratamiento con sTRAIL produce un leve descenso tanto de XIAP como de Mcl-1 sin observarse cambios en cFLIP. Sin embargo, cuando las células MM.1S son tratadas con LUV-TRAIL, se observa un claro descenso de XIAP, Mcl-1 y sin observarse, de nuevo, cambios en cFLIP.

El tratamiento únicamente con carfilzomib produce un descenso claro de procaspasa-8 y Bid y más leve de procaspasa-3, sin observarse variaciones en PARP-1. Además, el tratamiento con carfilzomib produce un leve descenso tanto de XIAP como de Mcl-1 sin cambios en cFLIP (similar a lo observado para sTRAIL).

Respecto a los tratamientos combinados, el tratamiento con carfilzomib y sTRAIL produce un mayor descenso de la procaspasa-8 y Bid que sTRAIL solo, aunque no se observan diferencias en la expresión de procaspasa-3 y PARP-1 respecto a los tratamientos por separado con carfilzomib y sTRAIL. Además, el tratamiento combinado de carfilzomib y sTRAIL induce un descenso similar de XIAP pero un mayor descenso de Mcl-1 y cFLIP cuando las células MM.1S se tratan con sTRAIL. En el caso de tratamiento combinado de carfilzomib con LUV-TRAIL, se observa un gran descenso de procaspasa-8, procaspasa-3 así como de Bid y de PARP-1, observándose en este caso un claro procesamiento, si se compara con lo observado para estas proteínas tras el tratamiento sólo con LUV-TRAIL. Respecto a las proteínas anti-apoptóticas XIAP, cFLIP y Mcl-1, el tratamiento combinado de carfilzomib con LUV-TRAIL produce un descenso más pronunciado en los tres casos que tras el tratamiento únicamente con LUV-TRAIL.

En cuanto a la línea U266, el tratamiento con sTRAIL produce un descenso de los niveles de la procaspasa 3, Bid y PARP 1. Así mismo los niveles de cFLIP se ven reducidos. En cambio, en el carril tratado con LUV-TRAIL no se observa la disminución Bid, cFLIP ni de PARP1 como se puede observar en el carril tratado con TRAIL soluble. Para esta línea tampoco se observa un cambio en la expresión de la proteína Mcl-1 cuando esta es tratada con TRAIL soluble.

La expresión proteica de las células U266 tratadas con carfilzomib apunta que este fármaco disminuye únicamente los niveles de la procaspasa-3 sin observarse cambios en la expresión de las demás proteínas analizadas.

En el caso del tratamiento combinado de carfilzomib con sTRAIL, se observa un mayor descenso de la procaspasa-8, de la procaspasa-3 y de PARP 1 comparado con el tratamiento solo de TRAIL soluble. De la misma manera, se observa claramente el procesamiento de PARP1, que a diferencia del tratamiento con sTRAIL sólo puede intuirse.

Para finalizar, el tratamiento que combina carfilzomib y LUV-TRAIL induce descenso muy pronunciado de la procaspasa-8 y -3, de ambos sustratos de las caspasas (Bid y PARP-1) así como de XIAP y cFLIP, sin observarse de nuevo ningún cambio en la expresión de Mcl-1. La comparación de este tratamiento con el de LUV-TRAIL, en el cual solo se observa un ligero descenso de XIAP y en mayor medida de la procaspasa-3, apunta ser más efectivo en cuanto al procesamiento de caspasas, la disminución drástica de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas XIAP y cFLIP así como la disminución de los niveles de Bid y PARP 1, este último presentándose además bajo la forma procesada.

3.6 Estudio de la citotoxicidad inducida por los tratamientos combinados de carfilzomib con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Después de analizar la expresión de diversas proteínas implicadas en apoptosis tras los tratamientos combinados de carfilzomib con sTRAIL y LUV-TRAIL, se analizó la capacidad citotóxica de cada droga por separado y de las distintas combinaciones mediante marcaje con anexina V- APC y análisis por citometría de flujo.

En un primer experimento se incubaron las células MM.1S y U266 con carfilzomib durante 1 hora y posteriormente con TRAIL (soluble o asociado a liposomas) durante 16 horas más (fig.19).

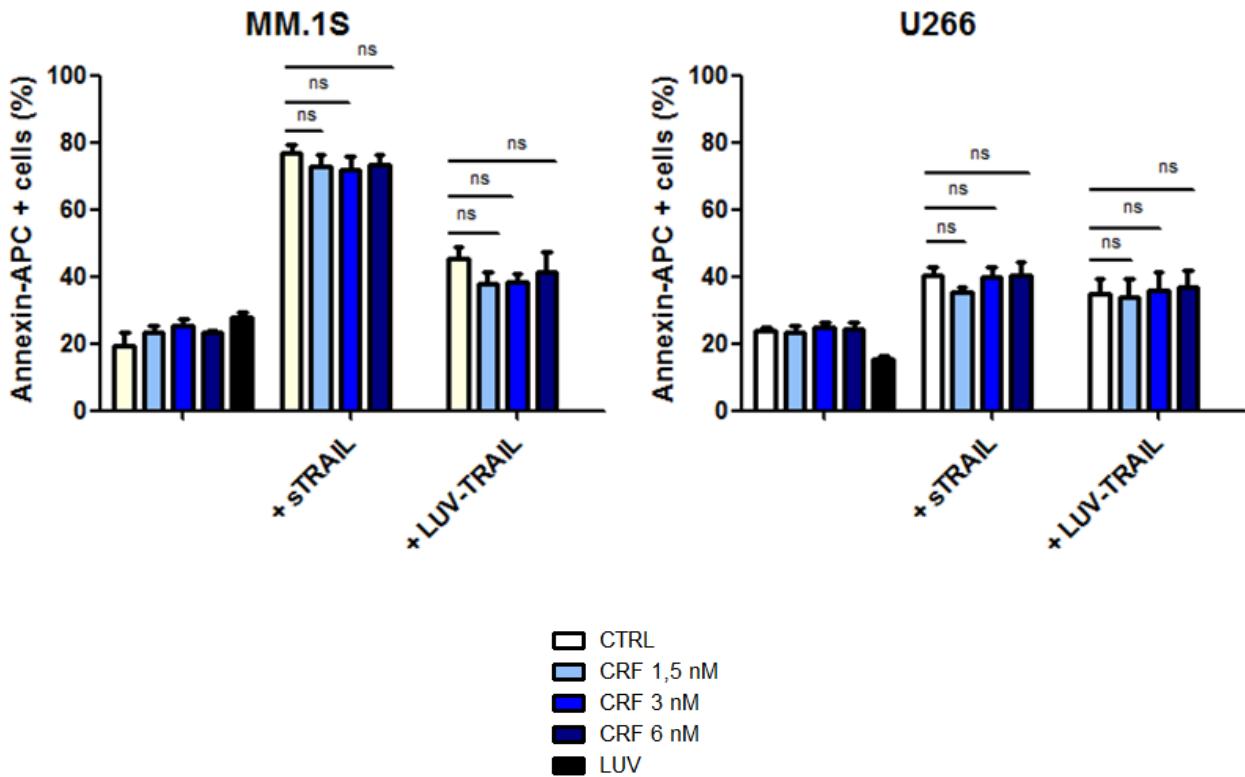


Figura 19. Estudio citotóxico del efecto de carfilzomib en combinación con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml y se incubaron previamente con las dosis indicadas de carfilzomib (de CRF) durante 1 hora. Seguidamente se añadió TRAIL soluble (sTRAIL) o TRAIL anclado a liposomas (LUV-TRAIL) a una concentración de 1 µg/ml durante 16 horas. Finalmente se analizó mediante citometría de flujo el marcaje con anexina-V. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. ns=estadísticamente no significativo.

Los resultados obtenidos, indican que carfilzomib no induce muerte significativa en ninguna de las dos líneas celulares. En cambio, los ligandos mortales (sTRAIL y LUV-TRAIL) tienen un efecto citotóxico significativo sobre todo en las células MM.1S en el caso de sTRAIL. Por otra parte, la combinación de carfilzomib con ambas formulaciones de TRAIL, no supuso un efecto potenciador respecto al tratamiento únicamente con sTRAIL o LUV-TRAIL. El análisis estadístico indica que ninguna de las combinaciones farmacológicas induce muerte significativa en las líneas MM.1S y U266.

Posteriormente se realizaron experimentos en los cuales se incubaron ambas líneas celulares con carfilzomib durante 24 horas y posteriormente con TRAIL (soluble o asociado a liposomas) durante otras 24 horas (fig.20).

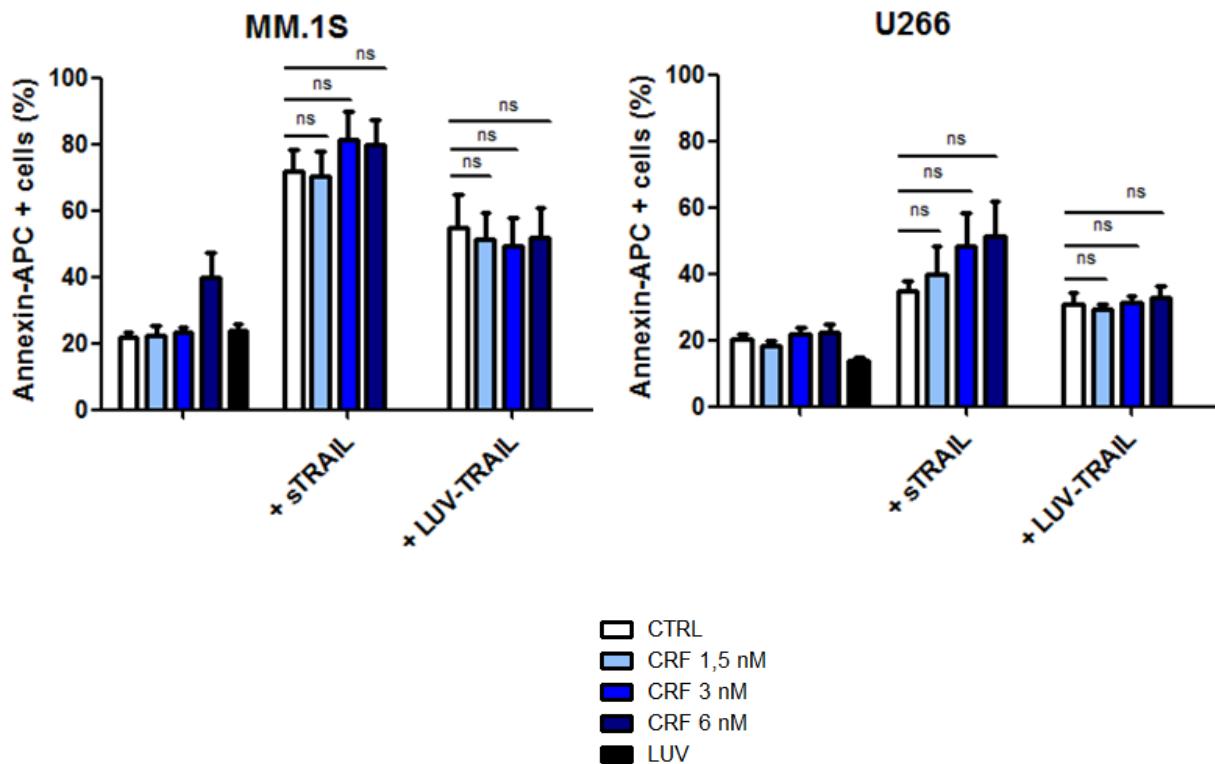


Figura 20. Estudio citotóxico del efecto de carfilzomib en combinación con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml y se incubaron previamente con las dosis indicadas de carfilzomib (de CRF) durante 24 horas. Seguidamente se añadió TRAIL soluble (sTRAIL) o TRAIL anclado a liposomas (LUV-TRAIL) a una concentración de 1 µg/ml durante 24 horas. Finalmente se analizó mediante citometría de flujo el marcaje con anexina-V. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. ns= estadísticamente no significativo.

Los resultados obtenidos tras 48 horas de incubación (fig.20) indican un efecto citotóxico significativo de carfilzomib para la dosis más elevada (6 nM) en la línea celular MM.1S. En cambio, en las células U266 no se observa ningún efecto citotóxico con las distintas dosis de carfilzomib. En cuanto a TRAIL, en ambas líneas se observa un efecto citotóxico de ambas formulaciones, siendo mayor en las células MM.1S. En éstas últimas, además, el efecto de sTRAIL es superior al de los LUV-TRAIL.

Finalmente, los resultados de la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble revelan que existe un efecto citotóxico aditivo cuando tanto en las MM.1S como en las U266. En el caso del tratamiento combinado con LUV-TRAIL no se produce ningún efecto citotóxico aditivo ya que el porcentaje de muerte es similar que el de LUV-TRAIL. A pesar de existir un efecto aditivo en el tratamiento con carfilzomib y TRAIL soluble, el análisis estadístico indica que no puede considerarse significativo.

3.7 Estudio de la activación de la vía extrínseca por TRAIL en la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas MM.1S y U266 de mieloma múltiple

Finalmente, con el objetivo de estudiar qué factores intervienen durante la apoptosis inducida por los tratamientos combinados de carfilzomib con ambas formulaciones de TRAIL, se realizaron ensayos de citotoxicidad en los que se utilizó un anticuerpo monoclonal bloqueante de TRAIL denominado RIK2 (RIK) y el inhibidor general de caspasas ZVAD-fmk (ZVAD).

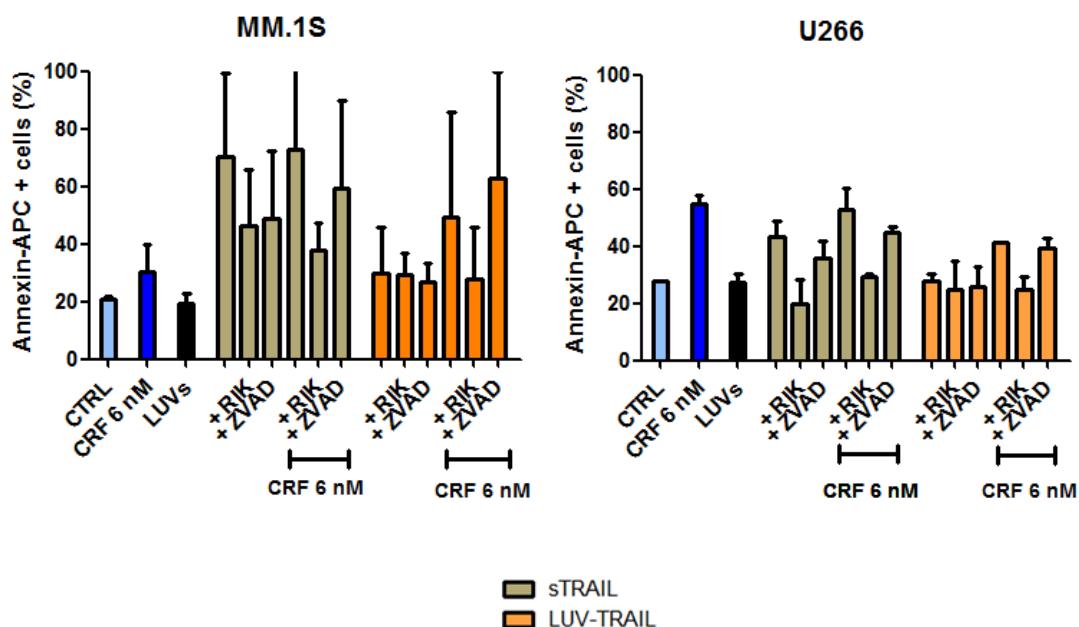


Figura 21. Efecto de la inhibición de TRAIL y de las caspasas en la combinación de carfilzomib con TRAIL en las líneas MM.1S y U266. Las células se sembraron a una densidad de 500.000 cél/ml y se incubaron con carfilzomib (CRF) a 6 nM durante 1 hora y luego se incubaron durante 16 horas con TRAIL soluble (sTRAIL) o LUV-TRAIL a una concentración de 1 µg/ml. Para la inhibición de la actividad de TRAIL, ambas formulaciones se incubaron previamente durante 1 hora con el anticuerpo bloqueante RIK (2,5 µg/ml). Para la inhibición de las caspasas, las células se preincubaron previamente con el inhibidor general de caspasas ZVAD (30µM) durante 1 hora. A continuación se trataron con TRAIL soluble y LUV-TRAIL. La muerte celular se analizó mediante tinción con anexina-V y análisis por citometría de flujo. Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de 2 experimentos independientes.

En el caso de la línea celular MM.1S, los resultados presentan una gran variabilidad que hace difícil la interpretación de los mismos. Aun así, parece que la preincubación con RIK y con ZVAD inhibe parcialmente la muerte inducida por sTRAIL (fig 21 izq.). La inhibición con RIK en el tratamiento combinado de carfilzomib con sTRAIL parece ser similar a la observada con

sTRAIL solo, mientras que la preincubación con ZVAD en este caso, parece producir un menor efecto inhibitorio que en el caso de sTRAIL solo.

En el caso del tratamiento con los LUV-TRAIL, dado que la muerte observada cuando se emplean como único tratamiento es muy baja, no se observa ninguna inhibición tras la preincubación con RIK o con ZVAD. El tratamiento combinado de carfilzomib y LUV-TRAIL parece mostrar un efecto citotóxico ligeramente superior a los LUV-TRAIL solos que se ve en gran medida inhibido tras la preincubación con RIK. Sin embargo, la preincubación con ZVAD no muestra ningún efecto inhibitorio.

En el caso de la línea celular U266, la variabilidad de los resultados es menor que en el caso de las células MM.1S. En primer lugar, se observa que el efecto citotóxico de ambas formulaciones de TRAIL es menor al observado en la línea celular MM.1S. En las células U266 la preincubación con RIK inhibe completamente la muerte inducida por sTRAIL (fig.21 dcha.) así como en el tratamiento combinado de carfilzomib con sTRAIL. Sin embargo, la preincubación con ZVAD produce un menor efecto inhibitorio tanto en el tratamiento con sTRAIL solo como en la combinación con carfilzomib.

En el caso del tratamiento con los LUV-TRAIL, dado que la muerte observada cuando se emplean como único tratamiento es muy baja, no se observa ninguna inhibición tras la preincubación con RIK o con ZVAD. El tratamiento combinado de carfilzomib y LUV-TRAIL muestra un efecto citotóxico ligeramente superior a los LUV-TRAIL inhibido prácticamente en su totalidad tras la preincubación con RIK mientras que la preincubación con ZVAD no muestra ningún efecto inhibitorio.

En ambas líneas celulares, los resultados indican que pueden existir otros mecanismos de muerte independiente de caspasas cuando las células son tratadas con la combinación de carfilzomib y TRAIL (soluble o asociado a liposomas).

4. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el inhibidor del proteasoma carfilzomib ejerce actividad citotóxica *in vitro* frente a las líneas celulares tumorales humanas provenientes de MM, MM.1S y U266. Aunque ambas líneas celulares son sensibles a la acción a carfilzomib, las células MM.1S presentan una mayor sensibilidad a esta droga que las células U266 como muestran los valores de la IC₅₀ obtenidos en los experimentos de citotoxicidad con citometría de flujo: 1,3 nM en el caso de la línea celular MM.1S y de 4,3 nM para las células U266. Además, la muerte celular inducida por carfilzomib en ambas líneas celulares estudiadas muestra características morfológicas y bioquímicas típicas de una muerte por apoptosis como son la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, así como la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática.

En lo referente a la capacidad citotóxica *in vitro* de las formulaciones del ligando mortal TRAIL empleadas en este trabajo frente a las células de MM, tanto la línea celular MM.1S como las células U266, muestran una sensibilidad limitada tanto a TRAIL soluble como a TRAIL anclado a la superficie de vesículas lipídicas (LUV-TRAIL). Al igual que lo observado para carfilzomib, las células MM.1S presentan una mayor sensibilidad que la línea celular U266 principalmente a los LUV-TRAIL aunque para ningún tratamiento basado en TRAIL y en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas la sensibilidad mostrada permite calcular la IC₅₀.

Dada la limitada capacidad citotóxica de TRAIL en las células provenientes de MM, la búsqueda de combinaciones terapéuticas con otras drogas que puedan sensibilizar a las células tumorales a TRAIL y potenciar su citotoxicidad resulta de interés. Son varios los mecanismos por los que diversas drogas pueden sensibilizar a la muerte inducida por TRAIL: el aumento de la expresión de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL en la superficie de la célula cancerosa o el descenso de proteínas anti-apoptóticas implicadas en las vías de transducción de la señal de apoptosis. En este sentido, el proteasoma es un complejo proteico encargado de degradar proteínas y por lo tanto la inhibición de alguna de sus subunidades impide su correcto funcionamiento dando a lugar a una acumulación proteica excesiva. Entre las diversas proteínas degradadas se encuentran los receptores mortales de la superficie celular así como diversas proteínas anti-apoptóticas intracelulares que regulan la apoptosis. Esta es la razón por la cual, el uso del inhibidor del proteasoma como terapia en las células cancerosas, que por su naturaleza expresan de manera anormal los receptores mortales y/o proteínas anti-

apoptóticas, podría ser un candidato plausible para ser usado como agente sensibilizador a la muerte celular inducida por TRAIL. Un posible aumento de los receptores mortales haciendo a las células tumorales más vulnerables a la acción citotóxica de los ligandos mortales como FasL y TRAIL o un descenso de proteínas anti-apoptóticas que bloquean la señal apoptótica tras el tratamiento con carfilzomib, sensibilizaría la célula a una terapia que hiciera uso del ligando mortal TRAIL. Por ello, en el presente trabajo se ha analizado algunos de estos mecanismos en las líneas celulares de MM tras el tratamiento con carfilzomib.

En lo referente a la expresión de los receptores mortales específicos de TRAIL, los resultados indican que en la línea celular U266 se produce un aumento de la expresión en la superficie celular de DR5 tras el tratamiento con carfilzomib. Sin embargo no se han observado cambios en la expresión de los receptores de TRAIL en las células MM.1S.

Respecto a la expresión de diversas proteínas implicadas en la apoptosis, el análisis proteico muestra que el tratamiento que combina carfilzomib y TRAIL, fundamentalmente con los LUV-TRAIL, induce un mayor procesamiento de las principales caspasas implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis (caspasa-8 y -3) que se traduce también en un mayor procesamiento de sus respectivos sustratos (Bid y PARP 1) en mayor o menor medida en ambas líneas celulares. Además, la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble y sobre todo con los LUV-TRAIL conlleva un importante descenso en algunas proteínas anti-apoptóticas como cFLIP, XIAP y Mcl-1 que regulan negativamente la apoptosis. Estos resultados indicarían que *a priori*, TRAIL se podría beneficiar de la combinación con carfilzomib para aumentar su capacidad citotóxica frente a células de MM cuando ambas drogas se usan conjuntamente. Sin embargo, la suposición de que el tratamiento combinado tendría un efecto sinérgico en la muerte por apoptosis no se ha podido corroborar en los ensayos de citotoxicidad empleando carfilzomib en combinación con las formulaciones de TRAIL.

Cuando las células son tratadas durante 1 hora con carfilzomib y posteriormente con TRAIL (soluble o LUV-TRAL), en ninguna de las dos líneas analizadas se ha observado un efecto citotóxico superior al observado con TRAIL soluble o los LUV-TRAIL solos. En cambio, cuando el tratamiento con carfilzomib se prolonga hasta 24 horas antes de añadir TRAIL, en la línea celular MM.1S y sobre todo en las células U266 la combinación con TRAIL soluble, parece aumentar el efecto citotóxico en comparación con el tratamiento únicamente con TRAIL soluble, indicando que para observar un posible efecto sensibilizador de carfilzomib en la muerte inducida por TRAIL es necesario una exposición prolongada a este inhibidor del proteasoma.

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis proteico, cabría esperar que el mayor efecto cooperativo entre carfilzomib y TRAIL se diera con la combinación con los LUV-TRAIL. En cambio, los resultados obtenidos no muestran ese efecto citotóxico superior con la combinación de carfilzomib con los LUV-TRAIL. Parece que la disminución de las proteínas anti-apoptóticas cFLIP, XIP y Mcl-1 así como en aumento de DR5, en el caso de las células U266, tras el tratamiento combinado de carfilzomib y los LUV-TRAIL no suponen mecanismos suficientes para sensibilizar a las células de MM a la muerte celular inducida por los LUV-TRAIL. En este sentido, se ha descrito en otros modelos celulares que la señalización apoptótica transmitida por los LUV-TRAIL es a expensas de activar sobre todo DR5^{30,31}. Sin embargo, parece que en la señal apoptótica inducida por TRAIL en las células de MM, DR4 juega un papel importante²² siendo este receptor mortal principalmente empleado por TRAIL soluble. Esto podría justificar en parte, en el caso de las células U266, que el efecto citotóxico sea superior en la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble, que transmitiría la señal apoptótica a través de DR4 en comparación con la combinación con los LUV-TRAIL, a pesar de que se observe un aumento de la expresión de DR5.

En último lugar, en el análisis de la activación de la vía extrínseca por TRAIL en la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble y LUV-TRAIL en las líneas de MM empleando el anticuerpo bloqueante de TRAIL, RIK y el inhibidor general de caspasas ZVAD, como se ha comentado previamente en la sección de Resultados, los datos obtenidos en la línea MM.1S muestran una gran variabilidad que hace difícil sacar conclusiones. Este análisis en el caso de las células U266 muestra que los mecanismos por los cuales la combinación de carfilzomib con TRAIL mata, dependen fundamentalmente de la presencia de este ligando mortal. Sin embargo otros mecanismos de muerte no dependientes de la presencia de TRAIL parecen implicados en la muerte inducida por la combinación de carfilzomib con TRAIL en las células MM.1S ya que la preincubación con RIK no inhibe completamente el efecto citotóxico del tratamiento combinado. Respecto a la dependencia de la activación de las caspasas en la muerte celular inducida por el tratamiento combinado, en ambas líneas celulares se observa sólo una inhibición parcial de la muerte celular en aquellos casos en los que se constata muerte, cuando se emplea ZVAD. Esto indica que además de una muerte dependiente de caspasas, otros tipos de muerte celular como la necroptosis o la muerte inducida por AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) podrían estar implicados. Estos últimos datos podrían explicar en parte por qué no se observa un efecto citotóxico cooperativo en el tratamiento combinado con los LUV-TRAIL a pesar de observar un mayor procesamiento de las caspasas en el análisis proteico y sí en la combinación con TRAIL soluble. Podría ser posible que estén interviniendo en mayor medida otros tipos de

muerte celular independientes de caspasas en el caso de la combinación con TRAIL soluble, de los que no se beneficia en tanta medida cuando se combinan carfilzomib con los LUV-TRAIL y que hace que en última instancia el efecto citotóxico sea mayor en la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble que en la combinación con los LUV-TRAIL.

5. Conclusiones

1. Carfilzomib inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en las líneas tumorales celulares provenientes de MM, MM.1S y U266 siendo la línea celular MM.1S más sensible a la acción citotóxica de carfilzomib.
2. TRAIL soluble y los LUV-TRAIL inducen apoptosis de manera limitada en las líneas tumorales celulares provenientes de MM, MM.1S y U266.
3. El tratamiento a tiempos largos (16 y 24 horas) con carfilzomib aumenta la expresión del receptor mortal DR5 en la línea tumoral celular U266.
4. Aunque la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble y los LUV-TRAIL muestra una mayor activación de la vía extrínseca de la apoptosis, no existe un claro efecto citotóxico sinérgico cuando se combina carfilzomib con ambas formulaciones de TRAIL.
5. La muerte inducida por la combinación de carfilzomib con TRAIL soluble o asociado a liposomas es parcialmente dependiente de TRAIL y de la activación de las caspasas.

6. Conclusions

1. *Carfilzomib inhibits cell proliferation and induces apoptosis in cell lines MM.1S and U266, being cell line MM.1S more sensitive to the cytotoxic action of carfilzomib.*
2. *Soluble TRAIL and LUV-TRAIL induce limited apoptosis in cell lines MM.1S and U266.*
3. *Long-term treatment (16 and 24 hours) with carfilzomib increases the expression of the DR5 deadly receptor in the U266 cell tumor line.*
4. *Although the combination of carfilzomib with soluble TRAIL and LUV-TRAIL shows increased activation of the extrinsic pathway of apoptosis there is no clear cytotoxic synergistic effect when carfilzomib is combined with both TRAIL formulations.*
5. *Death induced by the combination of carfilzomib with soluble or liposome-associated TRAIL is partially dependent on TRAIL and activation of caspases.*

7. Bibliografía

1. Kyle, Robert A., & Vincent Rajkumar S. Multiple Myeloma. *Blood*. **111**.6, 2962–2972 (2008).
2. López-Royuela, N. et al. Biochimica et Biophysica Acta Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells. *BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 311–322 (2010).
3. Jarauta, V. et al. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* **382**, 1–10 (2016).
4. De Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H. & Martinez-Lostao, L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ.* **23**:733-47 (2016).
5. Kaspar, A. A. et al. A Distinct Pathway of Cell-Mediated Apoptosis Initiated by Granulysin. *J Immunol.* **167**, 350-356 (2001).
6. Robillard, N. et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **45**, 1248–1252 (2005).
7. Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. Multiple Myeloma : Evolving genetic events and host interactions. *Nature Rev Cancer.* **2**, 175-187 (2002).
8. Fonseca, R. et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. **23**, 2210–2221 (2009).
9. Philip, R. et al,. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* **23**, 3412-6281 (2005).
10. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* **21**, 5047-5056 (2015).
11. Ogasawara, J. et al. Lethal effect of anti-Fas in mice. *Nature*. **364**, 806-809 (1993).
12. Holoch, P. A. & Grif, T. S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol.* **625**, 63–72 (2009).
13. Walczak, H. et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Med.* **5**, 157–163 (1999).
14. Lemke, J., Karstedt, S. Von, Zinngrebe, J. & Walczak, H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Diff.* **21**:1350-64 (2014).
15. Nicholson, D. W. Caspase structure , proteolytic substrates , and function during apoptotic cell death. *Cell Death Diff.* **6**, 1028–1042 (1999).
16. Martinez-Lostao, L., Marzo, I., Anel, A. & Naval, J. Targeting the Apo2L/TRAIL system for the therapy of autoimmune diseases and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1475–1483 (2012).
17. Elmore, S. et al. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* **35**, 495-516 (2014).

18. Thomas, S. *et al.* Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 61–75 (2013).
19. Yu, J. W. & Shi, Y. FLIP and the death effector domain family. *Oncogene*. **27**, 6216–6227 (2008).
20. Almagro, M. C. De & Vucic, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol.* **34**, 200–211 (2012).
21. Hymowitz, S. G. *et al.* A Unique Zinc-Binding Site Revealed by a High-Resolution X-ray Structure of Homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **39**, 633–640 (2000).
22. Gómez-benito, M., Martínez-lorenzo, M. J., Anel, A., Marzo, I. & Naval, J. Membrane expression of DR4 , DR5 and caspase-8 levels , but not Mcl-1 , determine sensitivity of human myeloma cells to Apo2L/TRAIL. *Exp Cell Res.* **313**, 2378–2388 (2007).
23. Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E. & Micheau, O. Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol.* **26**, 7046–7055 (2006).
24. Dorothée, G. *et al.* Tumor-Infiltrating CD4+ T Lymphocytes Express APO2 Ligand (APO2L)/TRAIL upon Specific Stimulation with Autologous Lung Carcinoma Cells: Role of IFN- α on APO2L/TRAIL Expression and -Mediated Cytotoxicity. *J Immunol.* **169**, 809–817 (2017).
25. Monleón, I. *et al.* Differential Secretion of Fas Ligand- or APO2 Ligand/TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Carrying Microvesicles During Activation-Induced Death of Human T Cells. *J Immunol.* **167**, 6736–6744 (2015).
26. Fulda, S. The dark side of TRAIL signaling. *Cell Death Differ.* **20**, 845–846 (2013).
27. Bhattacharyya, S., Yu, H., Mim, C. & Matouschek, A. Regulated protein turnover : snapshots of the proteasome in action. *Nature Rev Mol Cell Biol.* **15**, 122–133 (2014).
28. Ruschak, A. M., Slassi, M., Kay, L. E. & Schimmer, A. D. Novel Proteasome Inhibitors to Overcome Bortezomib Resistance. *J Natl Cancer Inst* **103**, 1007–1017 (2011).
29. Irwin, D. *et al.* Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *New England J Med.* **352**, 2487–2498 (2005).
30. De Miguel, D. *et al.* Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk Res.* **39**, 657–66 (2015).
31. De Miguel, D. *et al.* High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer. *Cancer Lett.* **383**, 250–260 (2016).

8. Anexo

8.1 Composición del gel de poliacrilamida-SDS

Resolving	12% (ml)	6% (ml)
Acrilamida (30%)	4	2
Tampón resolving	2,5	1,25
SDS (10%)	0,1	0,05
Agua destilada	3,35	5,35
APS (10%)	0,15	0,15
TEMED	0,015	0,015

Stacking	12% (ml)	6% (ml)
Acrilamida (30%)	4	2
Tampón stacking	1,26	1,26
SDS (10%)	0,1	0,05
Agua destilada	3,35	5,35
APS (10%)	0,15	0,15
TEMED	0,015	0,015

8.2 Composición de los LUVs

Lípidos	Porcentaje (%)
Fosfatidícolina	55
Esfingomielina	30
Colesterol	10
DOGS-NTA-Ni	5