



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Mecanismo de la muerte celular inducida por
inhibición del metabolismo energético en células
de mieloma múltiple**

**Cell death mechanism induced by energetic
metabolism deprivation in multiple myeloma cell
lines**

Autor

Judit Rial Saborido

Directores

Isabel Marzo Rubio

Joaquín Marco Brualla

Facultad de ciencias

Departamento de bioquímica y biología molecular y celular

2017

Índice

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	2
2.1.	Bases moleculares del cáncer.....	2
2.1.1.	Metabolismo energético.....	2
2.2.	Fármacos metabólicos.....	3
2.3.	Mieloma múltiple.....	4
2.3.1.	Tratamiento.....	4
2.3.2.	Terapias emergentes.....	5
2.4.	Muerte celular programada o apoptosis.....	6
3.	Objetivos.....	7
4.	Materiales y métodos.....	8
4.1.	Trabajo en esterilidad.....	8
4.2.	Cultivos celulares.....	8
4.2.1.	Líneas celulares.....	8
4.2.2.	Medios de cultivo.....	8
4.2.3.	Contaje y determinación de la viabilidad celular.....	8
4.2.4.	Mantenimiento de los cultivos celulares.....	9
4.3.	Citometría de flujo.....	9
4.3.1.	Inducción de apoptosis.....	9
4.4.	Análisis de proteínas.....	10
4.4.1.	Extracción de lisados celulares.....	10
4.4.2.	Cuantificación proteica.....	10
4.4.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	11
4.4.4.	Transferencia de proteínas a membrana de PVDF.....	11
4.4.5.	Análisis de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 mediante western-blot....	12
5.	Resultados.....	13
5.1.	Curvas dosis-respuesta de las líneas celulares enfrentadas a fármacos metabólicos....	13
5.2.	Efecto sinérgico entre fármacos metabólicos (ritonavir, metformina, 2-deoxiglucosa) y fármacos de tratamiento de mieloma múltiple (carfilzomib y Bcl-2 inhibitor)	14
5.2.1.	Efecto sinérgico entre ritonavir y carfilzomib.....	14
5.2.2.	Efecto sinérgico entre metformina y carfilzomib.....	15
5.2.3.	Efecto sinérgico entre 2-deoxiglucosa y carfilzomib.....	15
5.2.4.	Efecto sinérgico entre ritonavir y Bcl-2 inhibitor.....	15
5.2.5.	Efecto sinérgico entre metformina y Bcl-2 inhibitor.....	16
5.2.6.	Efecto sinérgico entre 2-deoxiglucosa y Bcl-2 inhibitor.....	16
5.3.	Efecto del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk sobre las tres líneas celulares tratadas con las combinaciones de fármacos.....	17
5.4.	Análisis de la expresión de proteínas anti-apoptóticas.....	18
6.	Discusión.....	19
7.	Conclusiones.....	23
8.	Bibliografía.....	24

1. Resumen

La oncogénesis es un proceso mediante el cual una célula normal se convierte en célula tumoral, con capacidad de proliferación descontrolada y posibilidad de formar un tumor maligno. Entre las múltiples alteraciones que sufre una célula tumoral, cabe destacar las variaciones en el metabolismo energético, ya que las células tumorales utilizan la glucólisis para obtener energía incluso en presencia de oxígeno, lo que se conoce como “Efecto Warburg”. Esta característica resulta interesante para generar estrategias terapéuticas contra el cáncer y por ello, en este trabajo se pretende evaluar el potencial que tiene el bloqueo del metabolismo energético para la terapia antitumoral. Para ello, las estrategias seguidas consisten en la búsqueda de efectos sinérgicos entre fármacos metabólicos (ritonavir, metformina y 2-deoxiglucosa) y fármacos quimioterápicos dirigidos contra las células del mieloma (carfilzomib y Byl-719). Los resultados obtenidos muestran que ritonavir, un fármaco inhibidor de la proteasa del VIH y bloqueante del transportador de glucosa GLUT4, sinergiza con carfilzomib, un inhibidor del proteasoma, potenciando el efecto del mismo en las líneas celulares ensayadas. Por otro lado, se aprecia un ligero efecto sumatorio entre la acción de 2-deoxiglucosa, un fármaco inhibidor de la glucólisis, y Byl-719, fármaco emergente para el tratamiento del mieloma que inhibe selectivamente la ruta de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). De forma que, en ambos casos se obtienen mayores niveles de muerte celular en las células tratadas con la combinación de fármacos que con los fármacos por separado. Asimismo, al analizar la expresión de proteínas anti-apoptóticas en diferentes condiciones, se observa un aumento de Bcl-2 y Mcl-1, lo que podría estar relacionado con un mecanismo de resistencia de las células ante a los cambios inducidos en el metabolismo energético.

Oncogenesis is a process whereby normal cells are transformed into cancer cells, which are characterized by an abnormal division, that may end up causing a malignant tumour mass. Among other alterations, cancer cells experiment a phenomena known as “The Warburg effect”, which means that cancer cells alter their energetic metabolism in order to utilize the glycolysis pathway to obtain ATP, even in aerobic conditions. This characteristic has become a promising approach for different types of cancer, so this project’s aim is to evaluate the potential of the energetic metabolism deprivation as a therapy for cancer. To achieve this, the followed strategies were the search of synergistic effects between metabolic drugs (ritonavir, metformin, 2-deoxyglucose) and chemotherapy drugs against myeloma cells (carfilzomib, Byl-719). The obtained results show, on the one hand, that ritonavir, an HIV protease inhibitor which blocks the glucose transporter GLUT4, synergizes with carfilzomib, a proteasome inhibitor, thus strengthening his mechanism of action. On the other hand, it was seen a combinatory effect between 2-deoxyglucose, a glycolysis inhibitor, and Byl-719, an emergent drug for the treatment of multiple myeloma which selectively inhibits the PI3K pathway. In this way, in both cases, higher levels of cell death were observed when cells were treated with the combination of both drugs, in comparison with the drugs alone. Moreover, when the anti-apoptotic proteins’ expression was analysed, an up regulation of Bcl-2 and Mcl-1 was detected, which could be related with a resistance mechanism adopted by the cells facing the changes induced in the metabolism.

2. Introducción

2.1. Bases moleculares del cáncer.

La carcinogénesis, u oncogénesis, es un proceso de múltiples etapas resultado de las alteraciones genéticas que sufre una célula normal, mediante las cuales se transforma en una célula tumoral [1]. Esta célula tumoral tiene una gran capacidad de proliferación descontrolada, responsable de la formación de un tejido neoplásico.

Estas mutaciones son las responsables de la aparición de oncogenes, con ganancia de función, y de genes supresores de tumores, con pérdida de función. El desequilibrio entre ambos genera lo que se conoce como tumor primario o benigno, que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado, pero con permanencia en el tejido de origen [2]. Sin embargo, este tumor primario puede seguir experimentando una serie de cambios que le confieran la capacidad de invadir otro tejido, fenómeno que se conoce como metástasis [3].

Hasta el momento, se han descrito más de 100 tipos de tumores humanos en los diferentes órganos. Estos tumores se caracterizan por una gran heterogeneidad tanto a nivel genético como fenotípico, lo que determina el grado de desarrollo de la enfermedad neoplásica, así como la respuesta a la terapia de los mismos. Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad, todos los tipos de células tumorales comparten una serie de características comunes, esenciales para poder ser definidas como tal: autosuficiencia sobre los factores de crecimiento, insensibilidad a factores inhibidores de crecimiento, evasión de la muerte celular programada o apoptosis, ilimitada capacidad de proliferación, angiogénesis prolongada en el tiempo, capacidad de metástasis [1], la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune [4].

2.1.1. Metabolismo energético

Una de las características de las células tumorales es la capacidad de utilizar la glucólisis para obtener ATP independientemente de la disponibilidad de oxígeno. Esto es lo que se conoce como “Efecto Warburg”, descrito por primera vez por Otto Warburg en 1920 [5].

Las células normales, en presencia de oxígeno, metabolizan la glucosa por medio de la respiración y la fosforilación oxidativa mitocondrial. De esta forma, por cada molécula de glucosa oxidada completamente, se obtienen 34 moléculas de ATP. Sin embargo, las células tumorales, llevan a cabo una glucólisis anaeróbica, incluso en presencia de oxígeno, seguida por un proceso de fermentación láctica [6]. Mediante este proceso, por cada molécula de glucosa oxidada, se obtienen solamente 2 moléculas de ATP. A pesar de que la energía que se obtiene es menor, la velocidad con la que ocurre la glucólisis frente a la respiración mitocondrial, es mucho mayor. De esta forma, las células tumorales abastecen antes la demanda de ATP. Finalmente, el propio efecto Warburg ejerce la función de suplir los requerimientos biosintéticos que supone la proliferación descontrolada de las células tumorales [5]. De esta forma, la glucosa consumida se utiliza como fuente de carbono para procesos anabólicos de síntesis de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Además, el proceso de fermentación regenera rápidamente el NAD^+ necesario para la glucólisis.

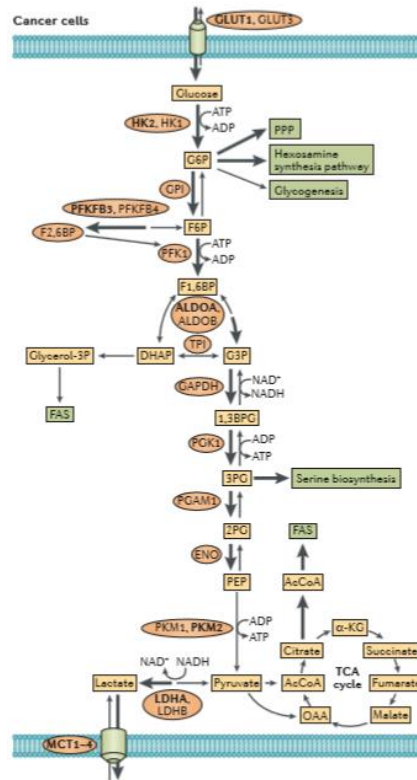


Figura 1. Metabolismo energético de una célula tumoral. [7]

2.2. Fármacos metabólicos.

Como se ha comentado anteriormente, este cambio en el metabolismo energético que sufren las células tumorales es uno de los rasgos identificativos del cáncer [1]. Además de la ventaja proliferativa que supone este cambio, la alteración de numerosas rutas importantes en la célula, también podría conferir resistencia a la apoptosis [8]. Por tanto, la búsqueda de tratamientos que redirijan el metabolismo energético de los tumores puede ser una buena aproximación para la terapia antitumoral.

Algunos de los fármacos que se están estudiando con este objetivo son los siguientes:

- **Ritonavir:** se trata de un fármaco aprobado por la FDA que actúa como inhibidor de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y además es un inhibidor reversible no competitivo del transportador de glucosa GLUT4 [9]. Hay evidencias previas de que este fármaco provoca apoptosis en tumores linfoblásticos, tales como linfoma o leucemia mieloide [10].
- **Metformina:** es un fármaco que se utiliza para tratar la diabetes tipo II, que pertenece a la familia de las biguanidas, siendo la que tiene el perfil más seguro. Es considerado como un activador de la AMP-quinasa (AMPK), la cual actúa como sensor energético que regula múltiples rutas metabólicas [11]. Esta activación es debida a la inhibición moderada del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, lo que genera una alteración del ratio AMP/ATP celular [11]. Dado que está implicado en la alteración del metabolismo energético, se cree que también podría resultar interesante para tratar el cáncer o enfermedades cardiovasculares.

- **2-deoxi-D-glucosa (2DG):** se trata de un análogo estructural de la glucosa que no es reconocido por la primera enzima de la glucólisis, la hexoquinasa, por lo que así altera el metabolismo energético de las células. Además, aumenta el estrés oxidativo, inhibe la glicosilación e induce autofagia. Asimismo, en algunas células tumorales se ha visto que reduce la velocidad de crecimiento y facilita la apoptosis [12].

Estos fármacos no solo se están estudiando para tratar distintos tipos de cánceres de forma individual, sino que se han demostrado efectos sinérgicos entre sí y con otros fármacos, que podrían llegar a ser tratamientos mucho más eficaces contra determinados tumores [13].

2.3. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple es un cáncer de las células B caracterizado por la expansión monoclonal y acumulación de células plasmáticas anormales en la médula ósea, lo cual conlleva al mal funcionamiento de la misma e incluso a la muerte [14, 15].

El mieloma múltiple constituye el 1% de los cánceres y el 10% de las patologías hematológicas. El mieloma evoluciona desde una primera condición conocida como gammapatía monoclonal de significancia indeterminada (MGUS), que tiene una prevalencia del 3% en personas mayores de 50 años, y posteriormente evoluciona a un ritmo de 1% por año [14, 15].

Las células cancerosas producen inmunoglobulinas monoclonales y cadenas pesadas. Los clones en expansión sustituyen a la médula ósea normal provocando anemia y otras citopenias. Asimismo, las células de mieloma producen inhibición de osteoblastos y estimulación de osteoclastos, que conlleva a la aparición de lesiones en los huesos. También suelen aparecer como consecuencia, insuficiencia renal e infecciones recurrentes [14].

Los principales síntomas de la enfermedad son dolor óseo, fatiga, pérdida de peso, parestesia e infecciones recurrentes [15].

2.3.1. Tratamiento

Actualmente, el mieloma múltiple es una enfermedad incurable, ya que las resistencias a tratamientos y la recaída son muy frecuentes, estando implicado en ello el microentorno de la médula ósea mediante la activación de la vía de señalización PI3K/Akt [16].

Sin embargo, existen varios tratamientos, que se aplican en función del paciente y del estadio de la enfermedad [15].

- **Terapia inicial:** el régimen más comúnmente utilizado consta de diferentes combinaciones de fármacos inmunomoduladores (lenalidomida, talidomida), inhibidores del proteasoma (bortezomib), corticoides (dexametasona) y ciclofosfamida [17].
- **Trasplante de células madre:** mejora enormemente la respuesta y alarga la vida media de los pacientes aproximadamente 12 meses. Sin embargo, tiene que aplicarse a pacientes sanos que puedan soportarlo.
- **Terapia de mantenimiento:** se administra tanto la combinación de fármacos como el trasplante de células madre.

- **Terapia de recaída:** debe considerarse el trasplante de células madre en aquellos casos en los que no se haya realizado previamente. Por otro lado, existen numerosos agentes aprobados para esta terapia, como bortezomib o carfilzomib [18].

2.3.2. Terapias emergentes.

Dado que solamente entre el 25 y el 35% de los pacientes refractarios responden al tratamiento, es imprescindible el desarrollo de nuevos fármacos contra el mieloma múltiple. Actualmente, numerosos compuestos están siendo desarrollados y evaluados en ensayos clínicos, algunos de los cuales han demostrado tener una actividad significativa tanto en terapia única como en combinación con otros agentes [15]. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

- **Carfilzomib:** se trata de un inhibidor de la subunidad 20S del proteasoma, al igual que bortezomib. Sin embargo, es mucho más selectivo que bortezomib, ya que es un inhibidor irreversible y, además, presenta menos efectos secundarios. Por el momento, su actividad frente al mieloma, ha sido estudiada en ensayos de fase I [17]. Asimismo, carfilzomib ha sido estudiado en combinación con otros fármacos de primera línea, así como con fármacos destinados a tratar otras enfermedades, como por ejemplo ritonavir (antiviral anti-VIH) [17].
- **Byl-719:** se trata de un inhibidor selectivo de la fosfoinositol 3-quinasa α (PI3K α), que se está estudiando en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de mieloma múltiple y otros tumores sólidos [19]. Se ha visto que este fármaco inhibe la supervivencia de las células de mieloma múltiple. Asimismo, induce la apoptosis, inhibe el ciclo celular provocando la parada en fase G1 e inhibe la señalización de la vía PI3K [20].

2.4. Muerte celular programada o apoptosis

La muerte celular o apoptosis es un proceso biológico altamente conservado que requiere la activación de numerosas cascadas de caspasas, que finalmente desembocan en una serie de alteraciones bioquímicas y morfológicas en la célula características de dicho proceso. Entre los cambios que tienen lugar cabe destacar la fragmentación del DNA, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, encogimiento celular y desintegración mitocondrial [21]. Otro de los cambios que tiene lugar durante la apoptosis es la expresión en la superficie celular de marcadores que favorecen el reconocimiento por macrófagos, permitiendo la fagocitosis de las células apoptóticas [22]. Uno de los marcadores que se expone en la membrana externa durante la apoptosis es la fosfatidilserina, un fosfolípido de membrana que interacciona con la anexina-V y permite la detección de células apoptóticas.

Este mecanismo de apoptosis es fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis celular. Sin embargo, un exceso o defecto de muerte celular es causante de numerosas enfermedades. En este sentido, la inhibición de la apoptosis está implicada en la formación tumoral [23].

En la base de la apoptosis se encuentran las caspasas, unas cisteín proteasas que proteolizan numerosos sustratos celulares. La activación de estas enzimas tiene un estricto control, de hecho, si se bloquean estas caspasas, se elimina la apoptosis [24].

Existen dos vías apoptóticas (*Figura 2*), que responden a diferentes estímulos:

- **Vía extrínseca o de receptores mortales:** esta vía implica interacciones de receptores transmembrana como los de la familia del “factor necrótico tumoral” (TNF). Estos receptores constan de un dominio mortal citoplasmático, que juega un importante papel en la transmisión de la señal mortal desde la superficie al interior celular. Entre los receptores y ligandos que mejor se conocen cabe destacar FasL/FasR y TNF- α /TNFR1. Una vez el ligando se une a su receptor transmembrana correspondiente, se unen al complejo proteínas adaptadoras, que posteriormente se unen con la procaspasa-8, la cual se activa. Una vez es activada esta caspasa, se activa la fase de ejecución de la apoptosis, común con la vía intrínseca.
- **Vía intrínseca o mitocondrial:** esta vía se activa bien por señales intracelulares positivas (radiación, hipoxia, infecciones virales, radicales libres) o negativas (ausencia de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas). Estos estímulos provocan cambios en la estructura de la membrana interna mitocondrial, conformando un poro permeable y liberándose proteínas pro-apoptóticas, como el citocromo C. Posteriormente se forma el apoptosoma (complejo formado por la proteína Apaf-1 y el citocromo C) y así se activa la procaspasa 9 [25]. La regulación de esta vía intrínseca la llevan a cabo miembros de la familia Bcl-2, que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden ser proteínas tanto pro-apoptóticas (Bax, Bak...) como anti-apoptóticas (Bcl-x, Bcl-2, Mcl-1...).

Ambas rutas convergen en la fase de ejecución, considerada el final de la apoptosis. En esta fase tiene lugar una cascada de activación de diferentes caspasas, que tiene como resultado todos los cambios morfológicos descritos previamente.

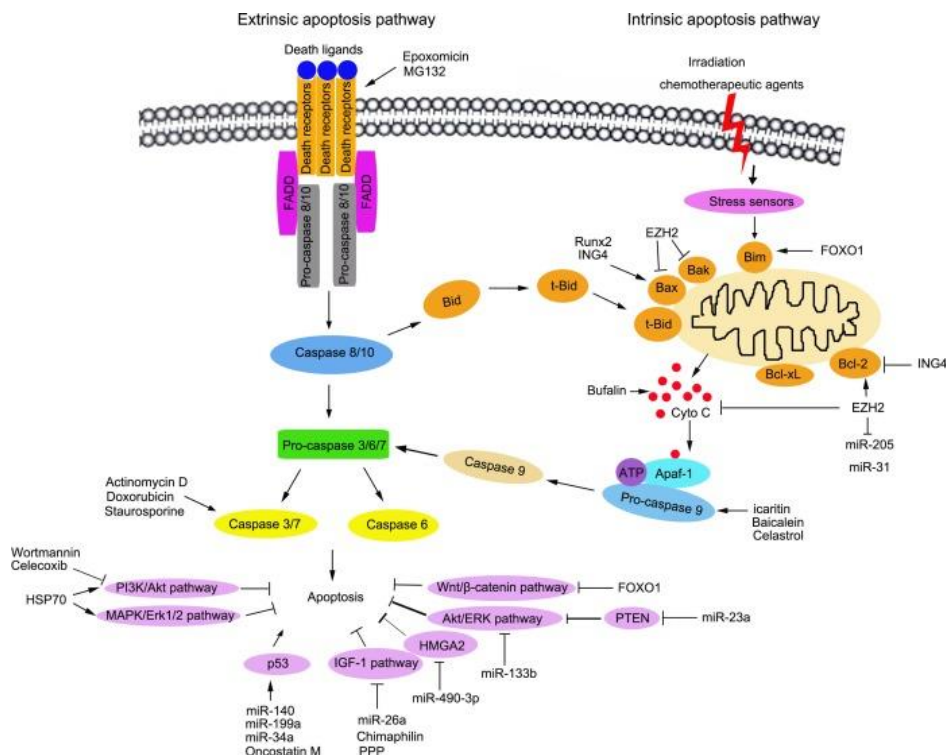


Figura 2. Ruta intrínseca y extrínseca de la apoptosis [26].

3. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar la sensibilidad de diferentes líneas de mieloma múltiple a fármacos que interfieren con el metabolismo de la glucosa, tales como metformina, 2-deoxiglucosa y ritonavir.
- Combinar los fármacos citados anteriormente que produzcan una mayor inhibición del crecimiento de las líneas celulares con fármacos quimioterápicos dirigidos, con el fin de encontrar posibles efectos sinérgicos y de estudiar la influencia sobre el mecanismo de apoptosis.

4. Materiales y métodos

4.1. Trabajo en esterilidad

Dada la presencia de microorganismos y otras partículas en el ambiente con la capacidad de colonizar y contaminar el material de trabajo (cultivos celulares, medios de cultivos, reactivos...), un aspecto imprescindible en el trabajo de laboratorio es la esterilidad. Para ello, todas las manipulaciones de los cultivos celulares, deben realizarse en una cabina de flujo laminar, cuyo objetivo es mantener el aire de la cabina libre de contaminaciones. En este caso, la cabina de flujo laminar utilizada es la cabina Telstar PV-100.

No solo hay que asegurar la esterilidad del aire, sino que, además, todo el material de trabajo correspondiente (pipetas, puntas, frascos de cultivo...) ha de ser previamente esterilizado.

4.2. Cultivos celulares

4.2.1. Líneas celulares

En estos experimentos se ha trabajado con tres líneas celulares de mieloma múltiple, RPMI.8226, U266 y MM.1S.

4.2.2. Medios de cultivo

Para el crecimiento y mantenimiento de estas tres líneas celulares, se trabaja con un medio preparado a partir del medio comercial RPMI (*Gibco*), al que se le suplementa con suero fetal bovino (SFB, *Sigma*) al 10%, GlutaMax (L-alanil-L-glutamina: 2mMm, NaCl: $8,3 \cdot 10^{-3}$ % (v/v), *Gibco*) y antibiótico (penicilina: 10000 U/ml, *Pam Biotech*).

4.2.3. Contaje y determinación de la viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular y el contaje de los cultivos se realizó en cámara Neubauer tras tinción con azul Trypan (*Sigma*). El azul Trypan es un colorante azulado que penetra en las células que han perdido la integridad de la membrana, las células muertas, confiriéndoles un color azulado. De esta forma se pueden distinguir las células viables (sin color) de las células muertas (azules).

Para realizar el contaje, se mezclaron 50 μ l de cada cultivo celular con 50 μ l de una solución azul Trypan (0.4% en NaCl 0.15M) y se depositaron sobre la cámara Neubauer para proceder al contaje con ayuda de microscopio óptico (Optiphot, *Nikon*).

Una vez enfocada la cuadrícula de la cámara Neubauer, se procedió al contaje de las células para determinar la densidad celular. Para ello se contó el número de células viables y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} \cdot \text{dilución} \cdot 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

En la fórmula, el factor 10^4 representa el ajuste de las dimensiones de la cámara.

Por otro lado, la viabilidad se determinó dividiendo el número de células viables entre las células totales.

4.2.4. Mantenimiento de los cultivos celulares

Los cultivos celulares se han dejado crecer en frascos de cultivo de 25 o 75 cm², en los que se ha cultivado un volumen de 7-10 ml y 14-16 ml respectivamente. Los frascos de cultivo utilizados constan de un tapón de filtro para facilitar el intercambio de gases en la estufa. Las condiciones de la estufa eran las adecuadas para un cultivo celular, una temperatura de 37°C y un nivel de CO₂ en torno al 5%.

Una vez sembrados los frascos de cultivo, se dejaron crecer las células hasta alcanzar la saturación, momento en el que se procedió al conteo de las células viables (descrito en el apartado 4.2.3). Una vez determinada la densidad, se realizaron subcultivos con una menor concentración celular ($8 \cdot 10^4$ y $1.3 \cdot 10^5$ células/ml) y se dejaron crecer hasta que de nuevo alcanzaran la saturación. De esta forma, fue necesario repetir este proceso cada vez que el medio alcanzaba la saturación, cada 2-3 días aproximadamente.

4.3. Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para analizar los niveles de apoptosis en los cultivos celulares tras tratarlos con diferentes fármacos. El citómetro utilizado fue el citómetro *BD FACSCalibur* (*BD Biosciences*) y los datos se procesaron haciendo uso del programa *CellQuest Pro*.

4.3.1. Inducción de apoptosis

El objetivo de estos experimentos fue determinar los niveles de apoptosis tras tratar las líneas celulares con diferentes fármacos. El análisis por citometría de flujo realizado analiza los niveles de fosfatidil serina expuesta en la membrana de las células. Para ello, se utiliza una proteína, anexina V, que interacciona específicamente con la fosfatidilserina. Además, la anexina-V está acoplada a un fluorocromo rojo, DY-634 ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$: 635/658 nm). De esta forma, se detecta el marcaje por el fluorocromo de las células que expongan fosfatidilserina en la membrana, es decir, las células muertas.

Para realizar el marcaje, se necesita una densidad celular de al menos 10^5 células/ml, que han sido previamente sembradas en placas y tratadas con los fármacos correspondientes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 o 48 horas), el contenido de cada uno de los pocillos, se traspasó a un tubo de citómetro. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se añadió a cada punto 100 μ l de la solución de marcaje, ABB (*Annexin Binding Buffer*), que contiene 1.5 μ l de anexina-V. Se dejó incubar las células con la solución de marcaje durante 20 minutos en oscuridad.

Finalmente, se diluyó cada punto en 100-200 μ l de ABB sin anexina-V, y ya se analizaron las muestras en el citómetro.

4.4. Análisis de proteínas

4.4.1. Extracción de lisados celulares

En primer lugar, se hizo una determinación de la densidad y viabilidad celular (descrito en el apartado 4.2.3), que se utilizará posteriormente para la cuantificación de proteínas totales de cada muestra.

En cada punto, se pasaron las células a tubos Falcon, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen de PBS (tampón fosfato salino) de 5 ml aproximadamente. Se volvieron a centrifugar las células y se volvieron a lavar en PBS, pero en un volumen de 1 ml, para posteriormente pasar el contenido a tubos eppendorf. Se volvió a realizar una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos.

Una vez lavadas las células, se añadió a cada muestra el volumen correspondiente de tampón de lisis 1X (Triton-X-100 al 1%, *Sigma*; NaCl 150 mM, *Merck*; Tris/HCl 50 mM pH 7.6, *Sigma*; glicerol 10% v/v, *Scharlau*; EDTA 1 mM, *Sigma*; ortovanadato sódico 1mM pH 7.6, *Sigma*; pirofosfato sódico 10 mM, *Sigma*; leupeptina 10 µg/ml, *Sigma*; fluoruro de sodio 10 mM, *Sigma*; fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, *Sigma*), para mantener la proporción 20 µl de tampón de lisis 1X por cada 10⁶ células, y se incubó 30 minutos en hielo.

A continuación, los lisados se centrifugaron 30 minutos a 14000 rpm a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a tubos eppendorf nuevos. A estos nuevos tubos eppendorf se les añadió el volumen correspondiente de tampón de carga 3X (Tris/HCl 150 mM pH 7.4, *Sigma*; 3% dodecilsulfato de sodio, SDS, *Merck*; molibdato de sodio; glicerol 30% v/v, *Scharlau*; 2-β-mercaptopetanol 30% v/v, *Sigma*; azul de bromofenol 0.06% p/v).

Una vez preparados los lisados celulares, fueron conservados a -20°C para usos posteriores o bien se calentaron a 95°C durante 5 minutos en un baño seco (*Selecta*) para ser cargados posteriormente en los geles de electroforesis.

4.4.2. Cuantificación proteica

Para cuantificar los niveles de proteína de cada uno de los lisados celulares, se procedió a realizar el ensayo del Ácido Bicinchonínico (BCA). Este ensayo se basa en la capacidad de las proteínas de reducir Cu²⁺ en un medio alcalino. De forma que los iones Cu⁺ generados, interaccionan con las moléculas de BCA, cambiando de configuración electrónica y absorbiendo así luz a 562 nm, lo cual se traduce en una coloración púrpura. La coloración generada debida a la absorción es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra.

Para poder establecer la relación entre la absorción y la concentración, es necesario realizar previamente una recta de calibrado con muestras de concentración proteica conocida. Para realizar la recta de calibrado, se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) 200 µg/ml.

Posteriormente, en una placa de 96 pocillos con fondo transparente plano, se prepararon las muestras para la recta de calibrado y las de los lisados celulares. En cuanto a la recta de calibrado, se analizaron 8 concentraciones de BSA (volumen final de 100 µl), generadas mediante diluciones seriadas en PBS a partir de la disolución preparada previamente. Por otro lado, se sembraron 100 µl de cada una de las muestras de lisados celulares.

Tanto la recta de calibrado como las muestras de lisados celulares se analizaron por duplicado. Además, se incluyeron cuatro pocillos con 100 µl de PBS como blanco.

Una vez sembrados, todos los pocillos, se añadió a cada uno de ellos 100 µl del reactivo BCA (*Thermo scientific*) (3 ml reactivo A, 2.88 ml reactivo B, 120 µl reactivo C). Se dejó incubar la placa a 60°C durante 20 minutos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA MR5000 (*Dynatech*).

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se procedió al análisis de datos, para poder calcular, a partir de la ecuación de la recta de calibrado, la concentración de proteína de cada muestra. De esta forma, en la posterior electroforesis, se cargará el volumen correspondiente de cada muestra con el objetivo de cargar la misma concentración proteica en todas las muestras.

4.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS se realizó en geles verticales discontinuos de 0.2 mm de espesor, siendo los dos geles de la misma composición, pero en distinta proporción:

- Gel concentrador (stacking gel): gel superior, de aproximadamente 2 cm de longitud.
- Gel separador (resolving gel): gel inferior, de aproximadamente 10 cm de longitud.

La composición de los geles fue la siguiente:

	Stacking gel	Resolving gel (12%)
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.65 ml	4 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.26 ml	-
Tris-HCl 0.5 M pH 8.8	-	2.5 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl
Agua destilada	3 ml	3.35 ml
APS 10%	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl
Volumen total	5.18 ml	10.17 ml

Tabla 1. Composición de los geles de acrilamida/SDS utilizados para realizar electroforesis

La electroforesis se realizó en cubetas de Hoefer miniVE (*GE Healthcare*) con aproximadamente 1 litro de tampón de electroforesis, previamente preparado (Trizma 19 Mm, *Sigma*; glicina 1.9, *Panreac*; 0.01% SDS, *Merck*). Una vez preparado el montaje de electroforesis, se cargaron los lisados celulares, previamente preparados (descrito en el apartado 4.4.1) y también se cargó una muestra del marcador de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder). Finalmente, se conectó el dispositivo a la fuente de energía, se configuraron las condiciones: 180 V y 20 mA durante 120 minutos, y se puso en marcha la electroforesis.

4.4.4. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF

Las proteínas separadas previamente en el gel de electroforesis se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (*Amersham Hybond™-P, GE Healthcare*) siguiendo el protocolo descrito anteriormente en [27], con la diferencia de que se activó la membrana previamente en metanol durante 4 minutos.

La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca (*BioRad*) a 20 V y 400 mA durante 75 minutos en tampón de transferencia (Tris/HCl 48mM pH 8,3, *Sigma*; glicina 39 mM, *Sigma*; 0,0373% SDS, *Merck*; 20% metanol grado HPLC, *Panreac*).

4.4.5. Análisis de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 mediante western-blot

Las membranas de PVDF con las proteínas fijadas previamente mediante la transferencia, se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCL 10 Mm pH 8, *Sigma*; NaCl 0.12 M, *Sigma*; Tween-20 0.1%, *Sigma*; timerosal, *Merck* 0.1 g/L) durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos, se lavó la membrana con tampón B 3 veces durante 10 minutos.

La detección de las proteínas Bcl-2 y Mcl-1 se realizó con la ayuda de anticuerpos policlonales de conejo y ratón respectivamente (*Cell Signaling Technologies*) y los marcadores de pesos moleculares coloreados sirvieron como referencia para calcular los pesos moleculares relativos de las proteínas detectadas. La incubación con este anticuerpo primario se realizó en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo, a una concentración de 1/1000 y durante 24 horas. Tras esta incubación, se realizaron tres lavados de 15 minutos en agitación con tampón B. Posteriormente, se realizó la incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa (*Sigma*) a una concentración de 1/20000 en la misma disolución de tampón B al 2% de leche desnatada en polvo. La incubación con el anticuerpo secundario se mantuvo durante 1-2 horas a temperatura ambiente y en agitación, tras lo cual se realizaron tres nuevos lavados de 15 minutos con tampón B para eliminar exceso de anticuerpos.

La detección de los complejos proteína-anticuerpo se llevó a cabo mediante revelado por quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación de un sustrato quimioluminiscente por parte de la peroxidasa. Para ello, se incubó la membrana con Pierce® ECL Western Blotting Substrate (*Thermo Scientific*) durante 2 minutos y posteriormente, la luz emitida fue captada por películas fotográficas (High performance chemiluminescence film, *GE HealthCare*). El tiempo de exposición de la película a la membrana fue también de 2 minutos. La exposición de las películas se llevó a cabo dentro de un cassette de revelado radiológico (Hypercassette™, *Amersham Bioscience*) y en un cuarto oscuro con iluminación adecuada para revelado fotográfico. Tras la exposición, las películas se revelaron mediante inmersión en soluciones de revelador, después agua destilada y finalmente fijador, variando el tiempo de inmersión en la solución de revelador según la señal obtenida, evitando una larga exposición para no aumentar la coloración inespecífica de la membrana. La preparación de las soluciones de revelador (*Sigma*) y fijador (*Kodak*) se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se utilizaron como control de carga inmunoblots anti- β -actina sobre las mismas muestras, siguiendo el mismo protocolo. La β -actina es una proteína estructural abundante en todos los tipos celulares. Las membranas, una vez reveladas, se lavaron con un tampón que contenía glicina 50 mM pH 2.3 durante 15 minutos, y tras lavar dos veces con agua destilada durante 5 minutos se dejó secar hasta el día siguiente y se conservaron en una funda de plástico.

5. Resultados

5.1. Curvas dosis-respuesta de las líneas celulares enfrentadas a fármacos metabólicos

Mediante citometría de flujo, descrito previamente, se analizaron los niveles de muerte celular de las tres líneas celulares de mieloma múltiple, RPMI.8226, U266 y MM.1S, tras el tratamiento con tres drogas metabólicas, ritonavir, metformina y 2-deoxiglucosa durante 24 y 48 horas. El objetivo de estas mediciones era ver la respuesta de las células ante diferentes concentraciones de los fármacos para poder establecer una dosis adecuada para la sensibilización de las mismas en posteriores experimentos.

Se realizaron dos mediciones para cada línea celular con sus respectivos controles. Tras la obtención de los resultados, se calculó la media de los valores y la desviación estándar, y se evaluó su significación estadística utilizando el método t de Student.

En las siguientes figuras se recogen los valores de muerte celular en cada una de las situaciones, representados mediante porcentaje de células positivas a anexina.

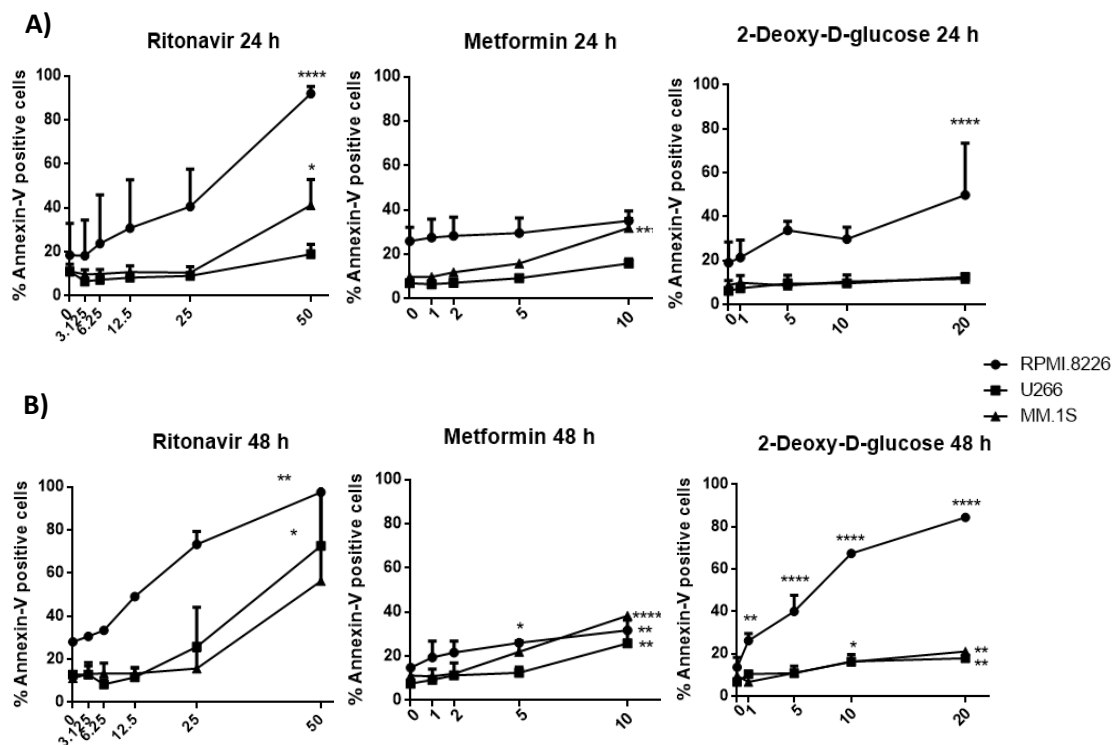


Figura 3.A) Curvas dosis-respuesta de las tres líneas celulares tras incubación con concentraciones crecientes de ritonavir, metformina y 2-deoxiglucosa durante 24 horas. **Figura 3.B)** Curvas dosis-respuesta de las tres líneas celulares tras incubación con concentraciones crecientes de ritonavir, metformina y 2-deoxiglucosa durante 48 horas. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. Los resultados son media \pm SD de $n=2$.

En los tres casos se observa una tendencia de aumento de la muerte celular a medida que aumenta la concentración de los respectivos fármacos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los resultados no pueden considerarse significativamente diferentes del control, ya que los valores de p son superiores a 0.05, probablemente debido a que solo se han realizado dos experimentos independientes.

No obstante, se observa que la línea que resulta más sensible a las tres drogas metabólicas es la línea celular RPMI.8226, donde se observan además datos significativos entre el control y las máximas concentraciones probadas de ritonavir y 2-deoxiglucosa.

Asimismo, se probó el efecto de estas tres drogas metabólicas sobre las líneas celulares durante un periodo de 48 horas, donde se mantiene la tendencia de lo que ocurre a las 24 horas y en algunos casos se observa un aumento de los niveles de muerte celular, como ocurre en la línea RPMI.8226 tras el cultivo con ritonavir y 2-deoxiglucosa, así mismo como en las líneas U266 y MM.1S tras cultivo con ritonavir. Por lo tanto, el efecto del fármaco es dosis dependiente, y en algunos casos también es tiempo dependiente.

5.2. Efecto sinérgico entre fármacos metabólicos (ritonavir, metformina, 2-deoxiglucosa) y fármacos de tratamiento de mieloma múltiple (carfilzomib y Byl-719).

Para estudiar el posible efecto sinérgico de estas drogas con carfilzomib y Byl-719, fármacos emergentes para el tratamiento del mieloma múltiple, se analizó mediante citometría de flujo la muerte celular de las tres líneas celulares tras incubación con los fármacos durante 24 horas.

Se realizaron dos mediciones para cada línea celular con sus respectivos controles. Tras la obtención de los resultados, se calculó la media de los valores y la desviación estándar, y se evaluó su significación estadística utilizando el método t de Student.

A continuación, se recogen las figuras que representan los valores de muerte celular de cada línea celular tras la incubación durante 24 horas con los fármacos correspondientes.

5.2.1. Efecto sinérgico entre ritonavir y carfilzomib.

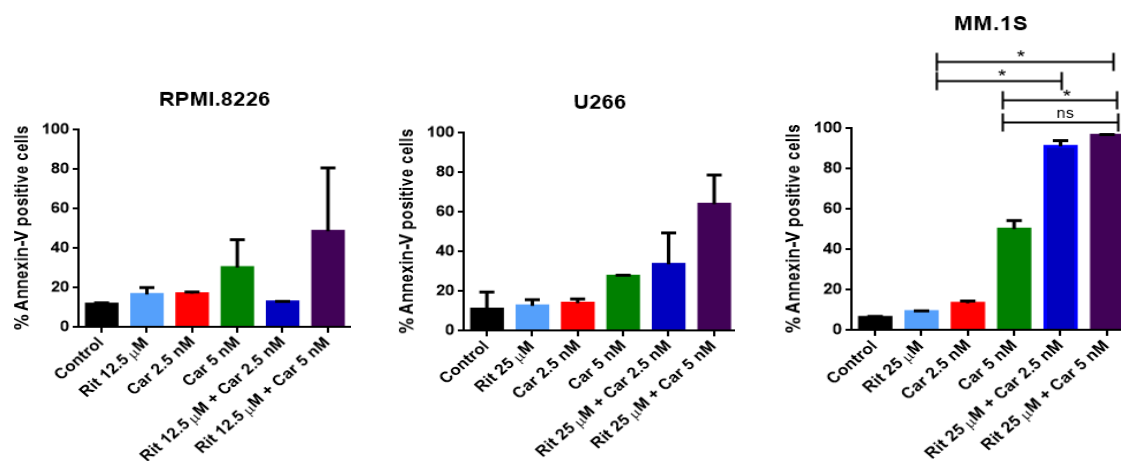


Figura 4. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación ritonavir + carfilzomib durante 24 horas. ns (no significativo), $P > 0.05$; *, $P < 0.05$. Los resultados son media \pm SD de $n = 2$.

Los resultados obtenidos muestran que la combinación de ritonavir con carfilzomib resulta en unos mayores niveles de muerte celular con respecto al tratamiento de cada uno de los fármacos por separado, lo que parece apuntar a la existencia de un efecto sinérgico entre ambos fármacos.

La línea celular en la que mejor se observa este efecto es en la línea MM.1S, única línea en la que se obtienen resultados estadísticamente significativos para varios datos, ya que se obtiene un valor de P inferior a 0.05.

5.2.2. Efecto sinérgico entre metformina y carfilzomib.

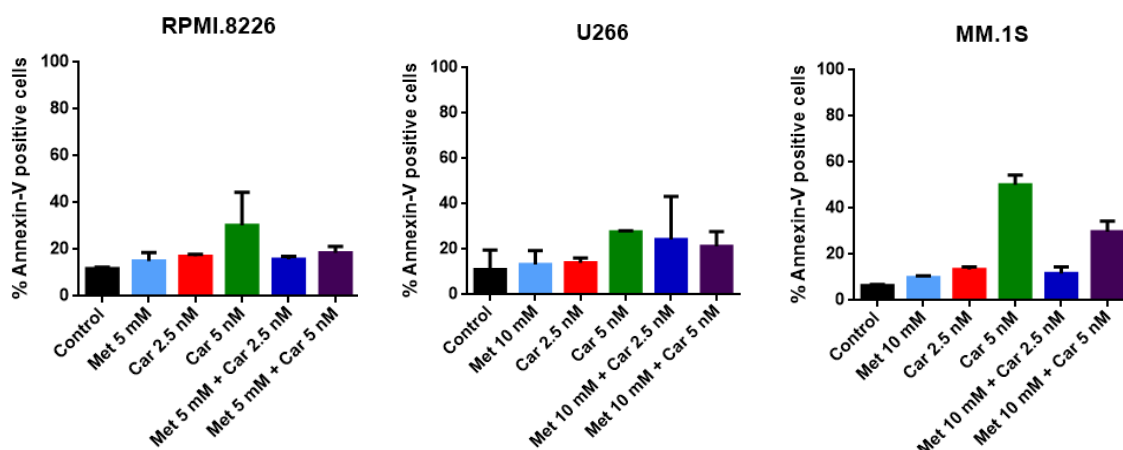


Figura 5. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación metformina + carfilzomib durante 24 horas. Los resultados son media \pm SD de $n=2$.

A diferencia de la combinación de ritonavir con carfilzomib, en este caso no se observa ningún posible efecto sinérgico entre los fármacos en ninguna de las líneas celulares.

5.2.3. Efecto sinérgico entre 2-deoxiglucosa y carfilzomib.

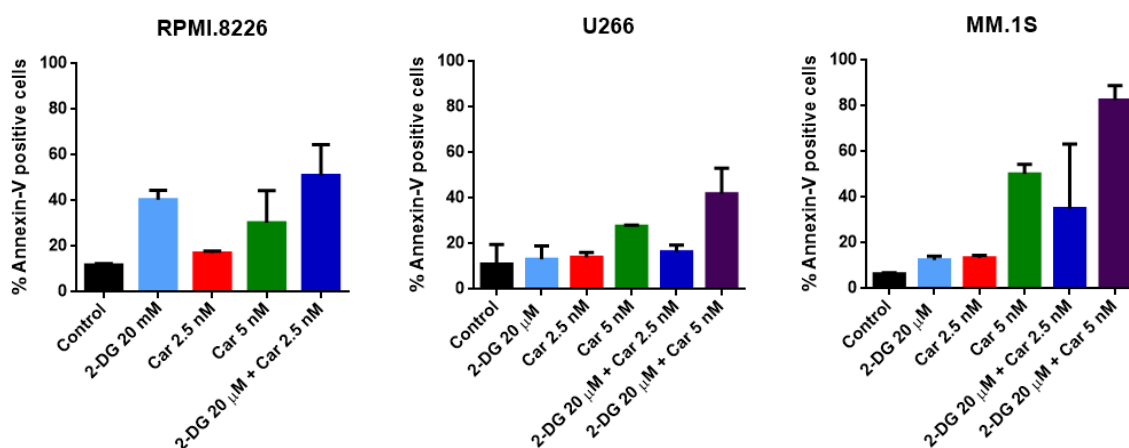


Figura 6. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación 2-deoxiglucosa + carfilzomib durante 24 horas. Los resultados son media \pm SD de $n=2$.

En esta situación, se observa un efecto potenciador, que se evidencia sobre todo en las líneas U266 y MM.1S, de forma que se aprecia que la mortalidad provocada por la combinación de ambas drogas es mayor que la suma de las individuales.

5.2.4. Efecto sinérgico entre ritonavir y Byl-719.

Las dosis de Byl-719 para la búsqueda de sinergia con las drogas metabólicas fueron elegidas en base a datos previos encontrados en la bibliografía. Asimismo, las dosis de las drogas metabólicas se escogieron en cada caso atendiendo a las curvas de dosis-respuesta, eligiendo una dosis suficiente para la sensibilización de las células.

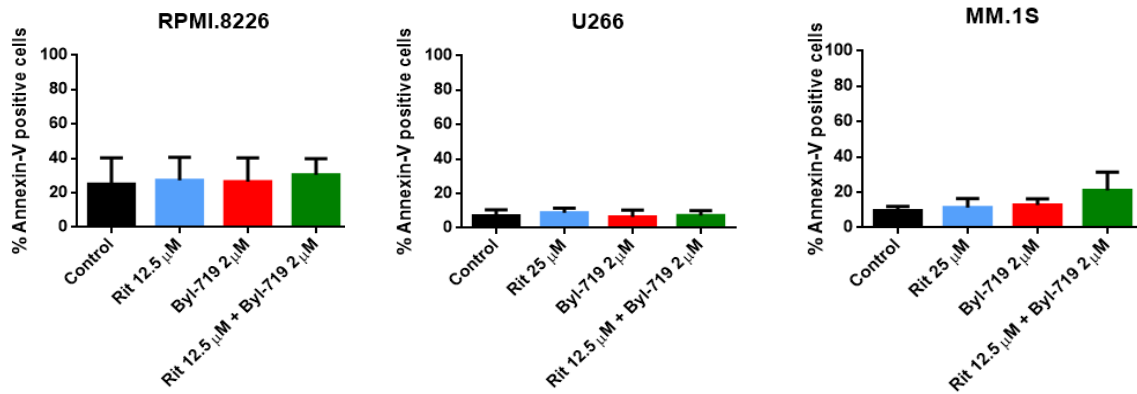


Figura 7. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación ritonavir + Byl-719 durante 24 horas. Los resultados son media +/- SD de n=2.

En la combinación de Byl-719 con ritonavir no se observan variaciones en los niveles de muerte celular, ni diferencias significativas entre la incubación realizada con los fármacos combinados y la incubación con los fármacos de forma independiente.

5.2.5. Efecto sinérgico entre metformina y Byl-719.

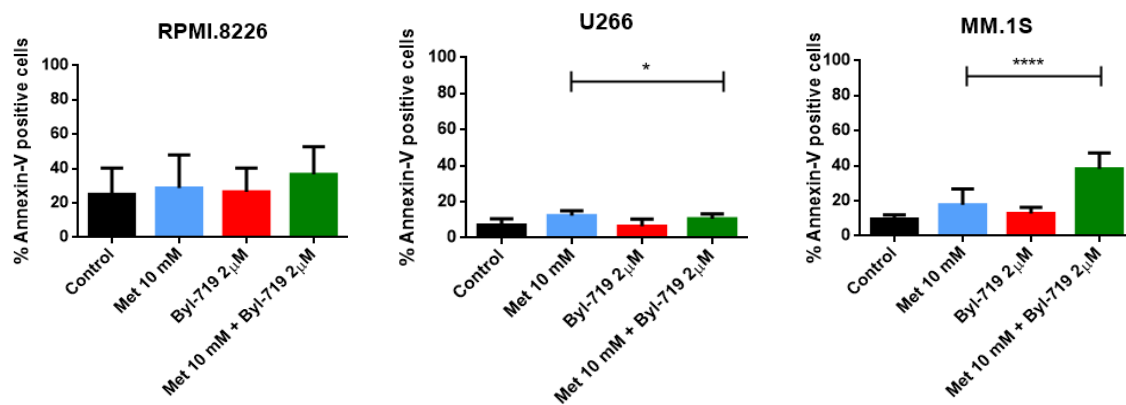


Figura 8. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación metformina + Byl-719 durante 24 horas. *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$. Los resultados son media +/- SD de

En la combinación con metformina, en la línea MM.1S se aprecia un ligero efecto sumatorio, a diferencia de las demás líneas celulares.

5.2.6. Efecto sinérgico entre 2-deoxiglucosa y Byl-719.

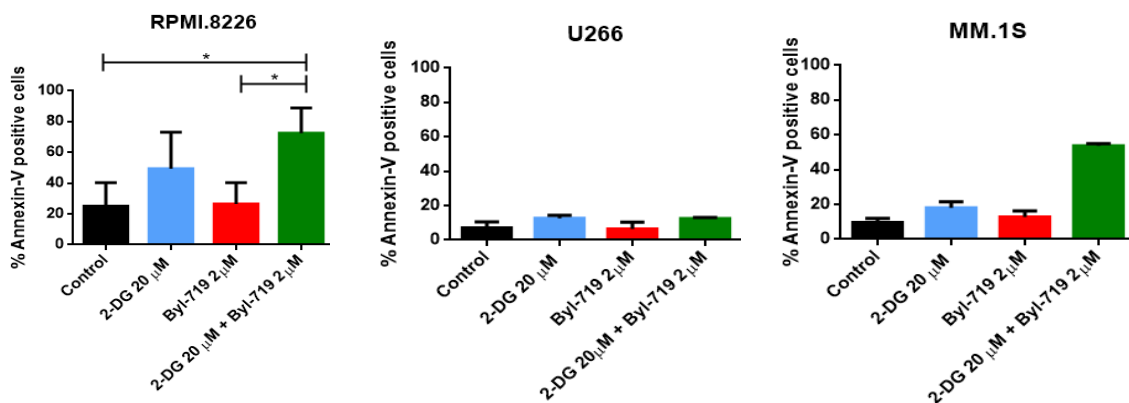


Figura 9. Niveles de muerte celular de las tres líneas celulares tras enfrentarlas a la combinación 2-Deoxiglucosa + Byl-719 durante 24 horas. *, $P < 0.05$. Los resultados son media +/- SD de n=2.

En esta última combinación aparecen indicios de sinergia entre 2-deoxiglucosa y Byl-719, sobre todo en la línea MM.1S y probablemente también en las células RPMI.8226.

5.3. Efecto del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk sobre las tres líneas celulares tratadas con las combinaciones de fármacos.

Con el objetivo de corroborar que los fármacos inducen la muerte de las células mediante el mecanismo de apoptosis, se cultivaron las tres líneas celulares con el fármaco Z-VAD-fmk, un tripéptido permeable inhibidor general de caspasas, por lo que tiene capacidad de inhibir la apoptosis. De esta forma, si el fármaco Z-VAD-fmk actúa adecuadamente, protegerá a las células de la muerte por apoptosis, incluso tras la incubación con los fármacos probados previamente.

En este caso, se realizaron experimentos solamente con las líneas RPMI.8226 y MM.1S, dado que los resultados descritos anteriormente indicaban que línea celular U266 era poco sensible a la mayor parte de las combinaciones. Las combinaciones que se analizaron fueron las que se habían detectado previamente como más efectivas para las células, siendo estas la combinación de ritonavir con carfilzomib y la combinación de 2-Deoxiglucosa con Byl-719.

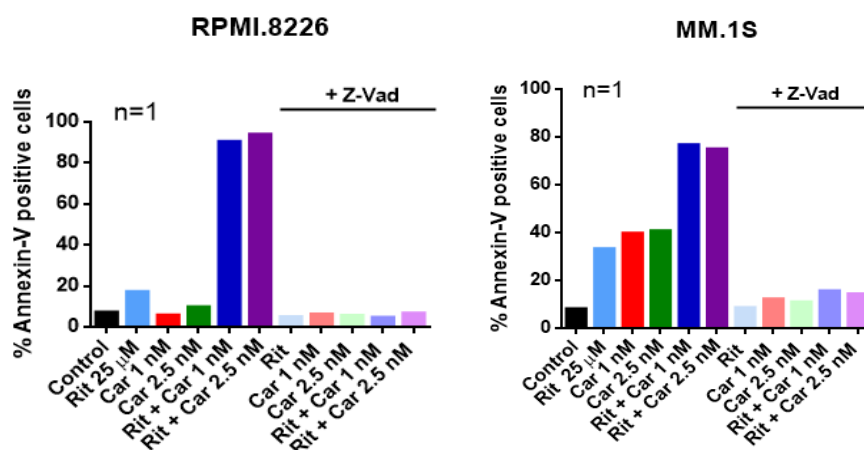


Figura 10. Niveles de muerte celular de las líneas celulares RPMI.8226 y MM.1S tras incubación durante 24 horas con la combinación ritonavir + carfilzomib, en ausencia o en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk.

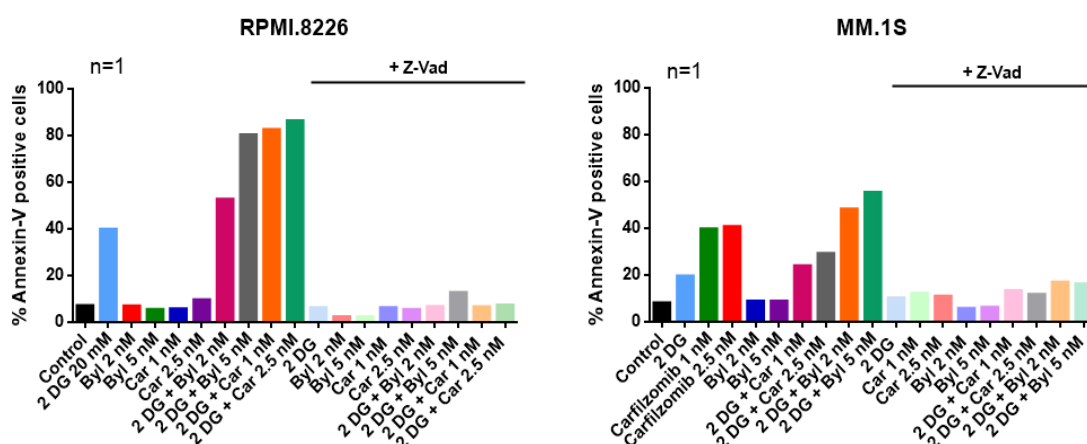


Figura 11. Niveles de muerte celular de las líneas celulares RPMI.8226 y MM.1S tras incubación durante 24 horas con la combinación 2-deoxiglucosa + Byl-719, en ausencia o en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk.

Por un lado, se observa el efecto sinérgico apreciado previamente entre las drogas ritonavir y carfilzomib, así como entre 2-deoxiglucosa y Byl-719. Sin embargo, dado que el experimento solamente se llevó a cabo una vez, estos resultados han de interpretarse con cautela.

Por otro lado, se observa un claro efecto protector del Z-VAD-fmk, ya que las células tratadas con dicho fármaco, presentan unos niveles de muerte basales, incluso inferiores a los del control. Estos resultados indican que la muerte inducida por las combinaciones analizadas requiere la participación de las caspasas.

5.4. Análisis de la expresión de proteínas anti-apoptóticas

Con el objetivo de ampliar el estudio sobre la apoptosis en las líneas celulares estudiadas, se analizó mediante western blot (descrito en el apartado 3.4) la presencia de dos proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y Mcl-1, tras cultivar la línea celular MM.1S con las combinaciones de fármacos en las que se había visto sinergia previamente, carfilzomib con ritonavir, y 2-deoxiglucosa con Byl-719, así como con los fármacos de forma individual.

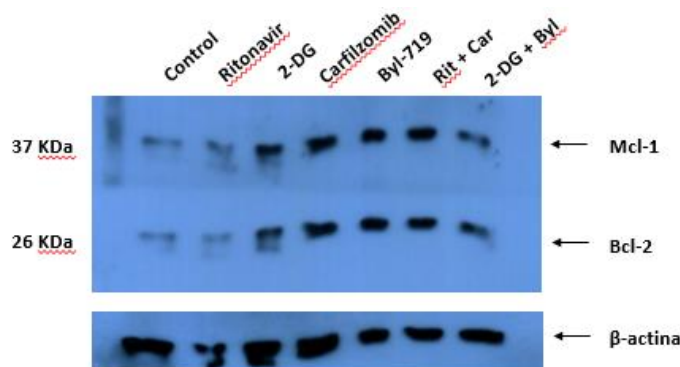


Figura 12. Expresión de Bcl-2 y Mcl-1 mediante Western Blotting en células MM.1S. Las células se incubaron 24 horas con ritonavir 25 μ M, 2-DG 20 mM, carfilzomib 1 nM, Byl-719 2 μ M, así como con la combinación de dichos fármacos. La expresión de β -actina sirvió como control de carga de los lisados en el gel.

Asimismo, se analizó por densitometría la intensidad de las bandas y se normalizaron los resultados con respecto a la actina. A continuación, se recogen los resultados obtenidos al calcular el fold change, el cambio de cada una de las situaciones con respecto al control.

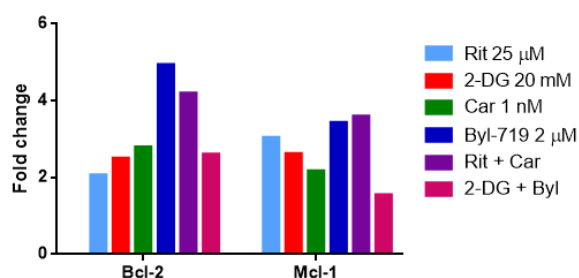


Figura 13. Fold change de los niveles de Bcl-2 y Mcl-1 en cada situación con respecto al control.

Lo que se observa tanto en el western blot como en la gráfica de fold change es que la expresión de ambas proteínas anti-apoptóticas aumenta en todas las situaciones con respecto al control. Los mayores aumentos se observan en el tratamiento con Byl-719 y con la combinación de ritonavir y carfilzomib.

6. Discusión

Actualmente, la terapia inicial para el mieloma múltiple consiste en una combinación de fármacos inmunomoduladores (talidomida) e inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib) [17]. Esta terapia ha mejorado notablemente el pronóstico de los pacientes afectados, sin embargo, estudios recientes demuestran que las células de mieloma múltiple desarrollan resistencia a carfilzomib [28], por lo que surge la necesidad de buscar nuevas terapias o tratar de mejorar las ya existentes.

Teniendo esto en cuenta, el presente trabajo se centra en la búsqueda de alternativas a los fármacos actualmente utilizados, bien mediante la potenciación del efecto anti-neoplásico de los mismos, o bien mediante el estudio de otras potenciales drogas. Para ello, por un lado, se ha tratado de buscar un efecto sinérgico entre carfilzomib y otros fármacos implicados en el metabolismo energético de las células, basándonos en el hecho de que las células tumorales experimentan el efecto Warburg, a diferencia de las células normales [5]. Por otro lado, se ha estudiado también la posible sinergia de estos compuestos con el fármaco emergente Byl-719, inhibidor de PI3K, implicado por tanto en la inhibición de rutas de supervivencia [19].

Evidencias experimentales previas han demostrado que ritonavir, además de ser inhibidor de la proteasa del VIH, inhibe de forma no competitiva al transportador de glucosa GLUT4, por lo que bloquea el paso limitante del metabolismo energético [13]. Esta acción metabólica resulta de interés para el tratamiento del mieloma múltiple, ya que se ha demostrado que las células de mieloma múltiple exponen GLUT4 de forma constitutiva en la membrana celular, dependiendo fuertemente de la actividad del mismo para poder llevar a cabo la glucólisis [29].

Asimismo, se ha visto que ritonavir induce estrés en el retículo endoplasmático, lo que provoca la acumulación de proteínas mal plegadas ubiquitinadas. Combinando este efecto con una inhibición del proteasoma, se consigue inducir la apoptosis en células tumorales [30]. De esta forma, se ha visto que al combinar ritonavir con bortezomib, se consiguen unos niveles de apoptosis superiores al 90% en líneas celulares de sarcoma [31], así como también se ha visto una disminución del crecimiento en células de cáncer renal [30].

Partiendo de estas características y evidencias previas, en este trabajo se ha analizado el potencial efecto de carfilzomib en combinación con ritonavir y otras drogas metabólicas, como metformina y 2-deoxiglucosa. Dado que se ha demostrado la eficacia del efecto combinatorio entre ritonavir y bortezomib, se ha probado a combinar ritonavir con carfilzomib. Ambos inhibidores del proteasoma tienen estructuras químicas y mecanismos de acción similares, por lo que cabría esperar resultados igual de prometedores. Además, carfilzomib presenta algunas ventajas con respecto a bortezomib, ya que es más selectivo y causa menos efectos secundarios.

En trabajos anteriores, se ha descrito [31] que la combinación bortezomib 20 nM y ritonavir 20 μ M induce apoptosis en un 80% de las células de mieloma de las líneas RPMI.8226 y AMO-1, ya que además del análisis de los niveles de mortalidad, se observó mediante western blotting un aumento en proteínas implicadas en la apoptosis, la caspasa 4 y caspasa 9.

La hipótesis planteada para dar explicación al efecto sinérgico observado consiste en que ritonavir, mediante un aumento del estrés oxidativo del retículo endoplasmático, sensibiliza a las células tanto de mieloma como de sarcoma a la acción de bortezomib, aumentando así los niveles de muerte celular.

En este trabajo, la concentración elegida de ritonavir fue de 25 μ M, dado que en las curvas de dosis-respuesta se considera como una dosis suficiente para sensibilizar a las células, pero no demasiado tóxica que resulte en la muerte de todas las células. Por otro lado, se utilizaron dos dosis diferentes de carfilzomib, 2.5 y 5 nM, elegidas en base a datos previos del laboratorio "Apoptosis, Inmunidad y Cáncer" [32]. Los resultados obtenidos en los experimentos realizados (*Figuras 4 y 10*) muestran un aumento en los niveles de apoptosis en las células tratadas con ambos fármacos, respecto al efecto individual de cada uno de ellos. Este efecto se pone sobre todo de evidencia en la línea MM.1S. En esta línea celular se puede observar claramente un notable aumento de los niveles de apoptosis, sobre todo en la combinación de ritonavir con carfilzomib 2.5 nM. Sin embargo, los resultados no se pueden considerar estadísticamente significativos y requerirían de confirmación en nuevos experimentos independientes. De todas formas, los resultados obtenidos en este caso resultan interesantes ya que indican una posible sinergia entre ambos fármacos, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos previamente en la bibliografía.

Como se ha comentado previamente, el efecto de ritonavir puede atribuirse a dos mecanismos, bien a la inhibición del metabolismo energético mediante el bloqueo de GLUT4, o bien a la generación de estrés en el retículo endoplasmático, que resulta en una sensibilización de las células a la acción de los inhibidores del proteasoma.

Para poder decantar la balanza hacia una de las dos hipótesis, se combinó carfilzomib con otras drogas metabólicas, 2-deoxiglucosa y metformina, con el objetivo de ver si estos inhibidores, más específicos del metabolismo energético, también potencian el efecto de carfilzomib. Los resultados obtenidos en este trabajo (*Figuras 5 y 6*) no parecen mostrar una tendencia al efecto sinérgico de los fármacos en cuestión. En el caso de la metformina, no se observa ningún tipo de sinergia ni efecto combinatorio, mientras que en el caso de la 2-deoxiglucosa, parece que los niveles de muerte celular son más elevados en las células tratadas con la combinación farmacológica. Sin embargo, no se puede considerar la presencia de un efecto sinérgico, ya que los niveles de muerte provocados por carfilzomib o 2-deoxiglucosa de forma individual son muy elevados, por lo que la diferencia con respecto a la combinación no es significativa.

Por un lado, no se han obtenido resultados prometedores al tratar las células con metformina, lo cual puede estar relacionado con su mecanismo de acción. La metformina tiene un efecto anti-tumoral directo y otro efecto más indirecto. Por un lado, el mecanismo indirecto está relacionado con la disminución del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), encargado de estimular el crecimiento celular y protección frente a la apoptosis. Por lo tanto, la metformina compromete los niveles de IGF-1, que tiene como consecuencia la alteración del crecimiento y supervivencia [33]. Por otro lado, el mecanismo de acción directo está relacionado con la activación de la ruta de supervivencia AMPK, que a su vez inhibe a mTOR, causando como efecto final una disminución global de la síntesis proteica, el ciclo celular y la proliferación celular [33].

Asimismo, la metformina induce la reducción de la fosforilación oxidativa [11], por lo que podría resultar interesante combinarla con otros fármacos metabólicos cuyo efecto bloquee la glucólisis, de forma que así se disminuiría el metabolismo energético por ambas vías y se aumentaría la actividad neoplásica. Teniendo esto en cuenta, probablemente se habrían obtenido resultados más prometedores en este trabajo con la combinación de la metformina con otras drogas metabólicas, como 2-deoxiglucosa.

El hecho de que la 2-deoxiglucosa no haya proporcionado resultados prometedores tampoco es de extrañar, pues ya se habían reportado fallos previamente tras la aparición de problemas de toxicidad en ensayos de fase I, en los que la toxicidad aparecía a dosis muy inferiores a las necesarias para poder conseguir efecto en modelos de ratón con tumores sólidos [34]. Sin embargo, esto no nos permite descartar la hipótesis de que una inhibición del metabolismo energético favorezca la apoptosis, ya que observaciones recientes sugieren que el paso realmente limitante del metabolismo energético es el transporte de la glucosa [29]. Por ello, esto podría explicar la mejor acción combinatoria de carfilzomib con ritonavir, pero no con metformina ni 2-deoxiglucosa, ya que ritonavir es el que tiene actividad de inhibición de GLUT4.

Por todo ello, a pesar de que los datos obtenidos no se pueden considerar estadísticamente significativos y tampoco se puede descartar completamente la hipótesis de inhibición del metabolismo energético, los datos parecen apuntar a que ritonavir favorece la acción de carfilzomib y bortezomib porque sensibiliza a las células haciéndolas más susceptibles a la inhibición del proteasoma, ya que aumenta los niveles de estrés en el retículo endoplasmático.

Por otro lado, otro de los fármacos emergentes para el tratamiento del mieloma múltiple es Byl-719, un inhibidor selectivo de la fosfoinositol 3-quinasa α , que inhibe la señalización de la vía PI3K, implicada en muchos aspectos de las células, como la apoptosis [19]. Dado que es un fármaco bastante reciente, no hay muchas evidencias experimentales previas en la bibliografía, pero sí que se ha demostrado que tiene un efecto sinérgico a concentraciones terapéuticas con inhibidores del proteasoma, carfilzomib y bortezomib en células de mieloma MM.1S [20]. Este efecto sinérgico se justifica con mayores niveles de proteólisis de las caspasas 3 y 9, implicadas en la apoptosis, en presencia de ambos fármacos que al tratar las células con los fármacos por separado [20].

En este trabajo se estudió el efecto combinatorio de Byl-719 con los fármacos metabólicos. En este caso, los resultados obtenidos no son tan prometedores como los resultantes de combinar ritonavir con carfilzomib, pero sí que se observa en algunos casos un cierto efecto combinatorio. Si bien es cierto que en los resultados obtenidos de combinar Byl-719 con ritonavir (*Figura 7*) no se aprecian diferencias en los niveles de mortalidad, analizando las combinaciones con metformina y 2-deoxiglucosa, se aprecia un ligero efecto combinatorio sobre todo en las líneas celulares RPM1.8226 y MM.1S y más notablemente en el caso de la 2-deoxiglucosa. Este efecto combinatorio provoca unos niveles de muerte celular más elevados que la acción de los fármacos por separado, por lo que también podría resultar interesante.

Byl-719 es un inhibidor de la ruta de la PI3K, ruta que tiene múltiples funciones, como el movimiento y compartimentación intracelular, así como la regulación de algunos pasos en la captación y metabolismo de la glucosa [35].

Además, se sabe que la inhibición de esta ruta provoca una disminución de todos los nucleótidos independientemente de sus características, por lo que una hipótesis que se plantea es que el bloqueo de esta ruta interfiera con la producción de ribosa-5-fosfato, precursor para la síntesis de nucleótidos [36]. Esta ribosa-5-fosfato deriva de la ruta de las pentosas fosfato, que a su vez está conectada con la glucólisis. Dado que las células tumorales dependen de la síntesis *de novo* para la síntesis del DNA y poder dividirse adecuadamente [37], una posible vía de actuación sería inhibir esta ruta de la PI3K ya que así se consigue reducir la síntesis *de novo* de nucleótidos. Este efecto inhibitorio se consigue gracias al fármaco Byl-719.

Por otro lado, dado que la 2-deoxiglucosa es un fármaco que inhibe la glucólisis, de esta forma se estaría inhibiendo como efecto colateral la ruta de las pentosas fosfato. Por todo ello, se podría dar explicación al efecto combinatorio observado en los experimentos realizados en este trabajo. Es decir, se combina el efecto inhibitorio de PI3K por acción de Byl-719 con el efecto inhibitorio de la glucólisis por acción de la 2-deoxiglucosa, y mediante ambos mecanismos, lo que se consigue entre otras cosas, es una mayor disminución de los niveles de ribosa-5-fosfato, por lo que se ve comprometida la capacidad de las células tumorales de sintetizar de ácidos nucleicos y, por lo tanto, se ve limitada su capacidad de proliferación y expansión.

La 2-deoxiglucosa, mediante la inhibición del metabolismo energético, induce la muerte celular mediante apoptosis, hecho demostrado en la bibliografía al tratar las células con un inhibidor de caspasas, y que también se ha demostrado en este trabajo con la utilización de Z-VAD-fmk (*Figura 11*). En algunos tipos celulares hematopoyéticos, como el mieloma múltiple, se ha demostrado que la apoptosis inducida por bloqueo de la glucólisis se ejecuta mediante la vía intrínseca. Sin embargo, en otros tipos celulares, se induce un mecanismo en el que interviene la caspasa 8 y que es independiente de la función mitocondrial [38].

Sin embargo, a pesar de este efecto observado en el aumento de la muerte celular, se cree que la 2-deoxiglucosa puede tener diferentes efectos en función de las condiciones del medio y de las células tumorales que se tratan, ya que algunas de ellas pueden responder con un mecanismo de resistencia debido al bloqueo del metabolismo energético, que les fuerza a realizar la fosforilación oxidativa [39]. De hecho, se ha visto que este cambio en el metabolismo energético puede ser un modo de protección celular mediante el aumento de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Mcl-1.

Además, se ha visto que algunos inhibidores del proteasoma, producen un aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas [32, 40], tales como Noxa, Puma o Bim, por lo que esto podría llevar a la célula a tratar de compensar dicho efecto con el aumento de proteínas anti-apoptóticas. Estas afirmaciones, podrían explicar los resultados de western blot obtenidos en este trabajo (*Figuras 12 y 13*), donde se aprecia un aumento con respecto al control de los niveles de ambas proteínas anti-apoptóticas al tratar las células de mieloma con fármacos metabólicos y un fármaco inhibidor del proteasoma.

La ruta que probablemente esté más implicada en este mecanismo de resistencia es la ruta Akt, ruta con múltiples funciones implicadas en la supervivencia celular, tales como el control del equilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas [39].

7. Conclusiones

- El fármaco metabólico ritonavir presenta un efecto sinérgico con el inhibidor del proteasoma, carfilzomib, potenciando así el efecto del mismo sobre la inducción de la apoptosis en las líneas celulares tumorales, sobre todo en las líneas RPMI.8226 y MM.1S.
- Ritonavir inhibe el transportador de glucosa GLUT4, pudiendo ser este su mecanismo de acción para inducir apoptosis, sin embargo, el efecto sinérgico tan fuerte observado con carfilzomib, puede ser debido a que sensibiliza a las células a través del aumento del estrés oxidativo en el retículo, lo cual favorece la inhibición del proteasoma.
- Las drogas metabólicas metformina y 2-deoxiglucosa generan un efecto combinatorio con Byl-719, inhibidor de la ruta PI3K, siendo sobre todo notable en el caso de la 2-deoxiglucosa, lo que podría estar relacionado con que ambos fármacos contribuyen a la disminución de la síntesis de ácidos nucleicos, comprometiendo la proliferación de las células tumorales.
- A pesar de que la combinación con fármacos metabólicos induce mayores niveles de apoptosis, se observa un aumento de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1, que podría indicar que las células desencadenan un mecanismo de defensa ante los cambios en el metabolismo energético inducidos por dichas drogas.
- Ritonavir, a metabolic drug, presents a synergistic effect with bortezomib, a proteasome inhibitor, thus strengthening its mechanism of action on apoptosis among the cell lines, especially RPMI.8226 and MM.1S cell lines.
- Ritonavir inhibits the GLUT4 glucose transporter, being this a possibility to induce apoptosis. However, the synergistic effect with carfilzomib might be due to the sensitization of the cells by augmentation of the stress in the endoplasmic reticulum, thus promoting the proteasome inhibition.
- Metformin and 2-deoxyglucose present a combinatory effect with Byl-719, an inhibitor of the PI3K pathway, being especially remarkable in case of 2-deoxyglucose, which could be related with both drugs contributing to the diminution of the nucleic acid synthesis, compromising the tumour cells' proliferation.
- The combinatory effect with the metabolic drugs induces higher levels of apoptosis. However, an overexpression of anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Mcl-1, is observed, which could point out a defence mechanism developed by the cells facing the changes in the energetic metabolism.

8. Bibliografía

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): 57-70.
2. Grizzi, F. and M. Chiriva-Internati, Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*, 2006. 6: 4.
3. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 2010. 70(14): 5649-69.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): 646-74.
5. Liberti, M.V. and Locasale, J.W, The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Cell*, 2016. 41(3): 211-218.
6. Soga, T., Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci*, 2013. 104(3): 275-81.
7. Hay, N., Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy?. *Nat Rev Cancer*, 2016.
8. Sullivan, L.B. et al. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2016. 16: 680-693.
9. Bajpai, R. et al. Targeting glutamine metabolism in multiple myeloma enhances BIM binding to BCL-2 eliciting synthetic lethality to Venetoclax. *Oncogene*, 2016. 35: 3955-3964.
10. Banno, K. et al. Drug Repositioning for Gynaecologic Tumours: A New Therapeutic Strategy for Cancer. *The scientific world journal*, 2015.
11. Foretz, M. et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*, 2014. 20: 953-966.
12. Zhang, D. et al. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Letters*, 2014. 355: 176–183.
13. Dalva-Aydemir, S. et al. Targeting the Metabolic Plasticity of Multiple Myeloma with FDA-Approved Ritonavir and Metformin. *Clin Cancer Res*, 2014. 21(5): 1161–71.
14. Dimopoulos, M.A. and Terpos, E. Multiple myeloma. *Annals of Oncology*, 2010. 21(7).
15. Al-Farsi, K. Multiple Myeloma: An Update. *Oman Medical Journal*, 2013. 28(1): 3-11.
16. Abramson, H.N. Kinase inhibitors as potential agents in the treatment of multiple myeloma. *Oncotarget*, 2016. 7(49): 81926-81968.
17. El-Amm, J. and Tabbara, I.A. Emerging therapies in Multiple Myeloma. *Am J Clin Oncol*, 2015. 38: 315–321.
18. Rajkumar, S.V. and Kumar, S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 2016. 91(1): 101–119.
19. Wong, C.H. et al. Preclinical evaluation of PI3K inhibitor BYL719 as a single agent and its synergism in combination with cisplatin or MEK inhibitor in nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Am J Cancer Res*, 2015. 5(4): 1496-1506.
20. Azab, F. et al. PI3KCA plays a major role in multiple myeloma and its inhibition with BYL719 decreases proliferation, synergizes with other therapies and overcomes stroma-induced resistance. *British Journal of Haematology*, 2014. 165: 89–101.
21. Gulbins, E. et al. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 279: 605-615.

22. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007. 35(4): 495–516.
23. Brunner, T. and Mueller, C. Apoptosis in disease: about shortage and excess. *The Biochemical Society*, 2003. 39: 119-130.
24. Wang, C. and Youle, R.J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet*, 2009. 43: 95-118.
25. Yuan, S. and Akey, C.W. Apoptosome structure, assembly and procaspase activation, 2013. 21(4): 501-515.
26. Li, J. et al. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget*, 2016. 7(28):44763-44778
27. Anel, A. and Kleinfeld, A.M. Tyrosine phosphorylation of a 100kDa protein is correlated with cytotoxic T-lymphocyte function. Evidence from cis unsaturated fatty acid and phenylarsineoxide inhibition. *J Biol Chem*, 1993. 268(23):17578-87.
28. Zheng, Z. et al. Clarifying the molecular mechanism associated with carfilzomib resistance in human multiple myeloma using microarray gene expression profile and genetic interaction network. *OncoTargets and Therapy*, 2017, 10: 1327-1334.
29. McBrayer, S.K. et al. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood*, 2012. 119(20): 4686-4697.
30. Sato, A., Asano, T., Ito, K. and Asano, T. Ritonavir interacts with bortezomib to enhance protein ubiquitination and histone acetylation synergistically in renal cancer cells. *Urology*, 2012. 79(4).
31. Kraus, M. Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(7): 1940-1948.
32. Jarauta, V. et al. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, 2016. 382(1):1-10.
33. Yu, X. et al. Anti-tumour activity of metformin: from metabolic and epigenetic perspectives. *Oncotarget*, 2017. 8(3): 5619-5628.
34. Raez, L.E. et al. A phase I dose-escalation trial of 2-Deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013. 71 (523).
35. Hu, H. et al. Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin cytoskeleton. *Cell*, 2016 January. 164(3): 433–446.
36. Juvekar, A. et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce DNA damage through nucleoside depletion. *PNAS*, 2016. 4338-4347.
37. Tong, X. et al. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. 19(1): 32–37.
38. Ramírez, S. et al. 2-Deoxyglucose Induces Noxa-Dependent Apoptosis in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 2011. 71(21): 6796-6806.
39. MacFarlane, M. et al. Glucose—a sweet way to die. *Cell Cycle*, 2012. 11(21): 3919-3925.
40. Balsas, P. et al. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSMβ5 overexpression and polyploidy. *Leuk Res*, 2012. 32(2):212-8.