

María Gómez Benito

Estudio de la apoptosis inducida  
por el inhibidor de Farnesil-  
Transferasas BMS-214662,  
APO2l/Trail e interferón alfa en el  
mieloma múltiple humano.  
Aplicaciones terapéuticas

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Javier Naval Iraberri  
Isabel Marzo Rubio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctora

**ESTUDIO DE LA APOPTOSIS  
INDUCIDA POR EL INHIBIDOR DE  
FARNESIL-TRANSFERASAS BMS  
-214662, APO2L/TRAIL E  
INTERFERÓN ALFA EN EL MIELOMA**

Autor

María Gómez Benito

Director/es

Javier Naval Iraberri  
Isabel Marzo Rubio

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2006





**Universidad**  
Zaragoza

## Tesis Doctoral

**Estudio de la apoptosis inducida por el  
inhibidor de farnesil-transferasas BMS-  
214662, Apo2L/TRAIL e interferón-alfa en el  
mieloma múltiple humano. Aplicaciones  
terapéuticas.**

Autor

**María Gómez Benito**

Director/es

**Javier Naval Iraberri**

**Isabel Marzo Rubio**

Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular. Facultad de Ciencias.

Año 2006



D. Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular y Dña. Isabel Marzo Rubio, Investigadora Contratada del Programa Ramón y Cajal, adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “ Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor de farnesil-transferasas BMS-214662, Apo2L/TRAIL e interferón-alfa en el mieloma múltiple humano. Aplicaciones terapéuticas”, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias, bajo nuestra dirección, y que reúne las condiciones requeridas para que su autora, Dña. María Gómez Benito, pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, 28 de Agosto de 2006

Fdo: Javier Naval Iraberri

Fdo: Isabel Marzo





Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a una beca de “Formación de Profesorado Universitario” (F.P.U.) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD).



**“ El sabio se hace con esfuerzo, estudio, tesón, voluntad, perseverando en el camino, aún cuando los resultados no acompañen”**

**Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)  
Premio Nobel de Medicina en 1906.**



**A mis padres**



La realización de esta Tesis doctoral no ha sido para mí una tarea sencilla. Han abundado los momentos de alegría y optimismo cuando los experimentos confirmaban las hipótesis y modelos planteados, pero todavía han sido más abundantes los momentos de desasosiego y desánimo cuando nada parecía encajar. En unos y otros momentos, pero sobretodo en estos últimos, ha sido indispensable el apoyo recibido por parte de mis directores, compañeros, amigos y familiares. Gracias a ellos, cada nuevo obstáculo en mi trabajo se ha convertido en un reto más para hacer ciencia, buena ciencia. Por esto, llegado el momento, es para mí ya no un deber, sino un verdadero placer, agradecerles uno a uno el haber estado ahí:

A mis Directores de Tesis, al **Dr. Javier Naval**, le agradezco ante todo que un día me abriera las puertas de su laboratorio y me introdujera en el apasionante mundo de la apoptosis. De él he aprendido que ser jefe no está reñido con ser humilde, respetuoso y comprensivo y que un becario puede y debe tener ideas. Gracias por tener siempre un momento para escucharme y unas palabras para animarme, por su optimismo, su confianza y su sinceridad. A la **Dra. Isabel Marzo**, por ser quien me sumergió en el mundo de los cultivos celulares y de cuyas manos di mis primeros pasos en el laboratorio. Por ser artífice del aprendizaje de nuevas técnicas, de la adquisición de nuevos aparatos y aportar un poquito de innovación al laboratorio. Por su apoyo en los buenos y malos momentos, su comprensión, respeto y humildad. Y como no, lo olvidaba, por ese humor pícaro que guarda bajo su modosa apariencia. Gracias a ambos por impulsar, durante estos años, mi desarrollo y madurez no sólo en terreno científico sino también en lo personal.

Al resto de jefes del grupo, al **Dr. Andrés Piñeiro**, por hacer más amenos los labmeetings y enseñarnos que la ciencia no es tan sencilla como parece. Al **Dr. Alberto Anel**, por su carácter ambicioso, su valentía para embarcarse en novedosos e interesantes proyectos que sabe sacar adelante y sus relaciones internacionales. Gracias también al **Dr. Fermín Lampreave** y a las **Dras M<sup>a</sup> Ángeles Álava y María Iturralde** por el interés mostrado hacia mi trabajo. A las técnicas, **Pili** y a **Manolo**, por tener siempre disponible el material y reactivos para los experimentos y a la secretaria, **Marta Fajés**, por resolver todas mis dudas burocráticas y ser tan eficiente.

A mis compañeros del laboratorio, por ser los que han compartido conmigo esta aventura codo con codo. A **Patricia Pérez**, por sus consejos científicos y personales y su carácter abierto. A **Julián**, por ser mi modelo a seguir de cómo se hace ciencia, por sus bromas y su sarcasmo y por tener siempre unas palabras de ánimo. A **Marta**, por su compañía en las primeras y las últimas horas de la mañana, por su sinceridad, su sencillez y picardía y por estar siempre dispuesta a echar una mano. A **Rakel**, por su tesón en el trabajo y su carácter fuerte y luchador. A **Leo**, por enseñarme que aunque los resultados no acompañen, la última opción en ciencia es darse por vencido, por su ahínco con las bacterias y su buen humor. A **Alberto**, porque envidio sanamente su vocación científica, su carácter luchador y su valentía para emprender nuevos proyectos. A **Nacho**, porque en todos estos años jamás le he visto enfadado o malhumorado, por su continua sonrisa y por tener su hilo musical personal siempre ON. A **Clara**, por su buen carácter, su seguridad en sí misma y su personalidad. A **Nuría**, por ser amiga más que compañera, por no perder la sonrisa ante los contratiempos (véase inmuno-precipitaciones) , por los momentos en que he buscado su apoyo y su consejo y siempre lo he encontrado. Por todos los ratos y cotilleos que hemos compartido y los que compartiremos en la distancia. A **Patricia Balsas**, por soportar con paciencia mis enseñanzas y mis exigencias, por ser tan buena alumna y colaboradora, por tener siempre ánimos que darme y ser una gran apoyo. En tus manos quedan los proyectos de mieloma múltiple, espero que sean muchos y muy fructíferos. A **Idoia**, porque me alucina su multiactividad y que sea capaz de llegar a todo, por hacer más amenas mis comidas en la biblioteca, por sus dudas científicas y su buen humor. A **Patricia Galán**, por su constancia en el trabajo y la sonrisa que nunca borra de sus labios, por traer energía renovada al laboratorio. A **Adriana**, por hacerme reír con sus anécdotas y ser más natural que los danones. Al último fichaje **Luís**, porque su bagaje científico y su saber estar van a ser un gran impulso para el grupo. Gracias a todos por ser mi segunda familia.

También quiero agradecer a todos aquellos que pasaron por el laboratorio y que por una u otra razón no pudieron o no quisieron quedarse, pero cuya estancia corta o larga supuso un aporte a mi trabajo. A **Esther**, compañera de estudios de



Bioquímica, porque nos demostró lo que es trabajar duro sin perder la sonrisa y sin cobrar un duro. ¡Como me alegró que obtuvieras tu recompensa!. A **Loli**, por ser tan intrépida y marchar en busca de la beca perdida a diferentes puntos de España. A **José Miguel**, por su buen humor. A **Virginia**, por su carácter afable, sincero y su sentir riojano y a **Fiona**, por enseñarnos que el mito del inglés frío y serio no siempre se cumple.

A la gente del Hospital Clínico Universitario, a las chicas del laboratorio de inmunología, **Anabel**, **Merche**, **Gemma**, **Linda**..., al secretario **Javier**, por sus vaciles y sus chistes. A nuestras colaboradoras **M<sup>a</sup> José**, **Berta** y **María**, por su paciencia con mis visitas al citómetro, al nucleofector y al microscopio confocal y al **Dr. Luis Larrad** y la **Dra. Pilar Lasierra** por permitir dichas visitas. A la **Dra. Pilar Giraldo**, del Servicio de Hematología del Hospital Miguel Servet, por su colaboración en los estudios de pacientes de mieloma múltiple.

A la gente del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Al **Dr. Atanasio Pandiella**, por acogerme en su laboratorio y dejarme invadir su poyata, por escuchar mis dudas científicas y ofrecerme su apoyo. Gracias a todos sus chicos/as, a **Xonía**, por ser mi profe de Biología Molecular y un gran apoyo científico y personal, a **Ruth** y **Pedro**, por su paciencia con mis dudas y sacar siempre un ratito para ayudarme, a **Juan Carlos**, por enseñarme que existen western blot perfectos sin necesidad de adobe photoshop (aunque yo nunca los haya conseguido), a **Joana**, por su salero y su perseverancia con Erk5, a **Olga**, por ser ejemplo de mujer fuerte, decidida y valiente, a **Laura** y a **Azucena**, por aportar su experiencia al grupo y un poquito de seriedad a esta pandilla. A **Richard**, a **Quique** y a **Jesús**, por su buen humor y saber sacar de mí mi mejor sonrisa.

Estos años me han permitido compartir piso con mucha gente diferente, de cada uno de ellos he aprendido algo y creo que todos deben figurar aquí. A **Bea** e **Irene**, con vosotras aprendí lo que es con-vivir, para lo bueno y lo malo. Gracias por nuestras charlas científicas a horas vespertinas y vuestros ánimos. A mis compas de Salamanca, **Luana** y **Raquel**, por esa convivencia plurilingüe y pluricultural, por las cenas internacionales, las sesiones intensivas de gimnasio y las tardes de

domingo comiendo castañas asadas y bebiendo vino de Oporto. A **Jose Ramón**, riojano y bioquímico y a **Pablo**, por esa experiencia de convivencia con el sexo masculino. Finalmente, gracias a **Maribel** y **Ana Rosa**, mis actuales compañeras, por aguantar mi etapa de mayor tensión y haber sabido apoyarme y entenderme en todo momento.

También quiero agradecer a mis amigos/as y familiares el apoyo prestado durante estos años, que aunque no entendieran lo que hago o para que sirven mis estudios siempre me han animado. A mis amigos/as de Logroño, **Laura**, **Bea**, **Eva**, **Lidia** e **Isaac**, **Tolo**, **Edu..** y a los amigos de Toño (que quiero como míos) **Diego Barrio** y **Paloma**, **Diego Ruiz** y **Eva**, **Alejandro**, **Nuría**, **Eduardo** y **Olga**, **Víctor**....por su interés y apoyo y por permitirme desconectar del trabajo cada fin de semana. A mi hermana **Natalia** y a mi recién estrenado cuñado **Michel** por sus constantes ánimos, a mis abuelos, tíos y primos, especialmente gracias a mi tía **Pili**, por abrirme las puertas de su casa en Zaragoza siempre que lo he necesitado y por ser un ejemplo de mujer fuerte y luchadora a la que admiro.

Por último quiero dedicar esta Tesis a las tres personas que tengo más cerca de mi corazón. A **Toño**, el waterpolo te puso en mi vida un día de verano y ahora no puedo imaginarla sin tí. Gracias por tu paciencia, tu apoyo, tus ánimos, telefónicos o en persona, por hacerme reír y traer a mi vida aire fresco cada día, por todos los buenos momentos que hemos compartido y los que nos quedan por compartir. A mis padres, **Eduardo** y **María**, gracias por darme la vida, educarme, sacrificaros por mí en tantas ocasiones, apoyarme en mis estudios y en mi vocación y estar siempre al pie del cañón. Gracias por enseñarme lo que es dar el ciento por uno, por hacer de mí una persona que merezca la pena y por haber confiado y creído en mí y mi valía.

## Abreviaturas seleccionadas

**ABB**, tampón de unión de anexina (**A**nexing **B**inding **B**uffer)

**AIF**, factor inductor de apoptosis (**A**poptosis **I**nducing **F**actor)

**ANT**, Adenine Nucleotide Translocator

**Apo2L/TRAIL**, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (**T**NF-**R**elated **A**poptosis-**I**nducing **L**igand)

**BCIP** (bromo-4-cloro-indolil-fosfato de p-toluidina)

**Bcl-2**, **B**-**C**ell **L**eucemia/**L**ymphoma **2** gene

**BFB**, azul de bromofenol

**BH**, **B**cl-2 **H**omology

**BMS**, **B**ristol **M**yers **S**quibb

**BSA**, albúmina sérica bovina

**CARD**, dominio de reclutamiento de caspasas (**C**aspase **A**ctivation **R**ecruitment **D**omain)

**CHX**, cicloheximida

**COX I**, **C**itocromo **c** **o**xidasa subunidad **I**

**CrmA**, **C**ytokine **R**esponse **M**odifier **A**

**CTxB**, subunidad B de la toxina del cólera

**DCF**, 5-( $\gamma$ -6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato, acetil éster

**DD**, dominio mortal (**D**eath **D**omain)

**DED**, dominio efector de muerte (**D**eath **E**ffector **D**omain)

**DHE**, Dihidroetidio (Dihydroethidium)

**DiOC<sub>6</sub>(3)**, yoduro de 3,3'-dihexilosa carbocianina

**DISC**, **D**eath-**I**nducing **S**ignaling **C**omplex

**DMEM**, **D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium

**DMF**, dimetilformamida

**DMSO**, dimetilsulfóxido

$\Delta\Psi_m$ , potencial de membrana mitocondrial

**EDTA**, ácido exilen-diaminotetracético

**ERK**, quinasa regulada por señales extracelulares (**E**xtracellular signal-**R**egulated **K**inase)

**EtBr**, bromuro de etidio

**FITC**, isotiocianato de fluoresceína

**FLIP**, Caspase-8 Inhibitory Protein

**fmk**, fluorometilcetona

**FT**, farnesil-transferasa (**F**arnesyl-**T**ransferase)

**FTI**, inhibidor de farnesil-transferasa (**F**arnesyl-**T**ransferase Inhibitor)

**GFP**, proteína fluorescente verde (**G**reen **F**luorescent **P**rotein)

**GGTI**, geranilgeranil-transferasa I (**G**eranyl**G**eranyl-**T**ransferase I)

**GMSI**, gammapatía monoclonal de significado incierto

**GSH**, glutation

**HAT**, histona acetiltransferasa (**H**istone **A**cetyl**T**ransferase)

**HDAC**, histona deacetilasa (**H**istone **D**e**A**Cetylase)

**HDACi**, inhibidor de histona deacetilasa (**H**istone **D**e**A**Cetylase Inhibitor)

**HEPES**, ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N´-[2-etanosulfónico]

**IAP**, inhibidores de proteínas apoptóticas (**I**nhibitor of **A**poptosis **P**rotein)

**ICE**, enzima convertidora de interleukina-1-b (**I**L-1**b** **C**onverting **E**nzyme)

**IFN $\alpha$** , interferón alfa

**Ig**, inmunoglobulina

**IL-6**, interleukina-6

**IRES**, sitio de entrada interno ribosomal (**I**nternal **R**ibosome **E**ntry **S**ite)

**Jak1-i**, Inhibidor de la quinasa Jak1

**Jak**, kinasa Janus (**J**anus **K**inase)

**JNK**, quinasa nuclear que fosforila al factor de transcripción c-Jun (c-**J**un **N**-terminal Kinasa)

**LB**, Luria **B**ertani

**LY**, LY294002

**MAPK**, proteína quinasa activada por mitógenos (**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase)

**M $\beta$ CD**, metil-beta-ciclodextrina

**MDR**, multiresistencia a drogas (**M**ultiple **D**rug **R**esistance)

**MM**, mieloma múltiple (**M**ultiple **M**yeloma)

**MMs**, células mielomatosas

**MTT**, bromuro de dimetiltiazolil-difeniltetrazolio

**NBT**, nitroazul de tetrazolio

**NF $\kappa\beta$** , factor nuclear  $\kappa\beta$  (**N**uclear **F**actor- $\kappa\beta$  **L**igand)

**OPG**, osteoprotegerina

**PARP**, Poli(ADP-ribosa)Polimerasa

**PBMC**, células monocucleares de sangre periférica (**P**heripheral **B**lood **M**ononuclear Cells)

**PBS**, suero fisiológico pH 7,4

**Pc5**, ficoeritrina-cianina 5

**PCD**, muerte celular programada (**Programmed Cell Death**)

**PCR**, reacción en cadena de la polimerasa (**Polimerase Chain Reaction**)

**PCs**, células plasmáticas normales (**Plasmatic Cells**)

**PE**, ficoeritrina

**PFA**, paraformaldehido

**PI**, yoduro de propideo (**Propidium Iodide**)

**PI3K**, fosfatidilinositol-3-quinasa (**Phosphatidy Inositol 3-Kinase**)

**PM**, peso molecular

**PMSF**, fenil-metil sulfonilfluoruro (**Phenyl-Methyl SulphonylFluoride**)

**PPDA**, p-fenilendiamina (**P-PhenylenDiAmine**)

**PS**, fosfatidilserina (**PhosphatidylSerine**)

**PTP**, poro de transición de permeabilidad (**Permeability Transition Pore**)

**RabGGT**, geranylgeranyl-transferasa de Rab (**Rab GeranylGeranyl-Transferase**)

**RANK**, receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$  (**Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa\beta$** )

**Rapa**, rapamicina (Rapamycin)

**ROS**, especies reactivas de oxígeno (**Reactive Oxygen Species**)

**RPMI**, Roswell Park Memorial Institute Medium

**SDS**, dodecilsulfato sódico (**Sodium Dodecyl Sulphate**)

**SDS-PAGE**, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

**SFB**, suero fetal bovino

**siRNA**, small interfering RNAs

**SMAC/Diablo**, Second Mitochondrial Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI

**STAT**, transductor de señales y activador de transcripción (**Signal Transducer and Activator of Transcription**)

**t.a.**, temperatura ambiente

**TBE**, tampón Tris-Borato-EDTA

**TE**, tampón Tris-EDTA

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

**TGF- $\beta$** , factor de crecimiento y transformación de tipo  $\beta$  (**Transforming Growth Factor- $\beta$** )

**TNF**, factor de necrosis tumoral (**Tumoral Necrosis Factor**)

**TNF- $\alpha$** , factor de necrosis tumoral de tipo  $\alpha$  (**Tumor Necrosis Factor  $\alpha$** )

**VDAC**, Voltage Dependent Anion Channel

**VEGF**, factor de crecimiento vascular endotelial (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor)

**VPA**, ácido valproico

**W**, wortmanina (Wortmanin)

**Z**, benciloxicarbonil

**Z-DEVD-fmk**, benciloxicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona

**Z-VDVAD-fmk**, benciloxicarbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

**Z-IETD-fmk**, benciloxicarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-fluorometilcetona

**Z-LEHD-fmk**, benciloxicarbonil-Leu-Glu-His-Asp-fluorometilcetona

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

**Z-VEID-fmk**, benciloxicarbonil-Val-Glu-Ile-Asp-fluorometilcetona

<b>1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN.</b>	
2.1- MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS.	
2.1.1.- Introducción histórica.....	5
2.1.2.- Las caspasas.....	7
2.1.3.- Las proteínas de la superfamilia Bcl-2.....	10
2.1.4.- Ruta apoptótica mitocondrial (Vía intrínseca).....	12
2.1.4.1.- Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.....	13
2.1.4.2.- Salida de citocromo c y formación del apoptosoma.....	14
2.1.4.3.- Liberación de otros factores apoptogénicos mitocondriales.....	15
2.1.5.- Apoptosis mediada por receptores (Vía extrínseca).....	16
2.1.5.1.- Receptores de la familia del TNF y sus ligandos.....	16
2.1.5.2.- Proteínas adaptadoras de la vía extrínseca.....	17
2.1.5.3.- Transducción de la señal apoptótica y conexión con la ruta de apoptosis mitocondrial.....	17
2.1.6.- Otros tipos de muerte celular programada.....	19
2.2.- LA APOPTOSIS: DISEÑO DE UNA QUIMIOTERAPIA RACIONAL CONTRA EL CÁNCER.	
2.2.1- La tumorigénesis.....	21
2.2.2.-Mecanismos de evasión de la apoptosis en células tumorales.....	22
2.2.2.1.- Alteraciones en la vía intrínseca de apoptosis.....	22
2.2.2.2.- Inhibición de los procesos de muerte en etapas post-mitocondriales.....	23
2.2.2.3.- Evasión de la apoptosis inducida por receptores de muerte.....	23
2.2.2.4.- Otros mecanismos de resistencia.....	23
2.2.3.- La apoptosis y los efectos secundarios de la quimioterapia.....	24
2.3.- MIELOMA MÚLTIPLE (MM)	
2.3.1.- Definición, incidencia y epidemiología.....	25

2.3.2.- Oncología histórica del MM.....	26
2.3.3.- Biología del MM.....	28
2.3.3.1.- Estadios del mieloma.....	28
2.3.3.2.- Inmunofenotipo.....	29
2.3.3.3.- Alteraciones genéticas en el mieloma.....	31
2.3.3.4.- Microambiente medular en el mieloma.....	32
2.3.4.- Fisiopatología del MM.....	34
2.3.4.1.- Enfermedad ósea.....	36
2.3.4.2.- Anemia.....	36
2.3.4.3.- Insuficiencia renal.....	37
2.3.4.4.- Insuficiencia de otros órganos.....	37
2.3.5.- Diagnóstico y marcadores de pronóstico.....	38
2.3.6.- Terapia.....	40
2.3.6.1.- Quimioterapia.....	41
2.3.6.2.- Transplante.....	42
2.3.6.3.- Irradiación.....	43
2.3.6.4.- Terapia de mantenimiento.....	44
2.3.6.5.- Cuidados de soporte.....	44
2.3.6.6.- Manejo de la resistencia a drogas o enfermedad refractaria.....	45
2.3.7.- Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.....	46
2.3.7.1.- Talidomida.....	46
2.3.7.2.- Velcade™ (Bortezomib).....	47
2.3.7.3.- Fármacos inmunomoduladores (iMIDs™).....	47
2.3.7.4.- Genasense™.....	48
2.3.7.5.- Panzem™.....	48
2.3.7.6.- Trisenox™.....	49
2.3.7.7.- Aplidina™.....	49
2.3.7.8.- Inhibidores de histona deacetilasas (HDACi).....	50
2.3.7.9.- Zarnestra™.....	50
2.3.7.10.- Inmunoterapia.....	51
2.3.7.11.- Otras nuevas terapias.....	54

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1.- MATERIALES.**

3.1.1.- Productos para cultivos celulares.....	55
--	----



3.1.2.- Fármacos anti-tumorales.....	55
3.1.3.- Productos para estudios de citotoxicidad.....	56
3.1.4.- Productos para el análisis de proteínas.....	56
3.1.4.1.- Productos para la extracción de proteínas.....	56
3.1.4.2.- Productos para electroforesis de proteínas y transferencia a membranas.....	57
3.1.5.- Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos.....	58
3.1.5.1.- Anticuerpos y reactivos utilizados en inmuno- transferencia (Western blotting).....	58
3.1.5.2.- Anticuerpos y reactivos utilizados en citometría de flujo..	60
3.1.5.3.- Anticuerpos y reactivos utilizados en microscopía confocal de fluorescencia.....	61
3.1.6.- Productos para técnicas de biología molecular.....	62
3.1.6.1.- Productos para cultivos bacterianos.....	62
3.1.6.2.- Productos para el aislamiento y análisis de ADN e ingeniería genética.....	62
3.1.6.3.- Productos para la obtención de la construcción pLZR- IRES-GFP-mcl-1.....	62
3.1.7.- Reactivos usados en las infecciones retrovirales.....	63
3.1.8.- Reactivos usados en transfecciones con Nucleofector®.....	63
3.2.- MÉTODOS.	
3.2.1.- Cultivos celulares.....	64
3.2.1.1.- Líneas celulares establecidas.....	64
3.2.1.2.- Sublíneas celulares derivadas.....	64
3.2.1.3.- Medios de cultivo.....	64
3.2.1.4.- Mantenimiento de los cultivos celulares.....	65
3.2.1.5.- Congelación y descongelación de las líneas celulares.....	65
3.2.1.6.- Contaje y determinación de la viabilidad celular.....	66
3.2.1.7.- Medida de la proliferación celular.....	66
3.2.2.- Obtención y análisis de células obtenidas a partir de muestras de médula ósea y/o sangre.....	67
3.2.2.1.- Obtención de células plasmáticas a partir de aspirados de médula ósea.....	67
3.2.2.2.- Inmunofenotipado y marcaje de células plasmáticas.....	68
3.2.2.3.- Obtención de monocitos a partir de sangre periférica.....	69

3.2.3.- Análisis de proteínas.....	69
3.2.3.1.- Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes.....	69
3.2.3.2.- Fraccionamiento subcelular I: fracción citosólica y fracción membranosa.....	70
3.2.3.3.- Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	71
3.2.3.4.- Transferencia de proteínas a membranas.....	71
3.2.3.5.- Análisis de proteínas por inmunotransferencia (Western blotting) y detección de los inmunocomplejos.....	71
3.2.4.- Análisis de la fragmentación del ADN durante la apoptosis.....	73
3.2.4.1.- Tinción con PPDA.....	73
3.2.4.2.- Tinción con Hoechst 33342.....	74
3.2.5.- Inmunolocalización de proteínas por microscopía confocal de fluorescencia.....	74
3.2.6.- Citometría de flujo (FACS).....	76
3.2.6.1.- Análisis de la expresión de proteínas de membrana.....	77
3.2.6.2.- Análisis de proteínas intracelulares.....	77
3.2.6.3.- Determinación simultánea del potencial mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la translocación de fosfatidilserina.....	78
3.2.6.4.- Análisis de ciclo celular.....	79
3.2.6.5.- Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	80
3.2.7.- Técnicas de biología molecular.....	81
3.2.7.1.- Preparación de medios y cultivos bacterianos.....	81
3.2.7.2.- Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.....	82
3.2.7.3.- Técnicas de ingeniería genética.....	83
3.2.7.4.- Obtención de la construcción pLZR-IRES-GFP-mcl-1.....	84
3.2.8.- Infecciones retrovirales.....	87
3.2.8.1.- Generación de retrovirus.....	87
3.2.8.2.- Infección de células eucariotas con retrovirus.....	88
3.2.8.3.- Obtención de líneas estables mediante clonación por dilución límite.....	89
3.2.9.- Transfecciones con Nucleofector®.....	89

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR EL INHIBIDOR DE FARNESIL-TRANSFERASAS BMS-214662.	
4.1.1.- Introducción.....	91
4.1.2.- Efecto de BMS-214662 en la proliferación, viabilidad y morfología celular.....	94
4.1.3.- Efecto de BMS-214662 sobre la farnesilación de proteínas.....	94
4.1.4.- Implicación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	96
4.1.4.1.- Efecto de BMS-214662 sobre los niveles de expresión de las proteínas de la superfamilia Bcl-2.....	96
4.1.4.2.- Efecto de BMS-214662 en la conformación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak.....	98
4.1.5.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por BMS- 214662.....	99
4.1.5.1.- Análisis de la activación de caspasas.....	99
4.1.5.2.- Efecto de los inhibidores de caspasas.....	99
4.1.6.- Liberación de citocromo c mitocondrial inducida por BMS-214662 y su dependencia de la acción de las caspasas.....	103
4.1.7.- Traslocación nuclear de la proteína AIF inducida por BMS-214662.....	104
4.1.8.- Evaluación de la posible implicación de las MAP-quinasas p38 y JNK en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	105
4.1.9.- Evaluación de la implicación de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	106
4.1.10.- Evaluación de la implicación en la apoptosis de distintas dianas moleculares de BMS-214662.....	108
4.1.10.1.- Ras como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	108
4.1.10.2.- Rho B como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	109
4.1.10.3.- CENP-E y CENP-F como dianas candidatas en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	110
4.1.10.4.- RabGGT como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.....	112

4.1.11.- Discusión.....	113
4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES DE SENSIBILIDAD A APO2L/TRAIL.0 EN CÉLULAS DE MIELOMA. EFECTO POTENCIADOR DE VPA.	
4.2.1.- Introducción.....	119
4.2.2.- Efecto de Apo2L/TRAIL.0 en la proliferación y viabilidad celular.....	121
4.2.3.- Receptores de Apo2L/TRAIL en células de mieloma.....	123
4.2.3.1.- Expresión de DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en la membrana plasmática de las células de mieloma.....	123
4.2.3.2.- Contribución de DR4 y DR5 a la inducción de apoptosis.....	123
4.2.4.- Proteínas implicadas en la vía extrínseca de apoptosis.....	125
4.2.4.1.- Niveles de expresión de proteínas implicadas en la vía extrínseca.....	125
4.2.4.2.- Análisis de la activación de caspasas -8 y -3.....	126
4.2.5.- Evaluación de la implicación de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0.....	127
4.2.6.- Apo2L/TRAIL.0 y los inhibidores de histona deacetilasas (HDACi).....	128
4.2.6.1.- Efecto sensibilizador de VPA en la apoptosis inducida por TRAIL.0 en células de mieloma.....	128
4.2.6.2.- Efecto de VPA sobre la morfología y el ciclo celular en las células U266.....	129
4.2.6.3.- Efecto de VPA sobre las proteínas de la vía extrínseca de apoptosis en las células U266.....	129
4.2.6.4.- Efecto de los inhibidores de caspasas en la apoptosis inducida por el tratamiento combinado VPA y TRAIL.0.....	130
4.2.6.5.- Efecto del agente extractor de colesterol metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) en la apoptosis inducida por el tratamiento combinado VPA y TRAIL.0.....	132
4.2.7.- Sensibilidad a otros ligandos de muerte.....	133
4.2.8.- Discusión.....	135

4.3.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR INTERFERÓN ALFA E IMPLICACIÓN DE APO2L/TRAIL EN DICHO PROCESO.	
4.3.1.- Introducción.....	138
4.3.2.- Efecto del interferón alfa en la proliferación, viabilidad y morfología celular.....	140
4.3.3.- Análisis de la expresión en membrana del receptor de interferón alfa/beta en líneas de mieloma.....	142
4.3.4.- Implicación de especies reactivas de oxígeno en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	142
4.3.5.- Implicación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	143
4.3.5.1.- Efecto del interferón alfa sobre los niveles de expresión de las proteínas de la superfamilia Bcl-2.....	143
4.3.5.2.- Efecto del interferón alfa en la conformación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak.....	145
4.3.5.3.- Efecto del silenciamiento de PUMA y Bim en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	145
4.3.6.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	147
4.3.6.1.- Análisis de la activación de caspasas.....	147
4.3.6.2.- Efecto de los inhibidores de caspasas.....	147
4.3.7.- Liberación de citocromo c y translocación de AIF al núcleo inducida por interferón alfa.....	148
4.3.8.- Evaluación de la implicación de la vía Jak/STAT y de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	149
4.3.9.- Efecto combinado de Apo2L/TRAIL.0 e interferón alfa sobre células de mieloma.....	151
4.3.10.- Cambios en los niveles de Apo2L/TRAIL en células de mieloma tras el tratamiento con interferón alfa.....	152
4.3.11.- Efecto del anticuerpo bloqueante de TRAIL en la apoptosis inducida por interferón alfa.....	154
4.3.12.- Liberación al medio de Apo2L/TRAIL inducida por interferón alfa en monocitos de sangre periférica. Efecto de anticuerpos bloqueantes.....	154

4.3.13.- Sensibilidad comparada de las células de mieloma a interferón alfa y a Apo2L/TRAIL.0.....	156
4.3.14.- Discusión.....	158
<b>4.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE MCL-1 EN MIELOMA EN LA SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS.</b>	
4.4.1.- Introducción.....	162
4.4.2.- Análisis de la sobreexpresión de Mcl-1.....	163
4.4.3.- Efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 en la sensibilidad a la apoptosis.....	165
4.4.4.- Discusión.....	168
<b>4.5.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS MIELOMATOSAS EXTRAÍDAS DE PACIENTES DE MIELOMA.</b>	
4.5.1.- Introducción.....	170
4.5.2.- Inmunofenotipado de las células mielomatosas.....	170
4.5.3.- Análisis de sensibilidad a BMS-214662. Efecto umbral.....	172
4.5.4.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por BMS-2144662. Efecto Z-VAD-fmk.....	173
4.5.5.- Estudio comparativo del efecto de BMS-2146662 con el de otros agentes terapéuticos.....	175
4.5.6.- Análisis de sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 Correlación con la expresión de DRs en membrana.....	175
4.5.7.- Discusión.....	177
<b>5.- DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>179</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>183</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>187</b>

## **1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.**





El trabajo recogido en esta tesis pretende contribuir a una mejor caracterización de los mecanismos mediante los cuales, diferentes agentes terapéuticos (BMS-214662, Apo2L/TRAIL e Interferón- $\alpha$ ), inducen apoptosis en líneas celulares de mieloma múltiple. Es razonable pensar que la determinación de los parámetros que condicionan la sensibilidad a dichos agentes permitirá diseñar una quimioterapia más racional e individualizada.

Nuestro grupo de investigación comenzó sus estudios en el campo de la apoptosis en el año 1994. La apoptosis, o muerte celular programada, juega un papel decisivo en muchos procesos fisiológicos, desde el desarrollo fetal hasta el mantenimiento de la homeostasis celular en el adulto (Ellis et al., 1991). La apoptosis también está implicada en una amplia variedad de situaciones patológicas, entre las que se incluye el cáncer (Kerr et al., 1993). El mal funcionamiento de los mecanismos de muerte celular programada contribuye en gran medida a la transformación neoplásica y a la proliferación celular descontrolada. El empleo de sustancias capaces de restaurar, directa o indirectamente, el mecanismo apoptótico en esas células es el principio sobre el que se asienta la quimioterapia actual, haciendo de la apoptosis un elemento clave en la lucha contra el cáncer (Johnstone et al., 2002).

El interés de nuestro grupo de investigación por el estudio de la apoptosis en el mieloma múltiple se remonta al año 2003, coincidiendo con el inicio de esta tesis y tras la creación de la Red Nacional de Mieloma, de la cual nuestro grupo entró a formar parte. El mieloma múltiple (MM) como su propio nombre indica se trata de un “oma” o tumor, que afecta a la “myelo”, médula (Brian and Durie, 2006). Actualmente el mieloma continúa siendo una enfermedad incurable. La gran heterogeneidad en el grado de afectación entre pacientes, la diversidad en cuanto a respuesta a fármacos, la distinta evolución de la enfermedad y otros factores, obstaculizan la obtención de tratamientos eficaces (Gómez-Bougie et al., 2004). Por ello, se hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos, la caracterización de sus mecanismos apoptóticos y de sus parámetros condicionantes de sensibilidad para diseñar una terapia más efectiva, individualizada y racional.

Los objetivos que nos marcamos para cada uno de los apartados que se exponen en esta tesis fueron:

**1. Estudio del mecanismo de apoptosis inducida por el inhibidor de farnesil-transferasas BMS-214662.**

- Evaluar la capacidad de inhibición de la farnesilación de proteínas y la sensibilidad a BMS-214662 de diferentes líneas celulares de mieloma.
- Caracterizar el mecanismo de la fase de inducción de apoptosis causado por BMS-214662 y la implicación de la proteínas de la superfamilia Bcl-2 en dicho proceso.
- Caracterizar la fase de ejecución del mecanismo de apoptosis causado por BMS-214662 y su dependencia de la acción de las caspasas.
- Analizar la contribución de factores apoptogénicos mitocondriales (citocromo c, AIF...) en el proceso apoptótico.
- Evaluar la implicación de la MAP kinasas y de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por BMS-214662.
- Analizar la relación entre inhibición de la farnesilación y la inducción de apoptosis por BMS-214662. Búsqueda de dianas alternativas.

**2. Caracterización de los determinantes de sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 y búsqueda de agentes capaces de sensibilizar las células resistentes a este ligando.**

- Evaluar la sensibilidad de diferentes líneas de mieloma a Apo2L/TRAIL.0
- Determinar parámetros moleculares condicionantes de esta sensibilidad.
- Buscar agentes terapéuticos que puedan incrementar la sensibilidad o revertir la resistencia a Apo2L/TRAIL.0 y caracterizar de su mecanismo de acción.
- Evaluar la sensibilidad de estas mismas líneas celulares a anticuerpos citotóxicos anti-Fas.

### **3. Estudio del mecanismo de apoptosis inducido por el interferón alfa.**

- Evaluar la sensibilidad de diferentes líneas celulares de mieloma a interferón- $\alpha$  y su relación con la expresión del receptor de interferón.
- Caracterizar el mecanismo de la fase de inducción de apoptosis de interferón- $\alpha$  y la implicación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 en dicho proceso. Estudiar mediante silenciamiento génico la presunta implicación de algunas de estas proteínas.
- Caracterizar la fase de ejecución del mecanismo apoptótico de interferón- $\alpha$  y su dependencia de la acción de las caspasas.
- Analizar la contribución de factores apoptogénicos mitocondriales (citocromo c, AIF...) en el proceso apoptótico.
- Evaluar la implicación de la vía Jak/STAT y de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por interferón- $\alpha$ .
- Buscar sinergias entre interferón- $\alpha$  y otros agentes terapéuticos para el diseño de terapias combinadas más eficaces.
- Evaluar el posible papel de Apo2L/TRAIL como mediador de la apoptosis inducida por interferón- $\alpha$  en células de mieloma. Estudiar el posible efecto sinérgico entre ambos.

### **4. Estudio del efecto que la sobre-expresión de Mcl-1 en mieloma tiene en la apoptosis inducida por diferentes fármacos anti-tumorales.**

- Generar retrovirus que contengan en su genoma el gen mcl-1 y sean capaces de infectar células eucariotas.
- Obtener líneas celulares de mieloma que sobreexpresen de forma estable la proteína anti-apoptótica Mcl-1 mediante infección retroviral.
- Comparar las diferencias de sensibilidad a diferentes agentes anti-tumorales que induzcan apoptosis vía mitocondrial (BMS-214662, melfalán, Velcade e interferón- $\alpha$ ) o vía extrínseca (Apo2L/TRAIL) entre las células que sobreexpresan Mcl-1 y las de genotipo silvestre.

**5. Estudios de sensibilidad a la apoptosis de células plasmáticas mielomatosas extraídas de pacientes de mieloma múltiple.**

- Analizar la sensibilidad a BMS-214662 de células plasmáticas mielomatosas (MMs) y de linfocitos normales extraídos de pacientes de mieloma, y evaluar la implicación de las caspasas en la apoptosis inducida.
- Comparar la eficacia y selectividad del inhibidor de farnesil-transferasas BMS-2144662 con el de otros agentes anti-mieloma.
- Analizar la sensibilidad a Apo2L/TRAIL, en su forma recombinante Apo2L/TRAIL.0, de células plasmáticas mielomatosas (MMs) y de linfocitos normales extraídos pacientes de mieloma.

## **2.- INTRODUCCIÓN.**



## 2.1.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA O APOPTOSIS.

### 2.1.1.- Introducción histórica.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico fundamental por el que las células que han finalizado su función o no son necesarias para el organismo, se suicidan. La apoptosis está universalmente conservada en todos los eucariotas multicelulares y tiene lugar tanto durante el desarrollo, como a lo largo de la vida adulta (Ellis et al., 1991). Así, durante el desarrollo, la apoptosis ayuda a esculpir las distintas partes del cuerpo, o a eliminarlas una vez desempeñada su función, mientras que a lo largo de la vida adulta, el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis es necesario para la correcta homeostasis tisular (Ellis et al., 1991). El desajuste de la apoptosis al alza, está asociado con patologías graves, como las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), cardiovasculares (muerte celular tras isquemia) o infecciosas (SIDA). Por otro lado, un déficit de apoptosis se asocia con diversos tipos de leucemias y con el cáncer.

El término apoptosis fue utilizado por primera vez en 1972 (Kerr et al., 1972) para describir las peculiares características morfológicas de las células que morían espontáneamente durante el desarrollo. En concreto, los autores de ese trabajo hacían referencia a células que presentaban una condensación anormal de la cromatina y fragmentación nuclear, burbujas en la membrana plasmática (*blebbing*), y una disminución en el volumen celular respecto a las células normales. Posteriormente, se demostró que tanto las células normales como las patológicas activaban un programa de muerte celular intrínseco en ciertas circunstancias, y que la morfología descrita por Kerr y colaboradores correspondía a células que habían activado dicho programa. Pronto se averiguó que las células muertas mediante apoptosis eran rápidamente eliminadas por macrófagos titulares, por lo cual, el número de células apoptóticas detectables en un tejido en un momento dado, era siempre muy reducido aunque hubiesen muerto en gran cantidad. Además, al no producirse liberación al exterior del contenido celular, no se producía respuesta inflamatoria. Todo ello ha contribuido a que la apoptosis pasara desapercibida hasta hace pocos años.

Los primeros trabajos acerca de los procesos bioquímicos que tienen lugar durante la apoptosis comenzaron a publicarse entre 1980 y 1990. La primera característica bioquímica en describirse fue la fragmentación internucleosomal de la cromatina en fragmentos regulares de aproximadamente 180p de bases (Wyllie, 1980).

Este proceso de degradación del ADN, fue durante un tiempo, la característica principal para identificar la apoptosis. A principios de la década de los 90 se describió por primera vez la translocación de fosfatidilserina (PS) (Fadok et al., 1992). Durante la apoptosis, la PS normalmente localizada sólo en la cara interna de la membrana, se transloca a la superficie externa celular, convirtiendo a las células apoptóticas en apetitosas para los macrófagos, que las ingieren rápidamente.

Simultáneamente a estos estudios, se identificaron los genes que controlan la ejecución y la inducción de la apoptosis en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Ellis et al., 1991). Sydney Brenner visionó que este nemátodo sería un organismo idóneo para caracterizar genes de destino y muerte celular (Brenner, 1974), ya que durante el desarrollo de *C. elegans* se producen, mediante sucesivas divisiones celulares, un total de 1090 células, de las cuales 131 entran en apoptosis o “muerte celular programada”, dando como resultado un gusano adulto de 959 células. John Sulston descubrió que las 131 células que morían eran siempre las mismas (Sulston, 1976). Posteriormente, Robert Horvitz indujo mutaciones en *C. elegans* para caracterizar los genes que regulaban la muerte de esas 131 células somáticas (Ellis and Horvitz, 1986), genes que se denominaron ced-3, ced-4 y ced-9. Se estableció que ced-3 y ced-4 eran necesarios para la apoptosis, ya que la introducción de mutaciones en estos genes impedía la muerte celular, mientras que por el contrario, ced-9 era un gen “anti-apoptótico” que protegía a las células de una muerte incontrolada. Estos trabajos les valieron a sus autores, Sydney Brenner, John Sulston y H. Robert Horvitz el premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2002.

Hacia la mitad de la década de los 90 se descubrió que todos los mamíferos, incluido el hombre, poseían genes equivalentes a los que controlan la muerte celular en *C. Elegans*. A partir de aquí, el estudio de la apoptosis tomó un gran impulso, lo que ha permitido desde entonces avanzar enormemente en el conocimiento de sus mecanismos moleculares y celulares.



## 2.1.2.- Las caspasas.

La clonación y la caracterización de ced-3 en 1993 fue clave para un mejor conocimiento de la maquinaria apoptótica. Ced-3 codifica una proteína con similitud a la enzima convertidora de interleukina-1- $\beta$  (ICE) de mamíferos, una proteasa involucrada en procesos inflamatorios (Yuan et al., 1993). Sin embargo, al examinar la especificidad de sustratos de ced-3, observaron que esta guardaba una mayor similitud con CPP32 (Fernandes-Alnemri et al., 1994), otra nueva proteasa con homología a ICE clonada en 1995 (Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995). Esto convirtió a ICE (caspasa-1) en el primer miembro de una nueva familia de proteasas a las que se denominó caspasas y a CPP32 (caspasa-3) en el ejecutor apoptótico por excelencia en vertebrados (Martin et al., 1996).

La acepción **caspasa** procede de **cistein-proteasa** con especificidad de corte en **aspártico** y fue adoptada por convenio en 1996 (Alnemri et al., 1996). Hasta el momento, se han identificado 15 caspasas en mamíferos (Eckhart et al., 2005), no todas ellas presentes en células humanas. Las caspasas-11 y -12 se han identificado en ratón, la caspasa-13 en bovino, y la recientemente identificada caspasa-15, se ha caracterizado en cerdo, perro y bovino (Eckhart et al., 2005). Todas las caspasas presentan características comunes en cuanto a secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato (Earnshaw et al., 1999). De ellas, al menos 8 están implicadas en apoptosis (Siegel, 2006).

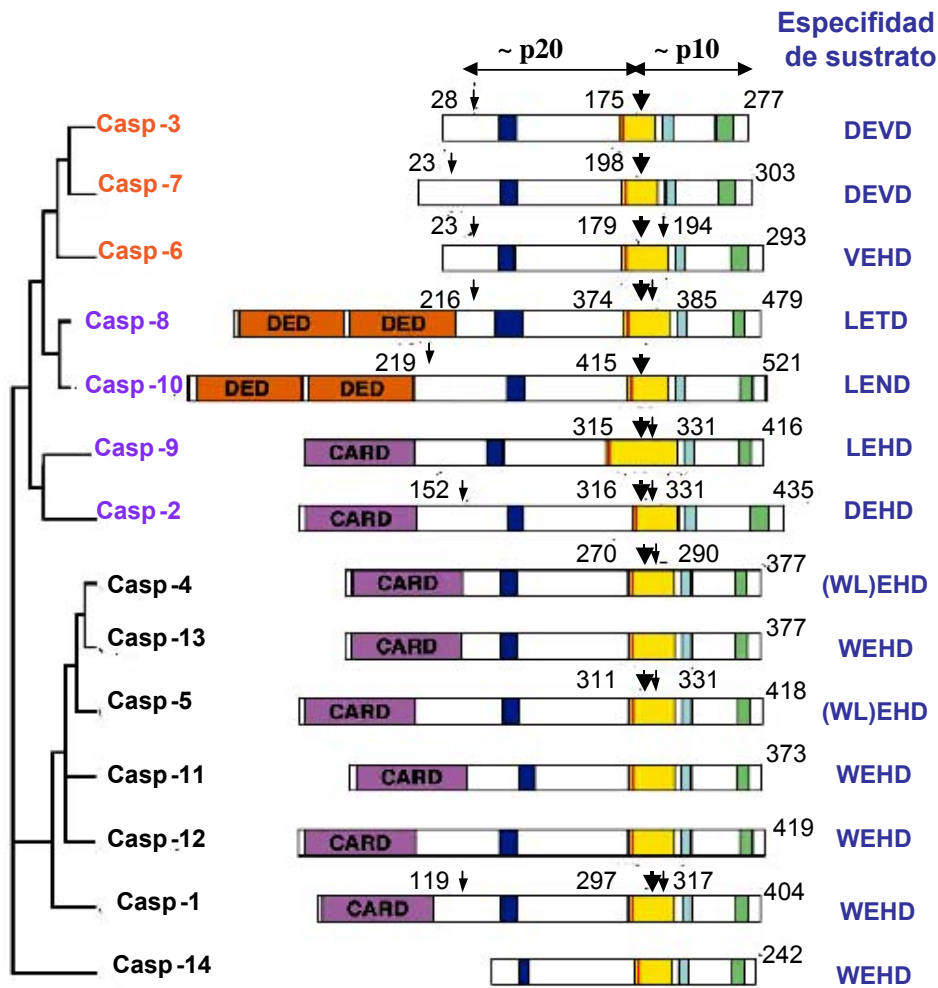
Las caspasas se pueden subdividir en:

- caspasas iniciadoras (caspasas -2,-8,-9 y -10). Presentan un pro-dominio CARD (*Caspase Activation Recruitment Domain*), como las caspasas -2 y -9, o pro-dominio DED (*Death Effector Domain*) como las caspasas -8 y -10, que les permite interactuar con dominios homólogos presentes en proteínas adaptadoras.
- caspasas ejecutoras (caspasas -3, -6 y -7). Son las que desmontan las estructuras celulares, dando lugar al fenotipo apoptótico. Necesitan ser procesadas por las caspasas iniciadoras para activarse.
- caspasas involucradas en procesos inflamatorios y de maduración de citoquinas (caspasas -1,-4,-5,-11,-13, -14 y -15).

Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas (zimógenos) y se activan de modo diferente según su función: Las caspasas ejecutoras, forman dímeros en condiciones basales, y su activación se produce por proteólisis. Se divide la cadena en las subunidades grande (20 kDa) y pequeña (10 kDa) y después, ambas subunidades se asocian generando el centro activo del enzima. Finalmente, la forma activa de la caspasa consta de dos heterodímeros (subunidad grande-subunidad pequeña) y contiene por tanto dos centros activos. En el caso de las caspasas iniciadoras, se ha demostrado que la proteólisis no es necesaria ni suficiente para su activación. En condiciones basales, los zimógenos son monómeros y es la dimerización quien determina su activación, independientemente de que se produzca o no proteólisis (Boatright and Salvesen, 2003). Por otro lado, y respecto a la localización de las caspasas, la mayoría se localizan en el citoplasma, pero algunas como la caspasa-2, se encuentra en el núcleo (Shikama et al., 2001) o la caspasa-4, se localiza en el retículo endoplasmático (Hitomi et al., 2004).

La actividad enzimática de las caspasas está regulada por diferentes proteínas. Por un lado, la familia de las **IAPs** (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Deveraux and Reed, 1999), que fueron por primera vez identificados en baculovirus por su habilidad para impedir la apoptosis de la célula hospedadora mediante la inhibición de la actividad enzimática de las caspasas. Se han identificado 8 IAPs en mamíferos entre los que se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y survivina. Por otro lado, la activación de caspasa-8 puede ser bloqueada por **c-FLIP** (*FLICE-like Inhibitory Protein*) (Irmmler et al., 1997). c-FLIP se presenta en dos formas: c-FLIP<sub>L</sub>, la más abundante y que es similar a la procaspasa-8, pero a la que le faltan residuos clave en el sitio catalítico y en otras regiones que contribuirían a la unión del sustrato y c-FLIP<sub>S</sub>, una forma más corta que contiene tan sólo los dos dominios efectores de muerte (DED). Además existen otros inhibidores fisiológicos de caspasas como son las proteínas **p35** y **CrmA**, ambos de origen viral (Hu et al., 1997). La p35 actúa mediante unión covalente a la cisteína del centro activo del enzima. CrmA (*Cytokine Response Modifier A*) es una serpina del virus de la viruela. Se trata de un inhibidor muy específico y eficaz de las caspasa-1 y -8, que actúa también por unión covalente.

Por último, y para estudiar la implicación de las caspasas en la apoptosis, se han desarrollado una serie de inhibidores peptídicos específicos que podrían tener aplicaciones terapéuticas (García-Calvo et al., 1998). Según el grupo a que se encuentren unidos estos inhibidores pueden ser reversibles (aldehídos) o irreversibles (fluorometilcetonas, clorometilcetonas). Todos ellos se han desarrollado a partir de la secuencia de corte presente en sustratos de las caspasas (García-Calvo et al., 1998).



**Figura 2.1.- Caspasas en mamíferos** (García-Calvo et al., 1998). Todas las caspasas mostradas en el diagrama son de origen humano exceptuando las caspasa-11 y -12 (murinas) y la caspasa-13 (bovina). Falta la caspasa-15, recientemente identificada. La relación filogenética (indicada a la izquierda) parece correlacionar con su participación en procesos inflamatorios (en negro) o de apoptosis. Las caspasas iniciadoras se muestran en morado y las efectoras en naranja. Se muestra el primer corte proteolítico (flecha gruesa) entre las subunidades grande y pequeña y otros sitios adicionales de corte (flechas finas). Los segmentos de colores indican las regiones que corresponden a los bucles que constituyen la cavidad catalítica. El residuo de Cys responsable de la catálisis se indica con una línea roja. DED: dominio efector de muerte (*Death Effector Domain*); CARD: dominio de reclutamiento de caspasas (*Caspase Activation Recruitment Domain*).

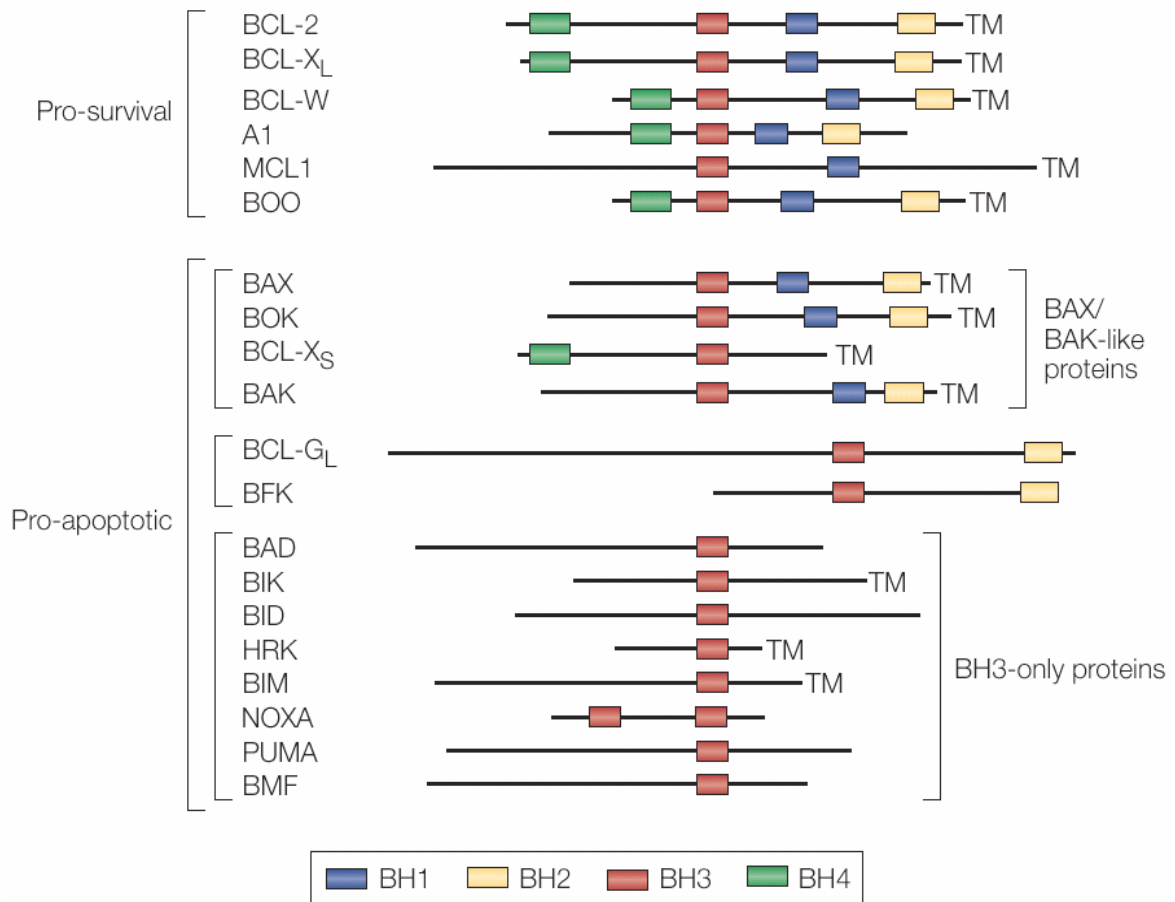
### 2.1.3.- Las proteínas de la superfamilia Bcl-2.

Bcl-2 (*B-Cell Leucemia/lymphoma 2 gene*) se identificó inicialmente como un proto-oncogén activado por la translocación cromosómica t(14;18)(q32;q21), que aparecía en el linfoma folicular de células B (Tsujiimoto et al., 1984). Posteriormente, se identificó como el homólogo en mamíferos de ced-9, inhibidor de la apoptosis en *C. elegans* (Hengartner and Horvitz, 1994). Desde entonces se han identificado y caracterizado numerosas proteínas homólogas a Bcl-2, que se han agrupado en la denominada “superfamilia Bcl-2”. Todas ellas poseen al menos uno de los cuatro dominios BH (*Bcl-2 Homology*) conservados y se subdividen en:

- proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub>, Mcl-1, Bcl-w, A1, Bfl-1, Bag-1). Presentan los cuatro dominios, BH<sub>1</sub>, BH<sub>2</sub>, BH<sub>3</sub> y BH<sub>4</sub>, excepto Mcl-1, que carece de dominio BH<sub>4</sub> (Strasser, 2005). Cuando se sobreexpresan, cada una de estas proteínas, protegen a las células contra una amplia variedad de estímulos apoptóticos. Así, las células hematopoyéticas y tejidos linfoides suelen expresar niveles elevados de Mcl-1, lo cual se considera un factor importante de supervivencia en células de leucemia (Iglesias-Serret et al., 2003) y de mieloma (Derenne et al., 2002).

- proteínas pro-apoptóticas multidominio (Bax, Bak, Mtd). Poseen los dominios BH<sub>1</sub>, BH<sub>2</sub> y BH<sub>3</sub>. Bax y Bak están presentes en la mayoría de los tejidos. En células viables, Bax es un monómero localizado preferentemente en el citosol, mientras que Bak se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial (Cory and Adams, 2002). Durante la apoptosis, ambas proteínas se asocian y forman canales en la membrana mitocondrial que permiten la salida de citocromo c del espacio intermembrana. La inactivación simultánea de los genes de Bax y Bak, pero no la de uno sólo de ellos, bloquea la apoptosis (Cory and Adams, 2002).

- proteínas pro-apoptóticas “sólo BH<sub>3</sub>” (Bim, Bad, Bid, Bik, Hrk, Puma, Noxa) Se caracterizan por poseer sólo el dominio BH<sub>3</sub>, de 9 aminoácidos, que es necesario y suficiente para inducir apoptosis. No pueden ejercer su acción apoptótica en ausencia de Bax y Bak, lo que sugiere que estas últimas son su diana principal. Se ha propuesto que las proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” actuarían como sensores del daño celular y su activación constituiría la primera etapa del daño mitocondrial. Dependiendo de las características moleculares peculiares de sus respectivos dominios BH<sub>3</sub>, estas proteínas podrían interactuar tanto con Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> (Bim y Puma) (Willis and Adams, 2005), inactivando su acción protectora, como con Bax y/o Bak (todas ellas), induciendo su oligomerización.



**Figura 2.2.- Características estructurales de los miembros de la familia de Bcl-2** BH<sub>1</sub>-BH<sub>4</sub>:dominios de homología con Bcl-2, TM: extremo hidrofóbico C-terminal. (Strasser, 2005).

Algunas de estas proteínas tienen una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal que permite su inserción en las membranas celulares. La eliminación de este dominio transmembrana conduce a la pérdida de la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 (Tanaka et al., 1993) o pro-apoptótica de Bax (Greenhalf et al., 1996), lo que sugiere que en el caso de estas proteínas, la localización en membrana es necesaria para su correcta función. También se han descrito otros mecanismos de regulación de la actividad anti- o pro-apoptótica de estas proteínas. Uno de ellos es la fosforilación, como en el caso de Bim, que es fosforilada por la quinasa ERK induciendo su degradación vía proteasoma (Ley et al., 2003; Seward et al., 2003). Otro mecanismo es la ubiquitinación de proteínas, como Mcl-1. La ubiquitinación favorece su degradación en el proteasoma, susceptibilizando las células a la apoptosis (Zhong et al., 2005; Nijhawan et al., 2003).

### 2.1.4.- Ruta apoptótica mitocondrial (Vía intrínseca).

En esta vía, la más conservada evolutivamente, la mitocondria desempeña un papel clave (Green and Reed, 1998; Susin et al., 1998). Distintos agentes físicos o químicos que causan daño celular como fármacos quimioterápicos, radiaciones ionizantes, neurotoxinas, estrés térmico u oxidativo, etc., tras alterar las vías de señalización particulares, producen la activación de proteínas de la superfamilia Bcl-2, con la subsiguiente permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales.

En esta vía, las proteínas de la superfamilia Bcl-2 desempeñan un papel preponderante frente a las caspasas. En general, parece que la inhibición de las caspasas sólo cambia el modo de muerte y su velocidad, pero no su extensión, una vez que la señal ha llegado a la mitocondria (McCarthy et al., 1997; Nicotera et al., 1999; Daugas et al., 2000). Podría decirse que la muerte celular está controlada a nivel mitocondrial, mientras que la forma final de la muerte está controlada por la activación de las caspasas (Nicotera et al., 1999).

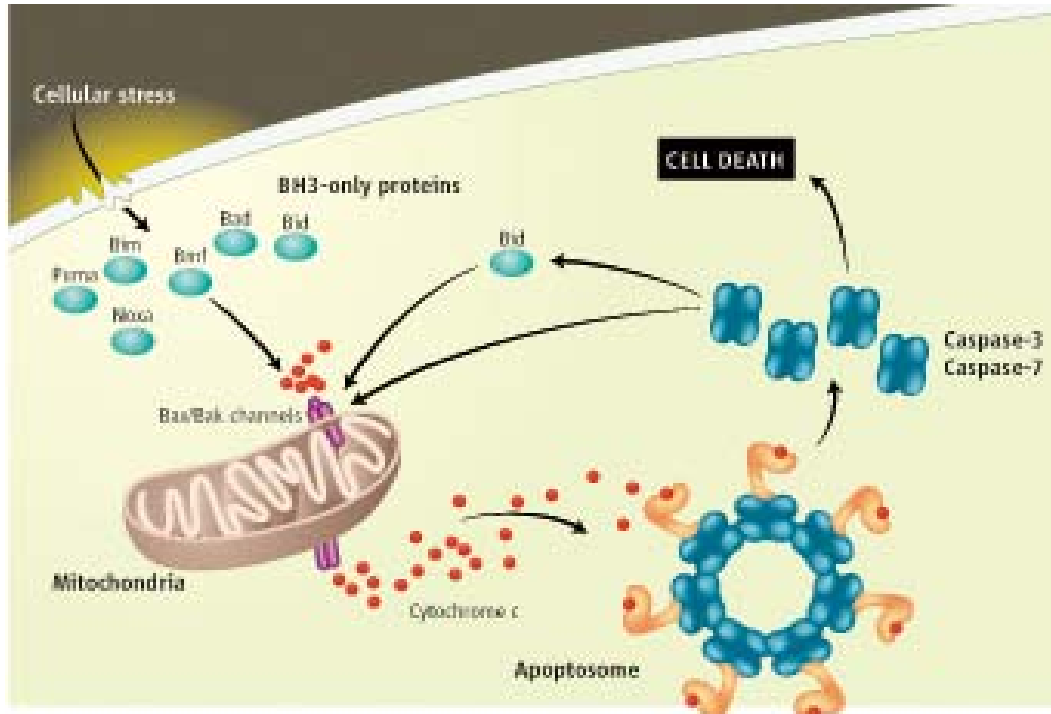


Figura 2.3.-Elementos implicados en la vía apoptótica mitocondrial (Adrain and Martin, 2006).

#### 2.1.4.1.- Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

La mitocondria está constituida por dos compartimentos: la matriz, rodeada por la membrana interna y el espacio intermembrana, delimitado por las membranas externa e interna. En condiciones fisiológicas la membrana interna se mantiene impermeable a iones, permitiendo el establecimiento de un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\Psi_m$ ) a ambos lados de ella, consecuencia del bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. Durante la apoptosis, se produce una reducción del  $\Delta\Psi_m$  y un aumento en la permeabilidad de la membrana externa. Esto último, permite la liberación de factores pro-apoptóticos confinados en el espacio intermembrana (citocromo c, AIF, Endo G, Smac/Diablo, HtrA2/OMI) y que una vez en el citosol, desencadenarán la ejecución de la apoptosis.

Se han descrito dos modelos para explicar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial:

- Formación de canales por proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Propone la formación de megacanales multiméricos por proteínas pro-apoptóticas tipo Bax (Bax, Bak) mediante su oligomerización en la membrana externa mitocondrial. Estas proteínas serían activadas por proteínas tipo “sólo BH<sub>3</sub>” (Bim o Bid) y sus canales permitirían la salida de factores apoptogénicos del espacio intermembrana al citosol, sin alterar las funciones mitocondriales. Este modelo explicaría las situaciones en que se produce liberación de factores apoptogénicos antes de la despolarización mitocondrial.
- Apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP). Propone la apertura de un poro de transición de permeabilidad integrado por VDAC (*Voltage Dependent Anion Channel*), ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*) y ciclofilina D, junto con otras proteínas, en los lugares de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa (Marzo et al., 1998b). Esta apertura del poro produciría la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  y la entrada de agua y solutos al espacio intermembrana. Se produciría un hinchamiento y la subsiguiente rotura de la membrana externa mitocondrial, conduciendo finalmente a la liberación de proteínas del espacio intermembrana al citosol. Si el estímulo es intenso, el proceso terminará en necrosis y si es un estímulo débil, en apoptosis.

Se ha descrito la participación de proteínas de la familia Bcl-2 en el control de la apertura del PTP (Marzo et al., 1998a; Shimizu et al., 1999). Este modelo explicaría aquellas situaciones en que la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  precede a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y a la activación de caspasas.

#### **2.1.4.2.- Salida de citocromo c y formación del apoptosoma.**

La salida de citocromo c de la mitocondria desencadena la ejecución de la apoptosis. Se ha propuesto que la liberación de citocromo c no es un fenómeno de “todo o nada”, en el que todas las mitocondrias de una misma célula liberarían todo su citocromo c de forma simultánea (Adrain and Martin, 2006). También se ha sugerido que algunas caspasas como la -3 y la -7, entre otras, podrían estar implicadas en un ciclo de retroalimentación, de modo que tras una discreta salida de citocromo c y una débil activación de caspasas, estas amplificarían la señal apoptótica proteolizando la proteína p75 del complejo I mitocondrial (Ricci et al., 2004), lo que provocaría la caída del  $\Delta\Psi_m$ , amplificándose la translocación de Bax/Bak y permitiéndose una segunda salida de citocromo c considerablemente mayor (Lakhani et al., 2006).

Una vez en el citoplasma, citocromo c se une al extremo c-terminal de la proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*), homóloga de la proteína ced-4 de *C. elegans* (Zou et al., 1999), dentro de una región que contiene 13 repeticiones WD-40. Este hecho facilita la unión de dATP a Apaf-1, quedando expuesta su región de oligomerización. La oligomerización parece producirse de modo simultáneo al reclutamiento de la pro-caspasa-9 (forma inactiva de la caspasa-9), dando lugar a un complejo heptamérico denominado apoptosoma. La activación de la caspasa-9 dentro del complejo se produce mediante cambio conformacional (Yin et al., 2006) y seguidamente, la caspasa-9 procesa a otras caspasas como la -3 y la -7 (Li et al., 1997) conduciendo a una rápida amplificación de la cascada a través de la activación de otras caspasas (-6, -2, -8 y -10). Se ha descrito que una cierta cantidad de caspasa-9 permanece unida al apoptosoma (Srinivasula et al., 2001), lo que sugeriría que Apaf-1 continuaría regulando su actividad después del momento inicial de la activación y que ambas moléculas funcionarían como subunidades de un holoenzima.



#### 2.1.4.3.- Liberación de otros factores apoptogénicos mitocondriales.

- **AIF** (*Apoptosis Inducing Factor*), es una proteína que reside en el espacio intermembrana mitocondrial y posee alta homología con las oxidorreductasas bacterianas (Susin et al., 1999). Durante la apoptosis, AIF es liberado al citoplasma y se transloca al núcleo, donde ejerce su acción apoptótica. AIF induce condensación periférica de la cromatina y rotura del ADN en fragmentos no oligonucleosomales de alto peso molecular (Susin et al., 2000). Su acción es independiente de la activación de las caspasas. Se ha descrito que la proteína de choque térmico Hsp-70 es un antagonista de AIF (Ravagnan et al., 2001) que previene la condensación periférica de la cromatina inducida por AIF en núcleos aislados.
- **Endo G** (*Endonuclease G*), también se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (Lily et al., 2001). Inicialmente se identificó como una proteína implicada en la reparación del ADN mitocondrial (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993), pero posteriormente se demostró que era liberada de la mitocondria durante la apoptosis inducida por TNF, radiación UV o ligación de Fas, y que se translocaba al núcleo, induciendo fragmentación del ADN (Lily et al., 2001; Parrish et al., 2001). Al igual que en el caso de AIF, la acción de Endo G no depende de la activación de las caspasas (Lily et al., 2001).
- **Smac** (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*) (Du et al., 2000), también denominado **Diablo** (*Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) (Verhagen et al., 2000), es otra de las proteínas pro-apoptóticas presentes en el espacio intermembrana mitocondrial que es liberada cuando se desencadena el proceso apoptótico. Una vez en el citoplasma Smac/Diablo interacciona con los inhibidores de caspasas tipo IAP, impidiendo que estos inhiban a las caspasas (tanto iniciadoras como ejecutoras) (Chai et al., 2000).
- **HtrA2/OMI** (*High-temperature requirement protein A2*), al igual que Smac/Diablo, esta proteína pro-apoptótica del espacio intermembrana mitocondrial se une a los inhibidores tipo IAP, promocionando la activación de las caspasas (Verhagen et al., 2002). Sin embargo, mientras que Smac/Diablo se une preferentemente al dominio BIR3 de XIAP, HtrA2/OMI presenta más afinidad por el dominio BIR2 (Saelens et al., 2004).

### 2.1.5.- Apoptosis mediada por receptores (Vía extrínseca).

En esta vía la apoptosis se induce tras la unión de una proteína extracelular (mensajero mortal) a su receptor (receptor mortal).

#### 2.1.5.1.- Receptores de la familia del TNF y sus ligandos.

Los receptores mortales pertenecen a la familia del receptor del TNF (*Tumoral Necrosis Factor*). Estos receptores pueden transmitir diferentes señales, de proliferación, de diferenciación, de muerte, etc., según el tipo celular en que se expresen (Ashkenazi and Dixit, 1998; Wallach et al., 1998). Así, hay receptores como Fas, DR4 y DR5, cuya principal función es inducir apoptosis, y otros como TNFR y DR3 implicados en la regulación de respuestas inflamatorias y en la activación de células del sistema inmunitario.

Estos receptores presentan varias similitudes entre sí: son proteínas de membrana tipo I, contienen entre una y cinco repeticiones de secuencias ricas en cisteína en su región extracelular y un dominio mortal (DD) en sus regiones citoplasmáticas (Tartaglia et al., 1993). Todos ellos son activados por un grupo de ligandos estructuralmente similares que pertenecen a la familia del TNF. Entre los receptores más conocidos se encuentran:

- **Receptor del TNF (TNFR).** Se trata del receptor de tipo 1, también llamado p55 o CD120a. Su ligando es el factor de necrosis tumoral (TNF), un mediador de respuestas inflamatorias e inmunorreguladoras, con actividad anti-viral y citotóxica, pero que también puede estimular el crecimiento y diferenciación celular al actuar sobre otros receptores (Vassalli, 1992).
- **Fas/CD95/APO1.** Es el receptor del ligando de Fas (FasL/CD95L). En la superficie celular se encuentra en forma de trímeros pre-formados que se entrecruzan tras la unión de su ligando natural o de anticuerpos agonistas, induciendo muerte por apoptosis (Nagata and Golstein, 1995). Esta inducción de muerte depende de la multimerización adicional de los trímeros de Fas (Siegel et al., 2000).
- **Receptores de Apo2L/TRAIL.** Apo2L/TRAIL es otro miembro de la familia del TNF que induce apoptosis independientemente de Fas. Se han identificado cinco receptores para Apo2L/TRAIL: DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) y OPG. De ellos, sólo los dos

primeros inducen apoptosis. DcR1 y DcR2 se conocen como “receptores señuelo”, poseen una estructura extracelular similar a la de los receptores mortales, pero en su parte citoplasmática carecen de dominio mortal (DcR1) o lo tienen mutado (DcR2), por lo que no pueden enviar señales de muerte al interior celular (Ashkenazi and Dixit, 1998). El tercer “receptor señuelo” es la osteoprotegerina (OPG), un receptor soluble que actúa como antagonista de TRAIL (Emery et al., 1998).

- **DR3.** Es el receptor de la proteína TL1A (Ruben and Wei, 2002). Su activación no induce apoptosis, sino que proporciona señales de coestimulación para los linfocitos T (Migone et al., 2002).

#### **. 2.1.5.2.- Proteínas adaptadoras de la vía extrínseca.**

Las proteínas adaptadoras implicadas en la vía extrínseca realizan la función conectora entre los reguladores de la muerte celular (receptores mortales) y los efectores (caspasas). Estas asociaciones son mediadas por interacciones entre dominios conocidos como dominios mortales (DD) (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Entre las proteínas adaptadoras destacan:

- **TRADD** (*TNF Receptor Associated Death Domain*), interacciona de modo específico con el receptor del TNF de tipo I (p55) (Hsu et al., 1995). Contiene un extremo amino-terminal de función desconocida y un extremo carboxilo terminal donde reside el dominio mortal (DD).
- **FADD** (*Fas Associated Death Domain*), interacciona específicamente con Fas (Chinnaiyan et al., 1995) y con TRADD (Hsu et al., 1996). Se asocia al dominio mortal de Fas y TRADD a través de su propio dominio DD, y también posee un dominio DED por medio del cual interacciona con la pro-caspasa-8. Esta última, una vez activada por dimerización, se libera al citoplasma, donde activa a otras caspasas como la -3 y la -7.

#### **2.1.5.3.- Transducción de la señal apoptótica y conexión con la ruta de apoptosis mitocondrial.**

La vía iniciada por el ligando de Fas es la mejor caracterizada. Dependiendo del tipo de células en que se induzca, conectará o no con la vía de apoptosis mitocondrial (Peter and Krammer, 1998).

El ligando natural de Fas, FasL/CD95L, es una proteína de membrana de tipo II que se expresa en la membrana plasmática de la célula efectora (Anel et al., 1996), o en microvesículas liberadas por lisosomas secretores (Monleón et al., 2001). Tras la ligación de FasL, se induce la multimerización de Fas y la unión de un conjunto de proteínas, FADD y caspasa-8, a su dominio citoplasmático, constituyéndose así el complejo denominado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (Peter and Krammer, 1998). FADD se une a través de su dominio DD al dominio DD de Fas, y la procaspasa-8 se une a través de su propio dominio DED al dominio DED de FADD. La agregación de dos o más moléculas de procaspasa-8 conduce a su activación por dimerización y la liberación de caspasa-8 activa al citoplasma (Medema et al., 1997).

La caspasa-8 activa puede iniciar diferentes vías de señalización de apoptosis dependiendo del tipo celular (I o II) (Scaffidi et al., 1998). Así, en células de tipo I, con cantidades elevadas de caspasa-8 activa, la cascada de caspasas es iniciada directamente por la caspasa-8, proteolizando y activando caspasas ejecutoras como la caspasa-3 (Scaffidi et al., 1998). Esta vía no implica a la mitocondria y no es bloqueada por Bcl-2, pero sí por inhibidores de caspasas. En células de tipo II, sin embargo, con cantidades pequeñas de caspasa-8 activa, la caspasa-8 proteoliza a Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, generando un fragmento c-terminal (tBid), que se transloca a la mitocondria, induciendo oligomerización de Bax/Bak y la liberación de citocromo c (Gross et al., 1999). Esto conduce a la iniciación de la ruta apoptótica mitocondrial, haciendo que en este caso, la apoptosis pueda sea bloqueada tanto por inhibidores de caspasas como por Bcl-2 (Scaffidi et al., 1998).

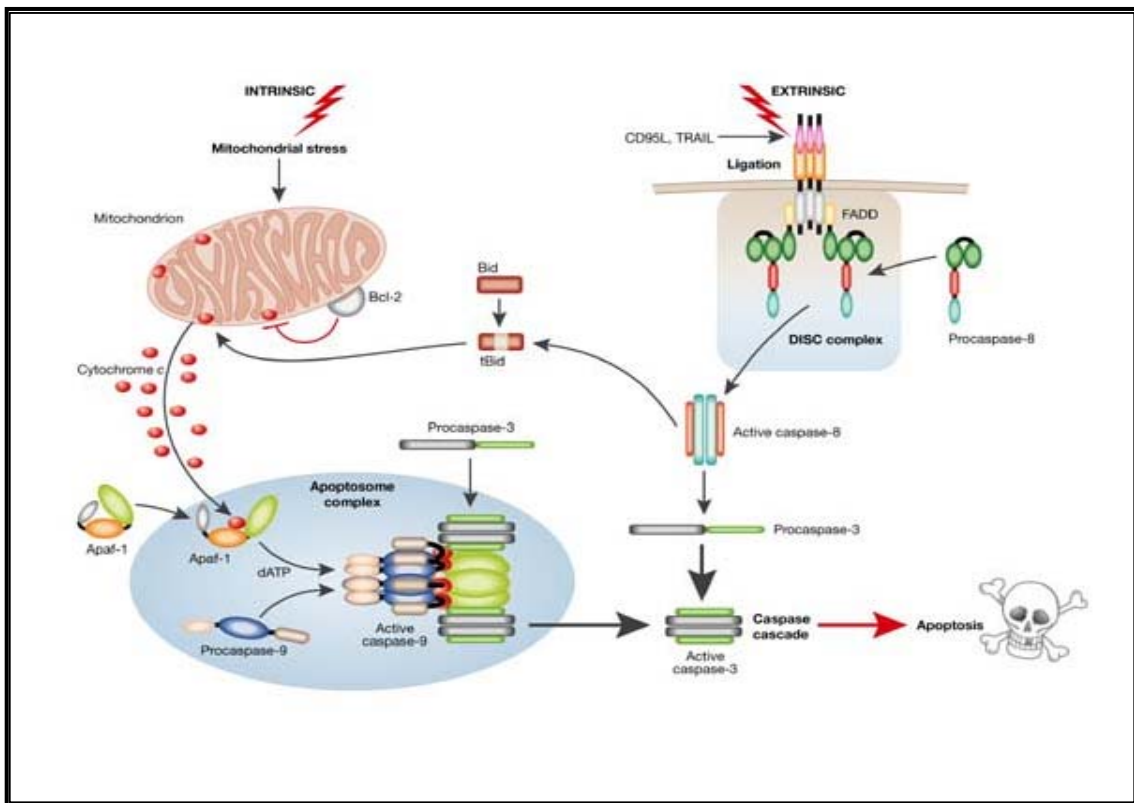


Figura 2.4.- Vía apoptótica extrínseca y su conexión con la vía apoptótica mitocondrial (MacFarlane and Williams, 2004).

### 2.1.6.- Otros tipos de muerte celular programada.

Tradicionalmente, los diferentes patrones de muerte celular se han englobado en dos grandes grupos: **apoptosis**, controlada genéticamente y ejecutada por caspasas, y **necrosis**, muerte accidental, sin control genético y sin participación de caspasas. Sin embargo, cada vez se tienen mas evidencias de que algunos de los patrones de muerte celular en los que no están implicadas las caspasas, también están controlados genéticamente, haciéndose necesario otro sistema de clasificación.

Entre los modelos alternativos de muerte celular programada se incluyen: la autofagia, la paraptosis y la catastrofe mitótica. Así como la mitocondria desempeña un papel clave en el proceso apoptótico, otros orgánulos como los lisosomas y el retículo endoplasmático, son los que regulan la ejecución de estos modelos alternativos (Bröker et al., 2005).

- La **autofagia**, es un proceso caracterizado por la formación de vesículas de doble membrana en el citoplasma celular que contienen en su interior orgánulos completos o fracciones de citosol, y que se denominan vacuolas autofágicas. Esta vacualización puede iniciarse como respuesta a: la privación de nutrientes, condiciones de estrés, infecciones bacterianas, orgánulos dañados o la necesidad de renovarlos, proteínas mal plegadas o agregadas, etc. Al igual que la apoptosis, la autofagia es esencial para el mantenimiento de la homeostasis en organismos pluricelulares, y por ello, se trata de un proceso muy regulado genéticamente (Kelekar, 2006).
- La **paraptosis** ha sido caracterizada recientemente. Se inicia con un hinchamiento de las mitocondrias y el retículo endoplasmico (RE), que finalmente conducen a vacuolización citoplasmática (Bröker et al., 2005).
- La **catástrofe mitótica** se desencadena cuando se detectan fallos en alguno de los puntos de control de la división celular. Tiene por objeto evitar que surgan células aneuploides o poliploides. Puede ser desencadenada por agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos o por daños en el ADN (Bröker et al., 2005). Células tumorales con p53 mutado, también pueden experimentar catástrofe mitótica tras el tratamiento con agentes genotóxicos (Erenpreisa et al., 2005).

Otros tipos de muerte celular menos conocidos son: la excitotoxicidad, la cornificación, la degeneración Walleriana y la mitoptosis.

## **2.2.-LA APOPTOSIS: DISEÑO DE UNA QUIMIOTERAPIA RACIONAL CONTRA EL CÁNCER.**

Los defectos en la apoptosis pueden favorecer tanto la tumorigénesis como la multirresistencia a drogas. Comprender los eventos moleculares que ayudan a los tumores a evadir la muerte apoptótica, proporciona un nuevo paradigma para diseñar una quimioterapia más racional (Johnstone et al., 2002).

### **2.2.1.- La tumorigénesis.**

La tumorigénesis es un proceso en varias etapas que comienza con la aparición de mutaciones en genes clave, genes reguladores del crecimiento y de la proliferación celular. Estas mutaciones proporcionan a la célula la capacidad de crecer sin control, aún en ausencia de señales estimuladoras del crecimiento. Con esas primeras mutaciones y el crecimiento descontrolado, se van adquiriendo cada vez más daños en el material genético. Finalmente, la célula adquiere la capacidad de replicarse indefinidamente, de resistir la hipoxia y la falta de nutrientes, de crecer en condiciones de adhesión celular alterada o en ausencia de adhesión, de invadir otros tejidos (adyacentes o lejanos) y metastatizar y de evitar o vencer los ataques del sistema inmunitario. Todo esto es posible gracias a que en este proceso también se adquiere la capacidad de evadir la apoptosis (Hanagan and Weinberg, 2000).

Cada uno de los obstáculos a que se enfrentan las células tumorales favorece la selección de las células que presentan alteraciones en el proceso apoptótico sobre las células que no las tienen. Por ello, para cuando un tumor metastatiza, no es sorprendente que sea muy resistente a las señales inductoras de muerte, tanto fisiológicas como farmacológicas, explicándose así porque los tumores metastáticos son extraordinariamente quimiorresistentes (Fidler, 1999).

## 2.2.2.- Mecanismos de evasión de la apoptosis en células tumorales.

### 2.2.2.1.- Alteraciones en la vía intrínseca de apoptosis.

La alteración de la vía intrínseca de apoptosis es extremadamente común en las células cancerosas.

El gen supresor de tumores **p53**, es el más frecuentemente mutado en tumores humanos, y la pérdida de su función puede tanto dismantelar el proceso apoptótico, como acelerar el desarrollo de tumores en ratones transgénicos (Attardi and Jacks, 1999). A veces, las mutaciones se producen en efectores por debajo de p53 o en genes reguladores de su función (ATM, Chk2, Mdm2 y p19ARF), haciendo que la presencia de un p53 silvestre no tenga porqué corresponderse con una vía p53 intacta y funcional (Schmitt et al., 1999). En general, las mutaciones, ya sean en p53 o en su vía de transducción, conducen a multirresistencia a drogas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Aún así, el estatus de p53 no es un buen factor pronóstico de la respuesta al tratamiento, ya que no todas las drogas requieren de p53 para inducir apoptosis (Wallace-Brodeur and Lowe, 1999).

Los genes que codifican las proteínas de la **familia Bcl-2** también aparecen mutados a menudo. Bcl-2 aunque identificado inicialmente por su sobreexpresión en el linfoma folicular debida a la translocación t(14;18), aparece sobreexpresado en una gran variedad de cánceres (Reed, 1999). Esta sobreexpresión de Bcl-2 puede acelerar la tumorigénesis en ratones transgénicos (Adams et al., 1999) y está asociada con multirresistencia a drogas en cánceres humanos (Reed, 1999). Bcl-x<sub>L</sub> también se sobreexpresa en muchos casos de carcinoma de mama y se ha demostrado que confiere resistencia a la muerte celular inducida por drogas (Liu et al., 1999). Por otro lado, en el mieloma múltiple (MM) es muy frecuente la sobreexpresión de Mcl-1, amenudo inducida por la IL-6, citoquina clave en el desarrollo de esta neoplasia. Estudios *in vitro* con células de pacientes de mieloma han demostrado que esta sobreexpresión de Mcl-1 correlaciona con peor respuesta a drogas quimioterápicas e *in vivo*, que los pacientes que presentan sobreexpresión de Mcl-1 en sus células tumorales presentan más recaídas y una menor supervivencia libre de eventos (Wuillème-Toumi et al., 2005).



#### **2.2.2.2.- Inhibición de los procesos de muerte en etapas post-mitocondriales.**

Aunque menos frecuentes, también se han descrito alteraciones del mecanismo apoptótico por debajo de la mitocondria. Así, el silenciamiento del gen de **Apaf-1** se presenta a menudo en el melanoma metastático (Soengas et al., 2001). Estas células de melanoma, aunque activan eficientemente p53 en respuesta a los agentes quimioterápicos, son incapaces de activar la caspasa-9 y desencadenar la subsiguiente respuesta apoptótica.

La sobreexpresión de los inhibidores de la apoptosis (**IAPs**) y de proteínas de choque térmico (**Hsp**), capaces de inhibir la activación de la caspasa-9, también se presentan frecuentemente en tumores humanos (Deveraux and Reed, 1999; Beere and Green, 2001). Por otro lado, estudios en fibroblastos y timocitos embrionarios de ratón deficientes en las caspasas -3 y -7 han demostrado que estas carencias también proporcionan una protección sustancial frente a diferentes estímulos apoptóticos (Lakhani et al., 2006).

#### **2.2.2.3.- Evasión de la apoptosis inducida por receptores de muerte.**

Estas alteraciones son menos frecuentes que las que afectan a la vía intrínseca. Se trata principalmente de mutaciones en Fas (**CD95**) o en los receptores de Apo2L/TRAIL (**DR4** y **DR5**). La inactivación de esta vía apoptótica en las células es interesante, permitiéndoles escapar de las respuestas inmunológicas y favoreciendo la progresión tumoral y las metástasis (Rosen et al., 2000; Takeda et al., 2001).

#### **2.2.2.4.- Otros mecanismos de resistencia.**

En algunos casos el propio estímulo que induce apoptosis también inicia un programa anti-apoptótico antagonista. Así, la unión del TNF a su receptor puede simultáneamente inducir apoptosis e incrementar los niveles del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que controla procesos de supervivencia y diferenciación celular (Baldwin, 2001). De este modo, la capacidad de inducir muerte celular por el ligando dependerá de la eficiencia relativa de ambos tipos de señales. Estos mecanismos permiten que las decisiones celulares de vivir o morir estén muy reguladas.

La **glicoproteína P**, también denominada proteína de multirresistencia a drogas (MDR) por su capacidad para expulsar de la célula las drogas quimioterapéuticas mediante eflujo generando quimiorresistencias, es capaz de proteger a las células de la apoptosis inducida por la vía de receptores de muerte, la irradiación UV y la privación de nutrientes (Johnstone, 2000).

Altos niveles de anti-oxidantes también pueden reducir considerablemente los efectos apoptóticos de las drogas (Volm, 1998).

### **2.2.3- La apoptosis y los efectos secundarios de la quimioterapia.**

Los efectos secundarios de la quimioterapia son el principal problema subyacente del tratamiento de tumores. Aunque los fármacos quimioterápicos están diseñados para atacar principalmente a las células tumorales, las células hematopoyéticas y las células del epitelio intestinal normales, junto con los queratinocitos del cabello, son siempre susceptibles a los efectos tóxicos de estos agentes (Komarova and Gudkov, 2000). Parece que esta toxicidad es debida en parte a la apoptosis inducida por p53. Por un lado, p53 potencia la acción de gran parte de las drogas, pero está funcionalmente inactivo en muchos tumores. Por otro, la vía de p53 intacta en las células normales contribuye a su propia destrucción. Teóricamente, sólo podríamos reducir estos daños colaterales inhibiendo la actividad de p53. De este modo, permitiríamos la supervivencia de las células normales sin afectar a las células tumorales con p53 mutado. Sin embargo, combinar un agente genotóxico con un inhibidor de la apoptosis conlleva el riesgo de promover procesos tumorigénicos y la aparición de segundos tumores años más tarde. Aunque en estudios preliminares con animales no se ha observado incremento en la incidencia de tumores tras el empleo de estos inhibidores, estas estrategias requieren ser consideradas y evaluadas con mayor detalle antes de ser puestas en práctica (Johnstone et al., 2002).

## 2.3.- MIELOMA MÚLTIPLE (MM).

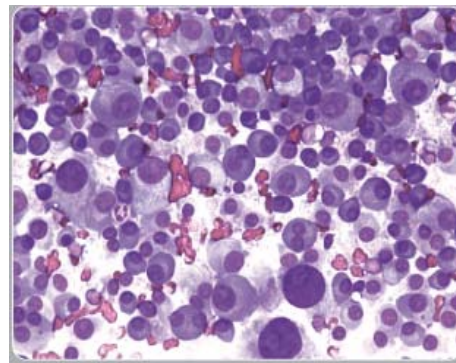
### 2.3.1.- Definición, incidencia y epidemiología.

El mieloma múltiple (MM) es un desorden maligno en el que células plasmáticas diferenciadas, con alteraciones génicas y generalmente derivadas de un sólo clon inicial, comienzan a proliferar de modo descontrolado y se acumulan en diferentes puntos de la médula ósea (Sirohi and Powles, 2004). Las células plasmáticas malignas, también llamadas mielomatosas o células de mieloma, constituyen tumores localizados en la médula ósea, los plasmocitomas. Estos plasmocitomas, pueden ser únicos o más frecuentemente múltiples (de ahí el nombre de mieloma múltiple). Además de a la médula ósea, también pueden afectar al hueso, o incluso desarrollarse fuera de él, pasando a la sangre y dando lugar a una leucemia de células plasmáticas (Brian and Durie, 2006). La característica típica de la célula mielomatosa es la producción y secreción a la sangre y/o orina de una proteína monoclonal, denominada proteína M, para-proteína o proteína en pico. Se trata de un componente o fragmento  $F_{ab}$  de una inmunoglobulina con una secuencia peptídica y estructura proteica anormal.

Todavía no se conoce la etiología del MM, pero se cree que entre los factores de riesgo se debería incluir: estimulación inmune crónica u otros desórdenes autoinmunes, exposiciones prolongadas a radiaciones ionizantes, pesticidas, herbicidas y dioxinas (Schwartz et al., 1997; Bertazzi et al., 1999).

El mieloma representa aproximadamente el 1% de todos los cánceres, siendo su incidencia en EEUU de 4/100.000 habitantes/año en población general. Su incidencia está a la vez condicionada por la edad, la raza y el género. La edad media del diagnóstico es de 68 años, es más común en población negra que en población caucásica y más frecuente en hombres que en mujeres (Sihori and Powles, 2004). En las últimas décadas se ha producido un aumento en el número de casos de mieloma, que puede explicarse en parte por las mejores técnicas diagnósticas y el aumento del promedio de edad de la población general. Hasta 1980 la esperanza de vida tras el diagnóstico era de tan solo 2 años. Actualmente, con la aplicación de nuevos tratamientos, la media de supervivencia se sitúa entre 4 y 7 años, llegándose incluso, a una primera remisión completa de más de 10 años en algunos pacientes (Sirohi and Powles, 2004).

**Figura 2.5.- Aspecto de células plasmáticas mielomatosas.** (Meter Maslak, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Blood work. Images in Hematology).



### 2.3.2.- Oncología histórica del MM.

El punto de inflexión en la historia del mieloma múltiple fue el descubrimiento por parte de Henry Bence-Jones (1848) de una extraña proteína en la orina de un paciente con diagnóstico de mieloma. Lo que llamó su atención fue que el sedimento urinario se disolvía con el calor y re-precipitaba con el frío. En su honor, estas proteínas se conocen actualmente con el nombre de proteínas de Bence-Jones, y no son otra cosa que cadenas ligeras de inmunoglobulinas.

Se indican a continuación, algunos de los hitos más importantes en la historia del mieloma:

- **1844:** Se describe el primer caso de mieloma, denominado “mollities and fragillitas ossium” (huesos blandos y frágiles).
- **1873:** Rustizky introduce el término mieloma múltiple para designar la presencia de numerosas células plasmáticas en el hueso.
- **1889:** Otto Kahler publica una detallada descripción clínica del mieloma múltiple (Enfermedad de Kahler).
- **1890:** Ramón y Cajal hace la primera descripción microscópica de células plasmáticas.
- **1900:** Wright descubre que las células del mieloma múltiple son células plasmáticas.
- **1909:** Weber sugiere que las células plasmáticas (de la médula ósea) causan la destrucción ósea del mieloma.
- **1930s:** El uso de la aspiración de médula ósea, la ultracentrifugación y la electroforesis de suero y orina mejoran la detección y diagnóstico del mieloma.
- **1953:** La inmunoelectroforesis permite la identificación exacta de la proteína monoclonal del mieloma.

- **1956:** Korngold y Lipari notan que la proteína de Bence-Jones está relacionada con la gammaglobulina sérica normal así como con las proteínas anormales del suero. En su honor las proteínas de Bence-Jones se llaman Kappa y Lambda.
- **1961:** Waldenström enfatiza la importancia de la diferenciación entre la gammapatías monoclonales y policlonales. Asocia la IgM monoclonal con la macroglobulinemia, distinguiéndola del mieloma.
- **1962:** Bergsagel informa del primer tratamiento exitoso con melfalán.
- **1964:** Korst informa del primer tratamiento exitoso con ciclofosfamida.
- **1969:** Melfalán asociado a prednisona logra mejores resultados que melfalán sólo.
- **1975:** Durie y Salmon presentan la estratificación del mieloma en estadios (I, II, III, A o B).
- **1982:** Feffer y Oserman realizan el primer trasplante en mellizos.
- **1983:** Se usa por primera vez la  $\beta$ 2-microglobulina sérica como test pronóstico (Bataille y Durie).
- **1984:** Barlogie y Alexanian presentan la quimioterapia con VAD (Vincristina, Adriamicina y Dexametasona).
- **1984-1986:** Primeros informes sobre trasplantes alogénicos en mieloma.
- **1986-1996:** Estudios con altas dosis de quimioterapia más trasplante de médula ósea. Se presentan dos trasplantes, el simple y el doble.
- **1998:** La delección del cromosoma 13 demuestra ser un factor de mal pronóstico para el trasplante.
- **1999:** La talidomida empieza a usarse con éxito en pacientes con recaída o enfermedad refractaria. Se introduce el minitransplante alogénico.
- **2000-2006:** Nuevas terapias prometedoras para el mieloma: análogos de la talidomida (Revlimid™, Actimid™), agentes anti-angiogénicos (Inhibidor de la tirosin quinasa de VEGF), análogos de la adriamicina (Doxil®), trióxido de arsénico (Trisenox®), agentes para bloquear la adhesión celular, inhibidores del proteasoma (Velcade®), inhibidores de farnesil-transferasas (Tipifarnib), etc.

(Brian and Durie, 2006).

### 2.3.3.- Biología del MM.

#### 2.3.3.1- Estadios del mieloma.

El mieloma se suele generar a partir de una célula B de un centro germinal normal. Entre un 30 y un 50 % de los casos pasan primero por un estadio de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI o MGUS) desde la cual evolucionan a mieloma medular, pudiendo pasar o no por un estadio de mieloma “latente” asintomático (*Smouldering myeloma*). Con el tiempo el tumor adquiere malignidad y puede proliferar en otros tejidos (sangre, líquido pleural o piel). Algunos de esos mielomas extramedulares pueden incluso immortalizarse como líneas celulares *in vitro* (Kuehl and Bergsagel, 2002).

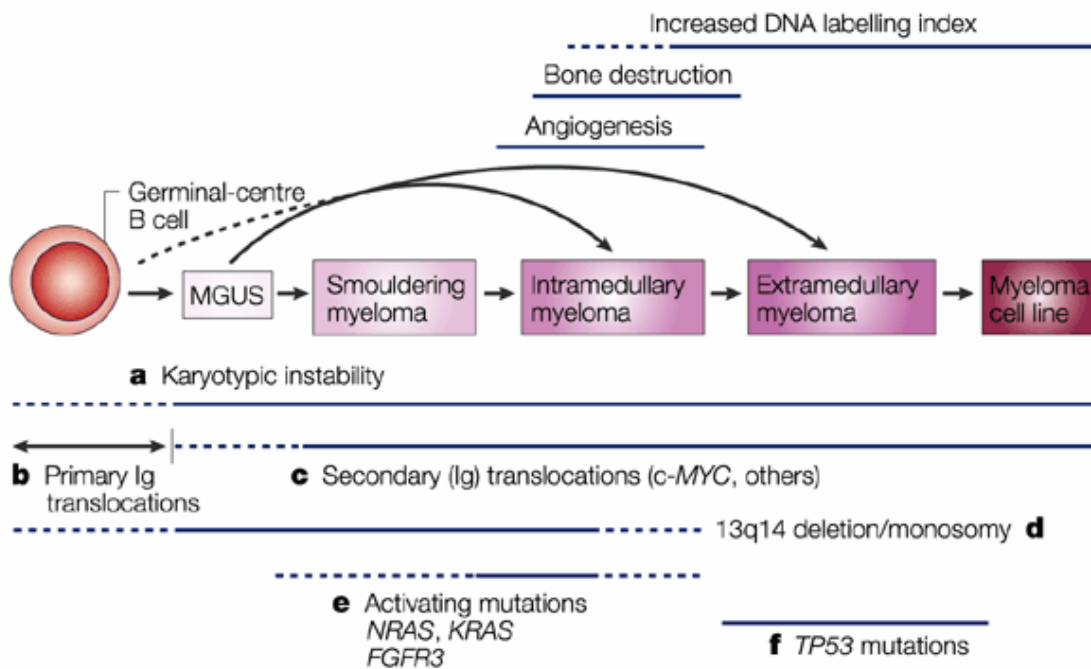


Figura 2.6.– Estadios del mieloma múltiple. (Kuehl and Bersagel, 2002).

Los pacientes de GMSI y mieloma asintomático se caracterizan por niveles de proteína monoclonal en suero inferiores a 3 g/dl, y por un número de células plasmáticas en la médula inferior al 10% en la GMSI, y ligeramente superior en el mieloma asintomático. Los pacientes de mieloma sin embargo, presentan la proteína monoclonal de forma estable no sólo en suero, sino también en orina y la plasmacitosis de médula ósea es superior al 30% (Brian and Durie, 2006).

El tipo de proteína monoclonal sintetizada y secretada varía de un paciente a otro. La IgG es la más común (un 52%) y la IgE la más rara (0,01%). La IgA (21%) está más comúnmente asociada a enfermedad fuera del hueso (enfermedad extra-esquelética), mientras que la IgD (2%) está asociada a leucemia de células plasmáticas y daño renal. La secreción de IgM es rara en el mieloma, se asocia típicamente a la Macroglobulinemia de Waldenström. Un 11% de pacientes presentan en orina proteínas de Bence-Jones y en algunos casos aislados se presentan 2 o más paraproteínas monoclonales o cadenas pesadas solamente (de IgG o IgA) (Brian and Durie, 2006)

### 2.3.3.2.- Inmunofenotipo.

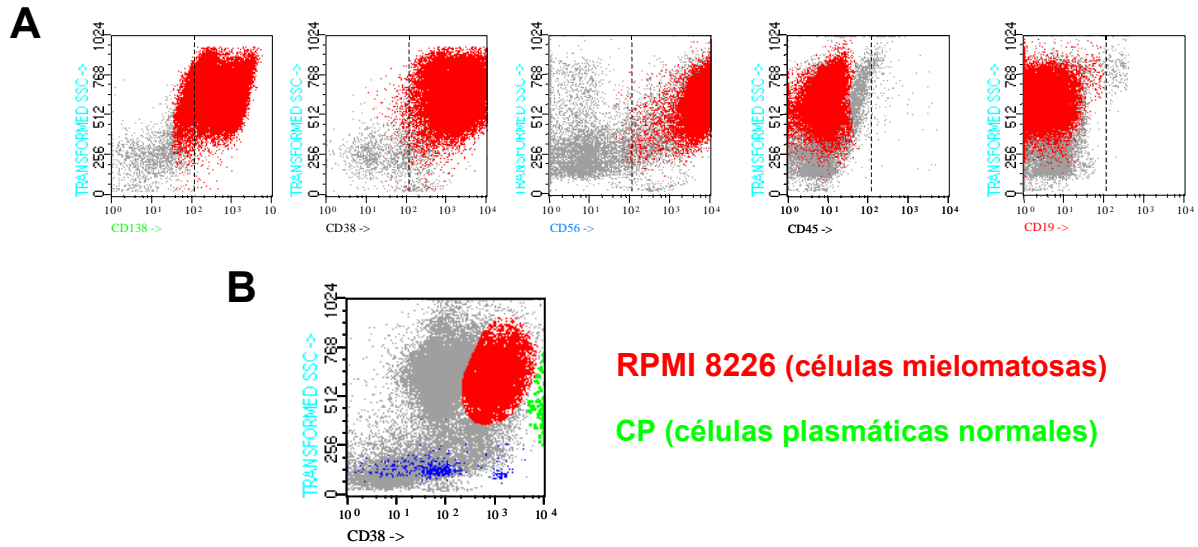
Las células mielomatosas presentan un inmunofenotipo variable de unos pacientes a otros, y que generalmente difiere del de las células plasmáticas normales. Los marcadores más importantes para el estudio del mieloma y su significado biológico son:

- **CD138/Syndecan-1:** es un proteoglicano de membrana que une componentes de la matriz extracelular y varios factores de crecimiento. Se expresa solamente en las células mielomatosas, aunque diferentes estudios han demostrado que no todas las células de mieloma lo presentan y que su expresión se pierde con la inducción de apoptosis (Jourdan et al,1998). Se considera un marcador específico de células de mieloma viables, por lo que suele emplearse en el aislamiento de células de MM de la médula ósea mediante técnicas de inmunoselección positiva.
- **CD38:** es una glicoproteína de membrana presente en células B, células T activadas, timocitos y células NK. En la línea linfoide podría definirse como un antígeno “saltarín”, que está presente en la membrana de las células pre-B, desaparece durante el proceso de maduración y posteriormente reaparece en los últimos estadios de diferenciación, siendo expresado tanto por células plasmáticas como por linfocitos B maduros (Stevenson et al, 1990). En el proceso de malignización de la célula plasmática su expresión suele reducirse ligeramente.

- **CD56/N-CAM:** es una molécula de adhesión neural por medio de la cual las células mielomatosas y osteoblastos establecen una interacción homofílica que conduce a una disminución de la producción de matriz ósea, favoreciendo la lisis del hueso (Ely et al, 2002). Su expresión es negativa o baja en células plasmáticas normales y elevada en células mielomatosas. En torno a un 70% de los pacientes de mieloma presentan niveles elevados (Lin et al, 2004). En ocasiones el avance del mieloma conduce a la desaparición de CD56 en membrana, lo que correlaciona con una forma más agresiva de la enfermedad y un peor pronóstico (Sahara et al, 2002).
- **CD19:** es una glicoproteína de membrana presente en la superficie de linfocitos B. Es una molécula importante en la transducción de señales, que puede actuar como regulador positivo o negativo de la proliferación celular dependiendo de la señal recibida. Se expresa en células plasmáticas normales pero no en células mielomatosas (Mahmoud et al, 1999). Más del 99% de los pacientes de mieloma han perdido la expresión de CD19 en sus células mielomatosas (Lin et al, 2004). La reintroducción del gen de CD19 y su re-expresión en células tumorales produce inhibición del crecimiento celular, por lo que se piensa que la pérdida de CD19 en mieloma podría ser un factor importante que contribuyera a una mayor proliferación de las células mielomatosas (Mahmoud et al, 1999).
- **CD45:** es una tirosin fosfatasa clave en la activación de los linfocitos y la señalización celular. Se ha demostrado que sus niveles de expresión correlacionan con el grado de avance de la enfermedad. La expresión de CD45 es mayor en pacientes con enfermedad temprana que en aquellos con enfermedad avanzada. Pacientes con lesiones óseas o mayor grado de angiogénesis tienen un porcentaje mucho menor de células CD45+ (Kumar et al, 2005).

Tras lo expuesto podríamos definir un patrón CD138 (-), CD38 (++), CD56(-), CD19 (+), CD45(-) para las células plasmáticas normales y un patrón CD138 (+), CD38(+), CD56(+), CD19(-), CD45(+/-) para las células mielomatosas (figura 2.7.). Aún así, en el mieloma múltiple es frecuente la heterogeneidad de marcadores de membrana entre pacientes. En la literatura se describen casos de células mielomatosas cuyo fenotipo es más semejante al de las células plasmáticas pese a su malignidad (Sahara et al, 2000).





**Figura 2.7.- Inmunofenotipo de la línea celular de mieloma RPMI 8226. (A)** La línea RPMI 8226 muestra un patrón característico de células mielomatosas. Son positivas para CD138,CD38,CD56 y negativas para CD45 y CD19. **(B)** Aunque RPMI 8226 siguen siendo muy positivas para CD38, su expresión ha disminuido respecto a la de células plasmáticas normales.

### 2.3.3.3.- Alteraciones genéticas en el mieloma.

Los cariotipos del mieloma múltiple son más similares a los de tejidos epiteliales que a los de otros tumores hematológicos. Sin embargo, el ratio de traslocaciones recíprocas es mayor en el mieloma que en los tumores epiteliales (Kuehl and Bergsagel, 2002). Las translocaciones primarias (causadas por los procesos de recombinación génica específicos de células B) suelen yuxtaponer uno o más oncogenes con secuencias reguladoras de la transcripción de genes de inmunoglobulinas en el 50% de los casos de GMSI y mieloma múltiple. Los oncogenes que se ven afectados con más frecuencia son: los genes de ciclinas D1 y D3, el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) combinado con la proteína nuclear MMSET y el factor de transcripción c-MAF. Las translocaciones secundarias ya no involucran procesos específicos de células B, pero también afectan a la expresión de oncogenes contribuyendo a la progresión de la enfermedad. La expresión de c-Myc, suele verse afectada por traslocaciones primarias en muchas neoplasias de células B; sin embargo, en el mieloma múltiple sólo se altera en estadios avanzados, por translocaciones secundarias y sin la participación de genes de inmunoglobulinas (Kuehl and Bergsagel, 2002).

Otras alteraciones genéticas frecuentes en el mieloma son las mutaciones N-Ras y K-Ras2. También son numerosas las alteraciones cromosómicas, que se detallan en el esquema contiguo. De entre ellas destaca la monosomía del cromosoma 13 por su alta frecuencia y su correlación con un mal pronóstico.

**Cambios numéricos**

**Trisomías:** 3,5,7,9,11,15,18,19,21

**Monosomías:** 8,13,14,16,X,

**Cambios estructurales**

1p y 1q	Trisomías parciales de 1q
<b>14p+</b>	t(11:14)(q13;q32)
11q	t(11:14)(q13;q32) y deleciones
8q	t(8:14)(q24;q32)
6q	deleciones
22q11	deleciones

(Brian and Durie, 2006).

**2.3.3.4- Microambiente medular en el mieloma.**

Son múltiples las vías celulares implicadas en el desarrollo y progresión del MM. Tras la adhesión de las células de mieloma al estroma de la médula ósea, se induce la secreción de citoquinas por las células del estroma, entre las que se incluyen: interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral de tipo  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Estas, promueven a su vez, la secreción de **TRANCE**, también denominado **OPGL** (ligando de la osteoprotegerina) o **RANKL** (ligando de RANK), cuya función es promover la maduración de osteoclastos a partir de sus progenitores. En condiciones normales TRANCE es bloqueado por la Osteoprotegerina (OPG) manteniéndose el balance funcional entre osteoblastos (formadores de hueso) – osteoclastos (degradadores de hueso) (Hussein, 2002).

Las células de MM expresan en su membrana el proteoglicano Sindecán-1 (CD138) que atrapa la OPG reduciendo enormemente su concentración. El exceso de TRANCE en esas condiciones, estimula la maduración de osteoclastos y estos se unen a la matriz del hueso induciendo no sólo la lisis ósea, sino también la secreción de factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factores de crecimiento fibroblástico e insulínico de tipos I y II (FGF y IGF respectivamente). Estos factores de

crecimiento estimulan todavía más la proliferación de células mielomatosas y la secreción de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (**PTHrP**), que actúa sobre el estroma aumentando la secreción de TRANCE (Hussein, 2002).

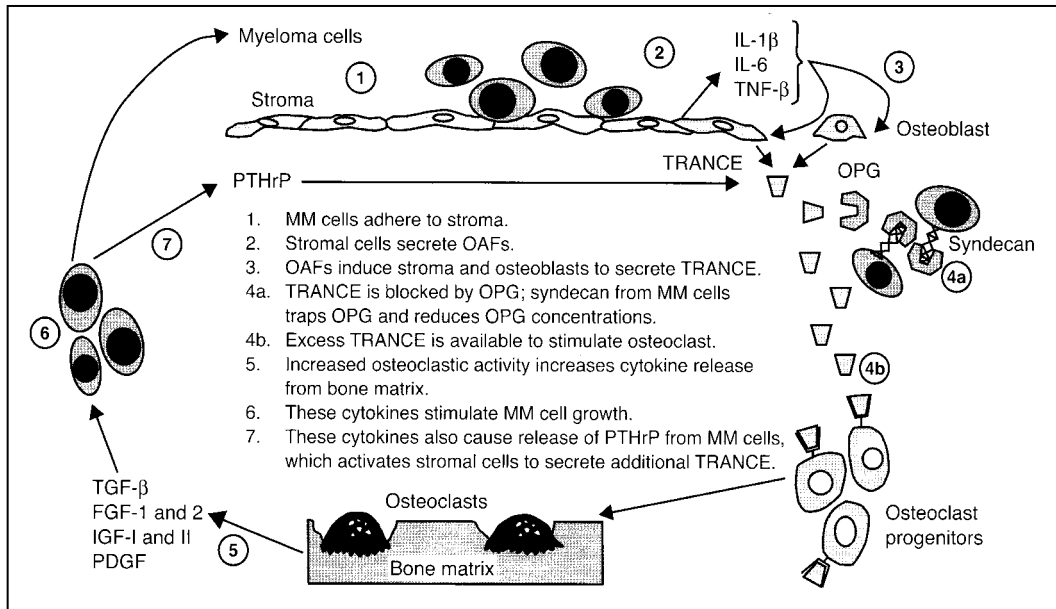


Fig 2.8.- Ciclo vicioso de crecimiento de las células mielomatosas. (Hussein, 2002).

La interleuquina-6 (IL-6) es la más importante de todas las citoquinas implicadas en la progresión del mieloma. Regula la proliferación y la supervivencia de las células de MM e inhibe su apoptosis. En primer lugar actúa como un factor de crecimiento paracrino, pero posteriormente, también parece tener efectos autocrinos. Inicialmente son las células del estroma las que aumentan su producción de IL-6 vía NF- $\kappa$ B. Su estimulación induce la degradación de I $\kappa$ B y la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B induciendo la transcripción de varios genes, entre ellos el de la IL-6. La IL-6 activa la vía de las Jak-quinasas, que por un lado activa factores de transcripción tales como STAT-1 y STAT-3 e inhibe la apoptosis mediante la regulación positiva de Bcl-x<sub>L</sub>, y por otro, activa la proliferación celular (Hussein, 2002). La IL-6 también induce secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), inhibiendo la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Bruno et al., 2005).

Otras citoquinas importantes en la evolución del mieloma son: el interferon  $\alpha$  (**IFN- $\alpha$** ), que puede estimular o inhibir la proliferación dependiendo del estado de diferenciación celular, la **IL-10**, cuyo papel es dependiente de la IL-6, y el **TGF- $\beta$ 1**, que actúa directamente sobre las células del estroma induciendo la producción de IL-6 y puede inhibir la respuesta inmune normal (Hussein, 2002).

Los mecanismos de angiogénesis involucrados en el mieloma no se conocen muy bien, pero se sabe con certeza de la participación de citoquinas como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (**bFGF**) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**). Este último estimula las células endoteliales favoreciendo la neovascularización mediante la activación de la vía MAPK y de la vía Jak/STAT, facilitando así la migración y proliferación de células mielomatosas (Kuehl and Bergsagel, 2002). También estimula la producción de IL-6 e interfiere con la función presentadora de antígeno de las células dendríticas (Bruno et al., 2005).

#### **2.3.4.-Fisiopatología del MM.**

El crecimiento descontrolado de células mielomatosas trae aparejado la destrucción de los huesos, insuficiencia de la médula ósea, hipervolemia e hiperviscosidad, supresión de la producción de inmunoglobulinas normales e insuficiencia renal. A veces la enfermedad puede permanecer asintomática durante muchos años siendo el dolor óseo el cuadro de presentación más común.

Los principales efectos patológicos del mieloma se recogen en el esquema de la página contigua:

**FISIOPATOLOGÍA EN FORMA ESQUEMÁTICA**

---

<b>HALLAZGOS ESQUELÉTICOS</b>	Lesiones osteolíticas únicas o múltiples. Osteoporosis difusa (osteopenia)
<b>EFFECTOS ASOCIADOS A LA DESTRUCCIÓN ÓSEA</b>	Hipercalcemia (calcio elevado en sangre) Hipercalciuria (calcio elevado en orina) Fracturas óseas Pérdida de altura (colapso vertebral)
<b>MIELOMA EXTRAESQUELÉTICO</b>	Compromiso de hígado, riñones y otros sitios de tejido blando como el área de cabeza y cuello.
<b>SANGRE PERIFÉRICA</b>	Anemia Coagulación anormal Leucopenia Trombocitopenia Leucemia de células plasmáticas Linfocitos B monoclonales circulantes (precursores de las células mielomatosas)
<b>CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS</b>	Hiperproteinemia (proteínas elevadas) Hipervolemia (volumen expandido) Inmunoglobulinas monoclonales (IgG, IgD, IgA, IgM, IgE, cadenas livianas) Hiponatremia (sodio bajo en suero) $\beta$ 2-microglobulina elevada en suero Disminución de la albúmina sérica Elevación de la IL-6 y proteína C reactiva en suero.
<b>ANORMALIDADES RENALES</b>	Proteinuria, casquetes sin leucocitos o eritrocitos Disfunción tubular con acidosis Uremia (insuficiencia renal) Amiloidosis

(Brian and Durie, 2006)

#### 2.3.4.1.- Enfermedad ósea.

Es debida al incremento en la actividad de los osteoclastos (células que destruyen el hueso) y la disminución de la actividad de osteoblastos (células que generan nuevo hueso) en los puntos afectados. La unión normal entre la función de los osteoclastos y osteoblastos es responsable de la remodelación y reparación del hueso. Todavía no se conocen los mecanismos que inactivan los osteoblastos, pero si se sabe que la actividad de los osteoclastos se ve estimulada por una serie de citoquinas denominadas **OAFs** (*Osteoclast Activator Factors*), entre ellas: IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y  $\beta$  (apartado 2.3.3.4). Existen dos mecanismos particularmente importantes que participan en esta activación. El primero involucra a la proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), secretada por las células de mieloma y que funciona como agente quimiotáctico para los osteoclastos. El segundo implica al receptor activador de NF- $\kappa\beta$  (**RANK**), que liga a la proteína RANK ligando (**RANKL o TRANCE**) (Kuehl and Bergsagel, 2002). RANKL se expresa normalmente en la membrana de osteoblastos y células T. Cuando se une a RANK en la membrana de un precursor de osteoclasto estimula su activación. Las células del estroma segregan un receptor soluble llamado osteoprotegerina (**OPG**) que compite con RANK por su unión a RANKL, pero las células mielomatosas ligan gran parte de la OPG y estimulan la expresión de RANKL alterando los mecanismos de regulación de formación del hueso, incrementando la actividad osteoclástica y favoreciendo la lisis ósea (apartado 2.3.3.4).

#### 2.3.4.2.- Anemia.

Es otro rasgo característico del mieloma. En condiciones fisiológicas algunos eritroblastos sufren apoptosis causada por proteínas de la familia TNF como FasL (CD95L) o Apo2L/TRAIL. Fas, DR4 y DR5 se expresan en la membrana de todos los eritroblastos independientemente del estadio de maduración. FasL y TRAIL sólo se expresan en los eritroblastos maduros. La interacción de los eritroblastos maduros con los inmaduros conduce a la apoptosis de estos últimos y con ello a la disminución de la eritropoyesis fisiológica (Grzasko, 2004).

#### **2.3.4.3.- Insuficiencia renal.**

Las proteínas mielomatosas pueden causar daño renal por el depósito de proteínas mielomatosas o amiloide en diferentes puntos. También pueden producir un daño tubular selectivo que da origen a los defectos metabólicos del síndrome de Fanconi (permite la pérdida de aminoácidos y fosfatos por la orina, con posibles trastornos metabólicos óseos) (Brian and Durie, 2006).

#### **2.3.4.4.- Insuficiencia de otros órganos.**

Las células mielomatosas pueden acumularse, además de en la médula ósea o riñón, en una gran variedad de tejidos, produciendo un amplio rango de complicaciones:

- Efectos neurológicos: El tejido nervioso se puede ver afectado, bien por los efectos directos de las proteínas mielomatosas contra los nervios (ej: capas de mielina), bien por el depósito de fibrillas de amiloide, dañando su función.
- Plasmocitoma: Tanto en huesos como en tejido blando se puede producir compresión o desplazamiento de los nervios de la médula espinal o del tejido cerebral. A menudo estos efectos requieren un tratamiento inmediato con corticoides y/o terapia radiante.
- Infecciones: Es junto con la enfermedad ósea el rasgo más característico de los pacientes con mieloma. La presencia del mieloma activo en la médula resulta de la inhibición de las funciones inmunes normales, dañando la función de linfocitos T y activando la función monocito/macrófago de forma aberrante.

(Brian and Durie, 2006).

### **2.3.5.- Diagnóstico y marcadores de pronóstico.**

#### Diagnóstico

Se emplean varias pruebas analíticas para confirmar el diagnóstico del mieloma, valorar el alcance de la enfermedad y planificar y supervisar el tratamiento.

Se incluyen:

- Hemograma completo.
- Concentración plasmática de urea y niveles de calcio, creatinina, albúmina y deshidrogenasa láctica (LDH) en sangre.
- Concentración de proteína en orina.
- Inmunolectroforesis de las proteínas del plasma y orina para identificar y cuantificar la proteína monoclonal (proteína M).
- Concentración de  $\beta$ 2-microglobulina y proteína C reactiva en suero.
- Aspirado o biopsia medular, citogenética y marcaje de células plasmáticas.
- Inspección ósea del esqueleto, resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía axial computerizada (TAC).

(Zaidi and Vesole, 2001; Brian and Durie, 2006).

#### Marcadores de pronóstico

La clasificación de los pacientes de mieloma en distintos grupos dependiendo del estado de la enfermedad permite decidir mejor y más razonadamente cuando iniciar el tratamiento y que tipo de terapia dar. En 1975, Durie y Salmon propusieron un sistema de estadificación del mieloma que todavía hoy se sigue empleando. El estadio clínico de la enfermedad (estadio I, II o III) se basa en varias mediciones, incluidos los niveles de proteína M, el número de lesiones óseas líticas, los valores de hemoglobina y los niveles de calcio en suero. Estos estadios se subdividen en A o B, de acuerdo con la función renal. Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema de estadificación del mieloma desarrollado por el grupo de trabajo de la Fundación Internacional del Mieloma (IMF), en el que el estadio clínico de la enfermedad (estadio I, II o III) se determina únicamente en base a los niveles en suero de la  $\beta$ 2-microglobulina y la albúmina. Ambos sistemas se muestran en la página contigua:



**Sistema de estadificación de Durie y Salmon.**

Estadio	Criterios	Masa de células de mieloma medidas (células x 10 <sup>12</sup> /m <sup>2</sup> )
<b>I (masa celular baja)</b>	Concentración de hemoglobina > 10 g/dl. Valor de calcio en suero normal o < 12 mg/dl Radiografía ósea, estructura ósea normal o sólo plasmacitoma óseo aislado. Producción baja de proteína M IgG < 5 g/dl; IgA < 3g/dl; Proteína de Bence-Jones < 4 g/24h	< 0,6
<b>II(masa celular intermedia)</b>	No se ajusta al estadio I ni al III	0,6-1,2
<b>III (masa de células alta)</b>	Concentración de hemoglobina < 8,5 g/dl Calcio en suero >12 mg/dl Lesiones osteolíticas avanzadas Producción alta de proteína M IgG > 7g/dl; IgA > 5 g/dl; Proteína de Bence-Jones > 12g/24h	< 1,2

**Subclasificación (A o B)**

A: Función renal relativamente normal (creatinina en suero < 2,0 mg/dl)

B: Función renal anómala (creatinina en suero ≥ 2,0 mg/dl).

(Brian and Durie, 2006).

**Sistema de Estadificación Internacional (ISS)**

Estadio	Criterio
<b>I</b>	β2-microglobulina < 3,5 mg/dl ó Albúmina > 3,5 g/dl
<b>II</b>	β2-microglobulina < 3,5 mg/dl y albúmina > 3,5 g/dl ó β2-microglobulina 3,5-5,5 mg/dl independientemente de albúmina
<b>III</b>	β2-microglobulina > 5,5 mg/dl.

(Brian and Durie, 2006).

En la actualidad existen distintos marcadores de pronóstico que ayudan a determinar la velocidad de crecimiento del tumor, el alcance de la enfermedad, la biología de las células tumorales, la respuesta a la terapia y el estado de salud general del paciente. También ayudan a determinar el momento de inicio del tratamiento.

Los marcadores de pronóstico favorable utilizados actualmente son:

- 1) niveles de  $\beta$ 2-microglobulina sérica < 2,5 mg/l
  - 2) índice de marcaje de células plasmáticas < 1%
  - 3) niveles de proteína C reactiva < 4 mg/l
  - 4) Ausencia del isotipo IgA (aunque existe controversia al respecto)
  - 5) ausencia de morfología plasmablástica (inmadura) en células plasmáticas
  - 6) no existencia de anomalías en el número y estructura de cromosomas (una anomalía en el cromosoma 13 se asocia con un grado más agresivo de la enfermedad)
  - 7) baja densidad microvascular en la médula ósea
  - 8) bajos niveles de expresión del receptor de IL-6
- (Zaidi and Vesole, 2001).

### **2.3.6.- Terapia.**

Los objetivos fundamentales del tratamiento son mejorar la calidad de vida y aumentar la supervivencia. Desde la introducción del melfalán en 1962, varias combinaciones de fármacos citotóxicos se han utilizado para mejorar el resultado final de la quimioterapia. Se han utilizado regímenes con dosis altas de fármacos seguidos de trasplante de médula ósea (TMO) o trasplante de células progenitoras hematopoyéticas periféricas "Stem Cells" (PSCT). Actualmente no hay consenso acerca de cual es la mejor forma de tratar el mieloma.

Teniendo en cuenta que el mieloma es incurable, la decisión primera y más importante es saber cuando se debe iniciar el tratamiento. Los pacientes con gammapatía monoclonal y con mieloma asintomático deben ser controlados más que tratados. El tratamiento se recomienda cuando el componente M se incrementa y/o aparecen síntomas clínicos. Este tratamiento tiene como objetivo solucionar problemas específicos y alcanzar un control general de la enfermedad (Brian and Durie, 2006).

### 2.3.6.1.- Quimioterapia.

Las opciones de tratamiento incluyen la quimioterapia de inducción, la de dosis altas y el tratamiento de soporte. El melfalán continúa siendo el mejor agente individual para la terapia del mieloma, aunque actualmente se prefiere utilizar una combinación de fármacos como primera línea:

#### 1) Cuando no se considera la opción de recoger las células hematopoyéticas para un posterior trasplante.

- Melfalán/Prednisona (MP), Ciclofosfamida/Prednisona (CP)- La combinación MP es una de las más utilizadas en el tratamiento de pacientes de edad avanzada. El 60% de los pacientes tienen una respuesta objetiva, reflejada por un 50% de reducción en los niveles de proteína M y reducción del dolor óseo y la fatiga. La ciclofosfamida puede reemplazar al melfalán al tener una actividad anti-mielomatosa similar y ser menos tóxica para las células madre hematopoyéticas normales, pudiendo ser aceptable en pacientes que son candidatos en el futuro a un trasplante. Por otro lado, tiene efectos secundarios más inmediatos que el melfalán, incluyendo toxicidad gastrointestinal y náuseas.
- Otras combinaciones más complejas- Desde mediados de los años 60 se han ensayado muchas combinaciones de diferentes drogas. Se han identificado de este modo diferentes protocolos que sugieren un beneficio adicional sobre las combinaciones MP o CP. A destacar los protocolos: **M2 (VBMCP; Vincristina, Bis-cloro-nitrosourea, Melfalán, Ciclofosfamida y Prednisona)**, **VMCP/VBAP (Vincristina, Melfalán, Ciclofosfamida y Prednisona/ Vincristina, Bis-cloro-nitrosourea, Adriamicina y Prednisona)** y **ABCM (Adriamicina, Bis-cloro-nitrosourea, Ciclofosfamida y Melfalán)**. Existe algún indicio de superioridad frente a MP, aunque son más tóxicos y más caros. La tendencia actual es emplear las combinaciones MP o CP como una primera elección y dejar las combinaciones más complejas como una segunda línea para aquellos pacientes que no alcanzan una respuesta satisfactoria.
- Nuevas opciones- La más significativa entre las nuevas opciones terapéuticas es la administración de la combinación MP junto con talidomida como primera terapia.

**2) Cuando se ha planeado recoger las células hematopoyéticas para un posterior trasplante.**

- Quimioterapia VAD- El protocolo **VAD**(Vincristina, Adriamicina, Dexametasona) fue introducido por primera vez en 1984 y se convirtió en una alternativa a MP o CP. Su empleo no produce un mejor resultado, pero puede producir una respuesta terapéutica sin lesionar las células hematopoyéticas normales de la médula ósea. Es particularmente ventajoso en pacientes que recibirán altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante.
- Talidomida/Dexametasona- Se están llevando a cabo numerosos estudios sobre los efectos beneficiosos de esta combinación todavía en ensayo.
- Nuevas opciones- Una de ellas es Velcade®, administrado como agente único o bien en combinación con talidomida.

La sensibilidad o resistencia intrínseca a las drogas son los factores determinantes del éxito terapéutico. Dado que ninguno de los tratamientos actuales erradica todas las células mielomatosas, las características de las células mielomatosas residuales, posteriores a la quimioterapia inicial, son de particular importancia. Algunas pocas células mielomatosas agresivas residuales pueden, potencialmente, causar más problemas que una gran cantidad de células inactivas (Brian and Durie, 2006).

**2.3.6.2.- Trasplante.**

Se emplea fundamentalmente en pacientes jóvenes, recién diagnosticados de mieloma sintomático y con indicadores de buen pronóstico. Consiste en un tratamiento con altas dosis de quimioterapia (AD) y posterior trasplante de células progenitoras hematopoyéticas periféricas. Para ello, en primer lugar se extraen las células madre del paciente o de un donante compatible, se procesan en el laboratorio y se guardan hasta el momento del trasplante. Al paciente se le trata con altas dosis de quimioterapia y a veces incluso con radioterapia. Finalmente, las células progenitoras se descongelan y se inyectan al paciente, en el que empezarán a producir nuevas células sanguíneas. El tipo de trasplante realizado depende del origen de las células madre y del número de veces en que se inyecten las células.

- Transplante autólogo- Las células madre se obtienen del paciente antes de ser sometido a dosis altas de quimioterapia. Es el procedimiento más común, ya que no requiere un donante y se asocia con menos efectos secundarios. Puede considerarse para pacientes que alcanzan enfermedad estable tras la quimioterapia inicial o bien como terapia de rescate en ensayos clínicos.
- Transplante alogénico- Las células madre se obtienen de un donante (generalmente un familiar). Conlleva más riesgo de complicaciones que el transplante anterior, incluyendo además el riesgo de infecciones y de enfermedad de injerto contra huésped. Puede considerarse en pacientes jóvenes que responden o alcanzan enfermedad estable tras la quimioterapia inicial, en pacientes con enfermedad progresiva y que ya han recibido un transplante autólogo o bien como terapia de rescate en ensayos clínicos.
- Doble transplante o transplante en tándem (autólogo)- El paciente es sometido a dos trasplantes en el plazo de 6 meses. Las células madre se recogen antes de someter al paciente al primer ciclo de dosis altas de quimioterapia. En pacientes que responden o con enfermedad estable tras la quimioterapia inicial parece ser más efectivo que un sólo transplante. Aún así, está todavía bajo investigación en ensayos clínicos.
- Transplante autólogo seguido de transplante mini-alogénico- El paciente es sometido primero a dosis altas de quimioterapia y transplante autólogo y después a una dosis más moderada de quimioterapia y transplante alogénico. Con el primer transplante se reduce enormemente la carga de la enfermedad, mientras que con el segundo, y gracias a la ayuda de los linfocitos alogénicos, se eliminan las células de mieloma remanentes. Al igual que el transplante autólogo en tandem, está todavía bajo investigación en ensayos clínicos.

### **2.3.6.3.- Irradiación.**

La terapia con radiaciones ionizantes es una modalidad importante del tratamiento del mieloma. Puede ser un tratamiento muy efectivo en pacientes con problemas locales de destrucción ósea, compresión nerviosa o de la médula espinal. La mayor desventaja es que esta técnica daña permanentemente a las células progenitoras hematopoyéticas normales de la médula en la zona tratada, por lo que su uso se limita a áreas concretas con problemas particulares.

(Brian and Durie, 2006).

#### 2.3.6.4.- Terapia de mantenimiento.

Una vez que el tratamiento ha estabilizado la enfermedad, muchos pacientes pueden permanecer en buenas condiciones durante meses o años. Para prolongar esta situación de estabilidad se emplean las denominadas terapias de mantenimiento. Entre ellas cabe destacar:

- Interferón-alfa- Es un agente que ha demostrado prolongar las remisiones alcanzadas con quimioterapia estándar o con altas dosis. Sin embargo, los resultados obtenidos en ensayos clínicos son conflictivos y parece que sólo un 10-15 % de los pacientes se benefician realmente con el tratamiento (Bladé and Esteve, 2000). Es por ello, que el uso del interferón- $\alpha$  debe ser individualizado, valorando los posibles beneficios con los potenciales efectos secundarios, costos e inconvenientes para cada paciente. Pese a todo, la mayoría de los investigadores piensan que el interferón- $\alpha$  tiene un papel significativo, aunque pequeño, en el manejo del mieloma.
- Prednisona - Tiene una toxicidad aceptable y puede prolongar tanto la remisión como la supervivencia sin comprometer la calidad de vida. Una particular ventaja es que el paciente puede tomar la prednisona durante varios años sin desarrollar resistencia. Aún así, se requiere cautela debido a los efectos secundarios a largo plazo, por lo que en algunas ocasiones es necesario reducir la dosis.
- Talidomida – Datos recientes de los últimos ensayos clínicos señalan a la talidomida como un agente útil en la terapia de mantenimiento, ya se administre como agente único, ya sea en combinación con esteroides. El principal efecto secundario a largo plazo consecuencia de la administración de talidomida es neuropatía periférica.

(Brian and Durie, 2006).

#### 2.3.6.5.- Cuidados de soporte.

Son aquellos tratamientos orientados a tratar la sintomatología del mieloma pero no la enfermedad en sí misma. Destacan:

- Eritropoyetina- Se administra para mejorar los niveles de eritropoyetina endógenos en pacientes con anemia persistente. La administración debe continuarse sólo si el paciente demuestra tener una clara mejoría. En ocasiones su administración debe acompañarse de un suplemento de hierro.
- Bifosfonatos- Pequeñas moléculas inorgánicas que se unen a una sustancia llamada hidroxapatito en la superficie del hueso dañado, y son internalizadas por los osteoclastos inhibiendo su actividad y conduciendo finalmente a su apoptosis (Brown et al., 2004). Deben ser empleados como medida adyuvante en pacientes con problemas óseos. Se emplean entre otros: el pamidronato, el clodronato y el ácido zolendróico (Zometa). Otros nuevos bifosfonatos están siendo evaluados en ensayos clínicos.
- Antibióticos- Las infecciones son un problema común y recurrente en los pacientes con mieloma. La administración de antibióticos está indicada inmediatamente cuando se sospecha la presencia de una infección activa. El uso continuado de profilaxis antibiótica puede aumentar las posibilidades de resistencia antibiótica, pero puede también reducir las oportunidades de complicaciones de infecciones recurrentes. Se ha demostrado que los antibióticos son beneficiosos cuando se usan de forma profiláctica en los dos primeros meses de la inducción con quimioterapia.

Otras medidas complementarias a las expuestas son: la diálisis, la plasmaféresis, la cirugía, etc (Brian and Durie, 2006).

#### **2.3.6.6.- Manejo de la resistencia a drogas o enfermedad refractaria.**

La recaída es un problema frecuente en el mieloma y que sobreviene inevitablemente tras la etapa de remisión. Requiere una reinducción con quimioterapia que variará en función del tiempo que haya durado la remisión. Si la recaída se produce entre los 6 meses y el año, se reutiliza la misma terapia que produjo la primera remisión. Un 50% de los pacientes entrarán de nuevo en remisión, siendo los resultados tanto mejores cuanto más tiempo haya durado la primera. Si la remisión ha sido inferior a 6 meses, se deben utilizar terapias alternativas como el protocolo VAD.

### Velcade® (Bortezomib) en el tratamiento del mieloma refractario.

Su empleo fue aprobado por la FDA en 2003 para el tratamiento de pacientes de mieloma que hayan recibido anteriormente al menos dos terapias de tratamiento diferentes, y pese a ello, hayan mostrado progresión de la enfermedad durante la última terapia (Brian and Durie, 2006).

## **2.3.7.- Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.**

### **2.3.7.1.- Talidomida**

Empleada en el tratamiento de las náuseas del embarazo durante los años 50, fue posteriormente retirada del mercado en 1961 por sus efectos teratogénicos. Durante los años 60 se ensayó como agente anti-cancerígeno con resultados insatisfactorios, hasta que el reconocimiento de sus propiedades anti-angiogénicas condujo al primer ensayo clínico en mieloma múltiple en la Universidad de Arkansas en 1999. Desde entonces, muchos estudios han confirmado los efectos beneficiosos de la talidomida (Thalomid®, Celgene Corporation) en pacientes con recaída y mieloma refractario, siendo actualmente considerada como terapia estándar para estos casos (García-Sanz, 2006). Puede administrarse como agente único o combinada con otras drogas como dexametasona y melfalán.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción de la talidomida, se han propuesto diferentes mecanismos entre los que se incluyen: inhibición de la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), prevención de los daños causados en el ADN por radicales libres, supresión de la angiogénesis, estimulación de la inmunidad celular y alteración de la expresión de moléculas de adhesión (Rajkumar et al, 2002). También se postula que la talidomida puede inhibir la actividad de  $NF-\kappa\beta$  y de las ciclooxigenasas (COX-I y COX-II).

Las dosis óptimas de talidomida varían de un paciente a otro. Fatiga, estreñimiento, somnolencia, neuropatía periférica y leucopenia son los efectos secundarios más comunes (Kyle and Rajkumar, 2004).



### **2.3.7.2.- Velcade™ (Bortezomib).**

Velcade (Bortezomib ó PS-341, Millenium Pharmaceuticals, Inc) fue el primer inhibidor del proteasoma evaluado en ensayos clínicos, siendo aprobado su empleo para el tratamiento del mieloma refractario por la FDA en mayo de 2003 (Kyle and Rajkumar, 2004). Se trata de un inhibidor específico y reversible de la actividad de tipo quimotripsina de la subunidad 26S del complejo multienzimático denominado proteasoma. Las proteínas que han de ser catabolizadas en el proteasoma se ubiquitinan para así pueden ser reconocidas y degradadas en la parte central del complejo. La acción del proteasoma es crítica para el buen funcionamiento del ciclo celular, la transducción de señales y la regulación de la transcripción. La inhibición de su actividad mediada por Velcade desequilibra estos procesos celulares e induce apoptosis en numerosos tipos de células tumorales. Estas células parecen ser más susceptibles a sus efectos que las células normales, debido a su mayor actividad metabólica y a su mayor tasa de síntesis proteica. Un efecto importante de la inhibición del proteasoma es la acumulación de  $I\kappa\beta$ , el inhibidor del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$  (Palombella et al., 1994). La inhibición de NF- $\kappa\beta$  conduce a una disminución en la expresión de moléculas de adhesión, supervivencia y factores angiogénicos y una disminución en los niveles de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y A1/Bfl-1, promoviendo la liberación de citocromo c, la activación de caspasas y la apoptosis celular (Mitsiades et al, 2002).

El Velcade se ha ensayado también en combinación con otros agentes como dexametasona, talidomida, melfalán y doxorubicina liposomal (Orlowski and Zeger, 2006). Los efectos adversos más comunes del tratamiento con Velcade son toxicidad gastrointestinal, diarrea, citopenia, fatiga y neuropatía periférica (Kyle and Rajkumar, 2004).

### **2.3.7.3.- Fármacos inmunomoduladores (IMiDs™).**

Los ImiDs (Celgene Corp) son variantes amino-sustituídas de la talidomida. Son más potentes y carecen de algunos de sus efectos secundarios. Pueden inducir apoptosis, inhiben la unión de las células de mieloma a las células del estroma de la médula ósea, inhiben la angiogénesis y promueven la toxicidad celular mediada por las células NK (Hideshima et al., 2001; Dredge et al., 2002).

El Revimid (CC-5013) es un ImiD que se está siendo actualmente evaluado para el tratamiento del mieloma. Los resultados obtenidos en ensayos de fase II demostraron su eficacia en pacientes refractarios a la talidomida, mostrando una importante actividad selectiva contra las células de mieloma y pocos efectos secundarios. Actualmente se están llevando a cabo ensayos de fase III (Maier and Hammond, 2006). Puede administrarse conjuntamente con dexametasona cuando la respuesta es subóptima.

#### **2.3.7.4.-Genasense™**

El Genasense (G3139, Oblimersen, Genta, Inc) es un oligonucleótido antisentido de Bcl-2. Se administra mediante infusión intravenosa utilizando una bomba portátil (Brian and Durie,2006).

Muchas células plasmáticas expresan niveles elevados de Bcl-2, lo cual contribuye a la resistencia a la apoptosis inducida por drogas anti-tumorales. Genasense se une al RNA mensajero bcl-2, impidiendo su traducción y disminuyendo la síntesis de la proteína. Su empleo junto con otros agentes quimioterápicos representa una estrategia muy prometedora para vencer la multirresistencia a drogas existente en algunos casos de mieloma (Chanan-Khan, 2004), pues es capaz de potenciar la toxicidad de fármacos como la dexametasona y la doxorubicina. Este efecto sinérgico se ha demostrado en ensayos clínicos de fase II combinando dexametasona y talidomida con Genasense en pacientes con recaída o mieloma refractario (Badros et al., 2005). Actualmente se están llevando a cabo ensayos de fase III.

#### **2.3.7.5.- Panzem™**

Panzem (2-metoxiestradiol o 2ME2, EntreMed, Inc) es un inhibidor de la angiogénesis de administración oral (Brian and Durie, 2006). Ensayos *in vitro* muestran que induce muerte celular e inhibe el crecimiento de las líneas celulares de mieloma. Se cree que más que atacar al tumor en sí mismo, altera el entorno medular inhibiendo el crecimiento de nuevas células sanguíneas y creando un espacio hostil para las células de mieloma. También se ha observado que bajas dosis de 2ME2

inducen algunos cambios morfológicos en células de mieloma e incrementan la expresión de CD49e, la secreción de cadenas ligeras de Igs y la síntesis del factor de transcripción XBP-1 (Hou et al., 2005).

#### **2.3.7.6.- Trisenox™.**

Trisenox (tríóxido de arsénico, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [ATO], Cell Therapeutics, Inc) ha sido empleado como tratamiento médico durante miles de años, y aún persiste como remedio popular, en China. Actualmente está aprobado como tratamiento de la leucemia promielocítica aguda en pacientes que no responden a otros fármacos. Los ensayos *in vitro* muestran que ATO ejerce su función anti-mieloma mediante la inhibición de la vía de señalización Jak/STAT, inhibiendo la activación de STAT3. Su actividad parece ser inversamente proporcional a los niveles intracelulares de glutathion (GSH), posiblemente por el papel que este último desempeña en la reparación de daños mitocondriales (Bruno et al., 2005).

Aunque ATO induce apoptosis en las líneas celulares de mieloma múltiple, su actividad *in vivo* ha sido un poco desesperanzadora debido a la gran cantidad de mecanismos de resistencia (Zhou et al., 2005). Se está evaluando en combinación con otros agentes como dexametasona, melfalán y ácido ascórbico (Vitamina C). Este último ralentiza el metabolismo de ATO en el cuerpo, haciendo que permanezca más concentrado y resulte más efectivo, al disminuir los niveles de GSH, a la vez que puede ayudar a aliviar algunos de sus efectos secundarios. Otros ensayos de fase II están evaluando la eficacia de ATO y ácido ascórbico en combinación con bortezomib o talidomida (Brian and Durie, 2006).

#### **2.3.7.7.-Aplidina™ (*Aplidium albicans*).**

La apolidina es un depsipéptido cíclico aislado a partir de *Aplidium albicans* que ha mostrado actividad anti-tumoral prometedora tanto *in vitro* como *in vivo*. Los efectos citotóxicos de la apolidina son mediados a través de JNK y de las vías apoptóticas de Fas/CD95 y mitocondrial (Bruno et al., 2005). Actualmente se encuentran en marcha ensayos clínicos en fase II tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas.

### **2.3.7.8.-Inhibidores de histona deacetilasas (HDACi).**

El empaquetamiento de las histonas, que forman los nucleosomas, está regulado por su acetilación en residuos de lisina (Lys). Es un proceso regulado por la actividad de las histona acetiltransferasas (HAT) y las histona deacetilasas (HDAC). Cuando las histonas se acetilan por acción de las HAT, la estructura del nucleosoma se relaja, permitiendo el acceso de los factores de transcripción y otras enzimas implicadas en la misma al ADN. La acción de las HAT se revierte por la actividad de las HDAC, que favorecen el empaquetamiento de los nucleosomas. Por lo tanto, los inhibidores de HDAC (HDACi) favorecen la accesibilidad a la cromatina y permiten la transcripción de muchos más genes (Lindemann et al., 2004). Los HDACi causan diferenciación celular y/o apoptosis en las células tumorales. Además, afectan tanto a las células mielomatosas como a su interacción en el microambiente medular, inhiben la señalización a través del receptor de IGF-1 y del receptor de IL-6, impiden la síntesis de moléculas anti-apoptóticas, tales como los inhibidores de caspasas, alteran la expresión de oncogenes, de enzimas de reparación del ADN, de factores de transcripción, de moléculas de adhesión, etc. Simultáneamente, estos inhibidores potencian la sensibilidad de las células de mieloma a otros agentes tales como dexametasona e iMIDs (Lindemann et al., 2004; Bruno et al., 2005).

Algunos inhibidores de HDAC tales como el SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida) inducen apoptosis en líneas celulares de mieloma y en células obtenidas de pacientes, tanto sensibles como resistentes a las terapias convencionales (Mitsiades et al., 2003). Actualmente se están llevando a cabo ensayos de fase I y II en pacientes con recaída o mieloma refractario.

### **2.3.7.9.- Zarnestra™.**

El Zarnestra (tipifarnib o R115777, Janssen/Cilag) pertenece al grupo de fármacos inhibidores de la actividad farnesil-transferasa (FTIs). La farnesil-transferasa es una enzima muy importante en señalización y proliferación celular a través de la vía Ras ( apartado 4.1.1). Aunque inicialmente estas drogas se diseñaron pensando en el alto porcentaje de pacientes con Ras mutado, hoy en día se sabe que su toxicidad es independiente de la presencia o ausencia de estas mutaciones (Le Gouill et al., 2002). Actualmente se está evaluando en ensayos de fase II en pacientes con recaída o enfermedad refractaria.

### 2.3.7.10.- Inmunoterapia.

La búsqueda continua de nuevas terapias junto con el mejor conocimiento del sistema inmunitario, ha dado lugar al desarrollo de la inmunoterapia, cuyo objetivo no es otro que incrementar la respuesta inmune del paciente contra las células mielomatosas. Básicamente se pueden distinguir dos tipos de inmunoterapia: la inmunoterapia pasiva, que consiste en la transferencia al paciente de anticuerpos o células previamente generados *in vitro* y dirigidos contra el tumor, y la inmunoterapia activa, que pretende activar *in vivo* el sistema inmunitario e inducirlo a elaborar una respuesta específica contra los antígenos tumorales (Inogés et al., 2004). Las neoplasias hematológicas, concretamente las de extirpe B, expresan en su membrana una Ig que se considera un verdadero antígeno específico de tumor, lo que las ha convertido en la diana ideal de los tratamientos de inmunoterapia (Inogés et al., 2004; Rodríguez-Calvillo et al., 2004).

#### Inmunoterapia pasiva

- **Inmunoterapia celular adoptiva**

Consiste en identificar células capaces de reconocer y eliminar las células tumorales para poder generarlas y expandirlas *in vitro* a gran escala. En los años 80, la atención se centró en las células LAK (*Lymphokine Activated Killer*) generadas a partir de linfocitos T no purificados, obtenidos de sangre periférica o bazo, y cultivados en presencia de células tumorales del paciente e IL-2 recombinante (rIL-2) durante 3 ó 4 días. De este modo, sólo se induce proliferación de las células que previamente han sido activadas por antígeno. Las células que se obtienen son no T, no B, no NK. La mayor parte de ellas se generan a partir de células NK y al carecer de receptor de células T, la eliminación de células tumorales se hace sin restricción MHC. El principal inconveniente de este tipo de tratamiento es la severa toxicidad que puede derivarse del tratamiento continuado con IL-2 recombinante (Inogés et al., 2004).

- **Anticuerpos monoclonales.**

Hace 20 años se usó por primera vez un anticuerpo monoclonal (CD20) en el tratamiento de linfomas de células B de bajo grado. En este momento, el objetivo es buscar nuevas dianas, CD22, CD52, CD40, etc, contra las que se pueda dirigir la respuesta, así como explorar estrategias que conduzcan a una mayor eficacia,

como el uso de anticuerpos radiomarcados o conjugados con fármacos o toxinas naturales. También se está estudiando el desarrollo de anticuerpos bioespecíficos que reconozcan por una parte a la célula tumoral, y por otra, a la célula efectora citotóxica, originándose una respuesta más específica hacia el tumor (Inogés et al., 2004).

### Inmunoterapia activa

Ofrece un gran número de alternativas, desde las primeras vacunas hasta las de segunda generación. A diferencia de las vacunas en enfermedades infecciosas, dirigidas contra un antígeno bien conocido, altamente inmunogénico y con un fin preventivo, las vacunas en neoplasias hematológicas se dirigen contra un antígeno que no siempre es conocido, débilmente inmunogénico y la primera intención es terapéutica, no preventiva.

- **Vacunas de células enteras.**

Útiles cuando no se conocen los antígenos contra los que debe ir dirigida la respuesta. Se usan células tumorales extraídas del paciente, dañadas irreversiblemente por irradiación o lisis, para evitar su propagación cuando se le reinfundan. Estas células no siempre son capaces de inducir una respuesta inmune por lo que pueden combinarse con técnicas de ADN recombinante para potenciar su inmunogenicidad. Una de estas vacunas combina células tumorales del paciente irradiadas con Gvax® (Cell Génesis, células que secretan una citoquina que estimula la respuesta inmune).

- **Vacunas proteicas.**

Hasta el momento, la Ig sintetizada y expresada en células B tumorales es el único antígeno completo tumor-específico (AET) conocido (Rodríguez-Calvillo et al., 2004). Mediante vacunas que incluyan la formulación del idiotipo (Id) de la Ig, denominadas vacunas idiotípicas, se puede inducir una respuesta inmune contra esta región que destruya las células tumorales que llevan la Ig que contiene ese Id, quedando intactas el resto de células B. La primera etapa en la elaboración de estas vacunas es obtener el AET, para ello se ha venido utilizando la técnica del hibridoma. La suspensión celular que se obtiene de una muestra del ganglio linfático del paciente se fusiona con una línea celular procedente de un hetero-hibridoma murino / humano (K6H6/B5), de forma que el hibridoma resultante es

capaz de secretar al medio la Ig. Como la suspensión celular de partida contenía linfocitos B normales que “contaminaban la pureza” del clon tumoral, de todos los hibridomas, habrá que seleccionar aquellos que produzcan la misma Ig que el clon tumoral mediante secuenciación y alineación del CDR3 de la cadena pesada de la Ig. El hibridoma seleccionado se cultiva a gran escala hasta obtener el sobrenadante de cultivo necesario para purificar la cantidad deseada del Id tumoral. Para que el Id se transforme en algo más inmunogénico se conjuga con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) un transportador altamente inmunogénico (Inogés et al., 2004).

- **Vacunas de células dendríticas.**

El transporte de los antígenos por las células dendríticas es clave en el inicio de la respuesta inmune, lo que las hace atractivas para mejorar la eficacia de las vacunas idiotípicas. Para ello, se pulsan células dendríticas autólogas con el Id tumoral (purificado como se describe en el apartado anterior) y luego se reinfunden en el paciente. Esta vacuna induce una respuesta inmune mediada por células T, pero no respuesta humoral. Si se quieren generar los dos tipos de respuestas se puede hacer una administración secuencial de células dendríticas pulsadas con el Id y posteriormente Id en forma de proteína soluble (Inogés et al., 2004). Un ejemplo de vacuna de células dendríticas es Mylovenge® (APC8020i, Dendreon). Hasta ahora los resultados en ensayos clínicos con estas vacunas son muy prometedores, aunque es necesario mejorar la técnica.

- **Vacunas de ADN.**

Las vacunas de ADN desnudo son uno de los tipos más recientes de vacunas. Consisten en ADN bacteriano circular en el que se insertan los genes que codifican la proteína tumoral. El ADN bacteriano contiene secuencias que no están presentes en células de mamíferos y que es capaz de activar al sistema inmune innato. Cuando este tipo de vacunas es inyectado a nivel intramuscular o subcutáneo, se transfectan las células del huésped (musculares, queratinocitos o fibroblastos) creando una zona de expresión ectópica de la proteína. La proteína liberada por la célula diana es captada por las células presentadoras locales, que la procesan adecuadamente y la presentan al sistema inmune en los órganos linfoides secundarios.

Estas vacunas tienen un débil potencial inmunogénico, por lo que se está pensando en incluir en el plásmido genes que codifiquen inmunomoduladores o citoquinas que aumenten la inmunidad natural frente al tumor (Inogés et al., 2004).

#### **2.3.7.11.-Otras nuevas terapias.**

Muchas otras terapias se están evaluando en el laboratorio, en estudios animales o en las primeras fases de ensayos clínicos. Destacar:

<b>Nombre</b>	<b>Compañía</b>	<b>Descripción</b>
<b>17-AAG</b>	Kosan Biosciences Inc	Inhibidor de la proteína de choque térmico (Hsp-90).
<b>ADW</b>	Novartis	Inhibidor del receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF).
<b>ENMD 0995</b>	Entremed/Celgene	Análogo de la Talidomida.
<b>Inhibidores de (LPAAT)-<math>\beta</math></b>	Cell Therapeutics Inc	
<b>PKT-787/ZK222584</b>	Novartis	Inhibidor tirosin kinasa del receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR)
<b>TRAIL</b>	Genentech/Amgen	Mensajero mortal. Induce apoptosis en las células que expresan sus receptores mortales.



### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**



### **3.1.- MATERIALES.**

#### **3.1.1.- Productos para cultivos celulares.**

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo, RPMI 1640 y DMEM (Dulbeccos MEM), procedieron ambos de Gibco™, Invitrogen Corporation (Barcelona, España). Los medios se suplementaron al 10 % con suero fetal bovino (SFB), también de Gibco™, y se complementaron con L-glutamina y Antibiótico (Penicilina y Estreptomina) procedentes de Sigma (Madrid, España). Los frascos de cultivo empleados, así como el resto del material de plástico estéril (placas de 6, 12, 24 y 96 pocillos, tubos falcon, placas Petri, pipetas, etc.) procedieron de TPP (Suiza). Los tubos criogénicos utilizados para la congelación de células se obtuvieron de Nunc (Dinamarca) y el dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al medio de congelación procedió de Sigma (Madrid, España). Los filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Acrodisc) utilizados para la esterilización de soluciones fueron de Pall Corporation (USA). El azul Trypan, la albúmina sérica bovina (BSA) esencialmente libre de ácidos grasos y la tripsina procedieron de Sigma (Madrid, España). El Ficoll-Paque™ Plus se obtuvo de Amersham Biosciences (Upsala, Suecia) y la interleuquina-6 (IL-6) de PeproTech EC Ltd (London, UK).

#### **3.1.2.- Fármacos anti-tumorales.**

El inhibidor de farnesiltransferasas (FTI) BMS-214662, una tetrahydrobenzodiazepina que contiene un grupo imidazol, fue amablemente proporcionado por Bristol-Myers Squibb Co. (Stamford, CT). Apo2L/TRAIL.0, una versión recombinante de Apo2L/TRAIL que carece de las colas exógenas (residuos 114-281), fue amablemente proporcionado por Genentech (CA, USA). El INF-α Recombinante Humano (actividad específica  $1,8 \times 10^8$  U/mg) se obtuvo de PeproTech EC Ltd (London, UK). El inhibidor del proteosoma Velcade® (Bortezomib, PS-341) fue amablemente proporcionado por Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, Massachusetts). El melfalán y la sal sódica de ácido valproico (VPA) fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España).

### 3.1.3.- Productos para estudios de citotoxicidad.

El bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT), la *p*-fenilendiamina (PPDA), la poli-L-lisina, el glutatión (GSH), la cicloheximida (CHX) y el agente de unión al colesterol metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) fueron proporcionadas por Sigma (Madrid, España) y el colorante Hoechst 33342 por Molecular Probes (Leyden, Holanda). Los péptidos inhibidores de proteasas benciloxycarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona (Z-DEVD-fmk), benciloxycarbonil-Leu-Glu-His-Asp-fluorometilcetona (Z-LEHD-fmk), benciloxycarbonil-Val-Glu-Ile-Asp-fluorometilcetona (Z-VEID-fmk) y benciloxycarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp-fluorometilcetona (Z-IETD-fmk) procedieron de BD Pharmingen (Madrid, Spain). El benciloxycarbonil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (Z-VAD-fmk) fue de Bachem (Bubendorf, Suiza) y el benciloxycarbonil-Val-Asp-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (Z-VDVAD-fmk) de Calbiochem (Madrid, España). La wortmanina y el LY294002 (inhibidores de la PI3-quinasa), la rapamicina (inhibidor de la quinasa mTOR), el SB203580 (inhibidor de la p38 MAPK), el PD98059 (inhibidor de ERK/MAPK), el inhibidor de la quinasa Jak1 y el mimetizante de la superóxido dismutasa MnTBAP, también fueron proporcionados por Calbiochem. El anticuerpo monoclonal bloqueante de Apo2L/TRAIL (5C2) se obtuvo de Genentech (CA, USA), el anticuerpo monoclonal bloqueante de Fas (SM1/23) fue de Bender (Barcelona, España), el anticuerpo monoclonal bloqueante de Apo3L/TWEAK (Fn14/Fc) de e-Biosciences (bionova científica, Madrid) y las quimeras DR4-Fc (que bloquea TRAIL-R1) y DR5-Fc (que bloquea TRAIL-R2) de R&D Systems (Vitro, Madrid). El anticuerpo citotóxico anti-Fas (clon H11) fue proporcionado por Upstate Biotechnology (Lake Placid, New York).

### 3.1.4.- Productos para el análisis de proteínas.

#### 3.1.4.1.- Productos para la extracción de proteínas.

En la obtención de extractos celulares totales de proteínas y de fracciones subcelulares se utilizaron los siguientes productos: Tritón X-100, Tris/HCl, sacarosa, EDTA, ortovanadato sódico (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) pirofosfato sódico (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), fluoruro de sodio (NaF), leupeptina, pepstatina, aprotinina, benzamidina, 2- $\beta$ -mercaptoetanol, digitonina, DTT y azul de bromofenol todos ellos proporcionados por Sigma (Madrid, España).

También se usaron cloruro de sodio (NaCl) y dodecilsulfato de sodio (SDS) que se obtuvieron de Merck, y glicerol proporcionado por Scharlau.

#### **3.1.4.2- Productos para electroforesis de proteínas y transferencia a membranas.**

En la electroforesis de proteínas se emplearon los siguientes productos: acrilamida monómero, N,N'-metilen-bis-acrilamida (bisacrilamida) y el persulfato amónico procedentes de Serva (Heilderberg, Alemania). N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y rojo Ponceau procedentes de Sigma (Madrid, España) y marcadores de pesos moleculares (Rainbow MW markers) suministrados por Amersham Life Sciences. En la transferencia de proteínas a membranas se utilizaron: membranas de nitrocelulosa (Hybond C-extra) proporcionadas por Amersham (Barcelona), metanol (grado HPLC) procedente de Panreac y glicina y Tween-20 obtenidos de Sigma (Madrid, España).

### 3.1.5.- Anticuerpos y reactivos inmunoquímicos.

#### 3.1.5.1.- Anticuerpos y reactivos utilizados en inmuno-transferencia (Western blotting).

Las siguientes tablas contienen la información referente a los anticuerpos primarios empleados (pc,policlonal; mc, monoclonal) :

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie origen Isotipo</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Caspasa 2</b>	pc,conejo	1	Sta Cruz Biotech sc-625
<b>Caspasa 3 (1) (proenzima)</b>	mc, ratón clon 19,IgG2a	0,5	BD Transduction Laboratories
<b>Caspasa 3 (2) (forma activa)</b>	pc, conejo	1	BD Pharmingen N° Cat. 557035
<b>Caspasa 8</b>	mc, ratón clon 5F7, IgG	1	Upstate Cat.#05-477
<b>Caspasa 9</b>	mc, ratón clon 5B4, IgG	1	Medical and Biological Laboratories (MBL)
<b>p53</b>	mc, ratón clon DO-1, IgG2a	0,5	BD Pharmingen N° Cat.554293
<b><math>\beta</math>-actina</b>	mc, ratón clon AG-15, IgG1	0,3	Sigma
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	mc, ratón clon B51-2, IgG1	2,5	Sigma
<b>Bcl-2</b>	pc,conejo	0,2	Sta Cruz Biotech sc-783
<b>Bcl-XL</b>	pc,conejo	0,4	Sta Cruz Biotech sc-1041
<b>Mcl-1</b>	pc,conejo	0,2	Sta Cruz Biotech sc-819
<b>Bax</b>	pc, conejo	1	BD Pharmingen N° Cat. 554104
<b>Bak</b>	pc,conejo	2	Upstate Cat.#06-536

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie de origen Isotipo</b>	<b>Concentración (µg/ml)</b>	<b>Proveedor</b>
<b>Bid</b>	pc, cabra	1	R&DSystems AF860
<b>Bik</b>	pc, cabra	0,2	Sta Cruz Biotech sc-1710
<b>Bim</b>	pc, conejo	0,1	Calbiochem Nº Cat.202000
<b>Bad</b>	mc, ratón	0,5	BD Transduction Laboratories
<b>PUMA</b>	pc, conejo	1	Abcam ab9643
<b>HDJ2 (DNAJ)</b>	mc, ratón	0,4	Neomarkers KA2A5.6
<b>Rab5B</b>	pc, conejo	1	Sta Cruz Biotech sc-598
<b>RhoB</b>	pc, conejo	1	Sta Cruz Biotech
<b>Lamina A</b>	pc, conejo	0,1	Cell Signaling #2032
<b>Flip</b>	mc, rata	2	Alexis Biochemicals ALX 804127
<b>hILP-XIAP</b>	mc, mouse IgG1	0,5	BD Transduction Laboratories
<b>FADD</b>	mc, mouse IgG1	1	BD Transduction Laboratories
<b>COX (sub I)</b>	mc, ratón clon 1D6, IgG2ak	1	Molecular Probes
<b>Citocromo C</b>	mc, ratón clon 7H8-2C12, IgG2b	2,5	BD Pharmingen

Los anticuerpos secundarios dirigidos contra las IgGs de ratón, cabra, conejo o rata, marcados con fosfatasa alcalina, así como los reactivos BCIP (bromo-4-cloro-indolil-fosfato de p-toluidina) y NBT (nitroazul de tetrazolio) procedieron de Sigma (Madrid, España). El disolvente de estos reactivos, N,N' dimetil formamida, se obtuvo de Scharlau.

### 3.1.5.2.- Anticuerpos y reactivos utilizados en citometría de flujo.

La siguiente tabla contiene la información referente a los anticuerpos usados:

Anticuerpo	Especie de origen clon, isotipo	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Proveedor
<b>Bax</b>	mc, ratón clon 6A7, IgG1	5	BD Pharmingen N°Cat.556467
<b>Bak</b>	mc, ratón clon TC100, IgG2	2,5	Calbiochem
<b>Citocromo c</b>	mc, ratón clon 6H2B4	1	BD Pharmingen
<b>IFNR2</b>	mc, ratón	1	Calbiochem N° Cat. 407295
<b>APO-1/Fas-FITC</b>	mc, ratón clon SM1/23	0,1	Bender MedSystems N° Cat. BMS 140FI
<b>DR4-PE (TRAIL-R1)</b>	mc, ratón clon DJR1, IgG1	0,1	e-Biosciences
<b>DR5-PE (TRAIL-R2)</b>	mc, ratón clon DJR2-4, IgG1	0,1	e-Biosciences
<b>DcR1-PE (TRAIL-R3)</b>	mc, ratón clon DJR3, IgG1	0,1	e-Biosciences
<b>DcR2-PE (TRAIL-R4)</b>	mc, ratón clon DJR4-1, IgG1	0,1	e-Biosciences
<b>APO2L/TRAIL (5C2)</b>	mc, ratón	0,1	Genentech

Los anticuerpos secundarios dirigidos contra las IgGs de ratón, marcados con FITC o PE, se emplearon en caso de no estar marcado el anticuerpo primario y procedieron de Sigma.

Para la caracterización de los pacientes de mieloma múltiple se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales,  $\alpha$ -CD19-PE (clon HIB19, IgG<sub>1</sub>, $\kappa$ ),  $\alpha$ -CD38-FITC y  $\alpha$ -CD38-Pc5 (clon HI72, IgG<sub>1</sub>, $\kappa$ ),  $\alpha$ -CD45-PE y  $\alpha$ -CD45-Pc5 (clon HI30, IgG<sub>1</sub>, $\kappa$ ),  $\alpha$ -CD56-PE (clon BI59, IgG<sub>1</sub>, $\kappa$ ) y  $\alpha$ -CD138-FITC (clon MI15, IgG<sub>1</sub>, $\kappa$ ) todos ellos de BD Pharmingen.



La Anexina V marcada con fluoresceína (Anexina-FITC) o con ficoeritrina (Anexina-PE) procedió de Caltag (Barcelona, España) y el ioduro de propidio (PI) de Bender Medsystems (Alemania). La sonda fluorescente Ioduro de 3,3'-dihexiloxa carbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3)), y los compuestos Dihidroxietidio (DHE) y 5-(γ-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato acetil éster (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, DCFDA), usados en el análisis de la generación de especies oxigenadas reactivas (ROS, formas radicales del oxígeno), procedieron de Molecular Probes (Leyden, Holanda).

### 3.1.5.3.- Anticuerpos y reactivos utilizados en microscopía confocal de fluorescencia.

La siguiente tabla contiene la información referente a los reactivos empleados:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie de origen clon, isotipo</b>	<b>Concentración (µg/ml)</b>	<b>Proveedor</b>
<b>AIF</b>	pc, conejo	1/200	Dr. Susín. (Instituto Pasteur, París, Francia)
<b>DR4 (TRAIL-R1)</b>	mc, ratón	1	Alexis Biochemicals (HS101)
<b>Subunidad B de la toxina del cólera (CTxB)</b>		1	Molecular Probes

En la inmunolocalización de AIF, se empleó como secundario un anticuerpo dirigido contra IgGs de conejo y marcado con FITC. En el caso de DR4 (TRAIL-R1) se usó un anticuerpo dirigido contra IgGs de ratón y marcado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (Abs/Em\* 495/519). La subunidad B de la toxina del cólera estaba directamente marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 555 (Abs/Em\* 555/565).

### **3.1.6.- Productos para técnicas de biología molecular.**

#### **3.1.6.1.- Productos para cultivos bacterianos.**

Se usaron bacterias competentes *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$  preparadas en el laboratorio. La triptona y el extracto de levadura se obtuvieron de Panreac, el NaCl de Merck y el agar-agar de Sigma. El antibiótico de selección (Ampicilina) procedió de Roche y las placas Petri de TPP (Suiza).

#### **3.1.6.2.- Productos para el aislamiento y análisis de ADN e ingeniería genética.**

Para extraer el ADN a partir de los cultivos bacterianos se emplearon el Kit *CONCERT Rapid Plasmid Miniprep System 250 Reactions* de Gibco BRL (Barcelona, España) para minipreps y el Kit *Jet Star Plasmid Purification Maxi Kit/20* de Genomed para extracciones a mayor escala. La agarosa utilizada para la elaboración de geles fue proporcionada por Scharlau, el bromuro de etidio por Fluka (España) y el marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder por Promega.

Para purificar bandas de ADN a partir de geles de agarosa se empleó el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* de Amersham Biosciences (USA). El Loading Buffer 10x y las enzimas de restricción HindIII y EcoRI fueron obtenidas de Takara, el buffer Y+/TANGO y las enzimas BamHI, XhoI, y la T4 DNA ligasa de Fermentas (España). La enzima fosfatasa alcalina procedió de Calbiochem.

#### **3.1.6.3.- Productos para la obtención de la construcción pLZR-IRES-GFP-mcl-1.**

Para la amplificación del gen mcl-1 e inserción de nuevos extremos de restricción, el ADN empleado como molde fue el plásmido pcDNA3.0-mcl-1, con el gen mcl-1 clonado entre sitios de restricción HindIII y BamHI. Este vector fue amablemente proporcionado por el Dr. Víctor Yuste (Instituto Pasteur, París, Francia). Los oligos de PCR empleados fueron sintetizados específicamente por encargo a Isogen Bioscience. Los dNTPs fueron proporcionados por Invitrogen y la TaqDNA polimerasa y su tampón correspondiente procedieron de Gibco-BRL. El vector pGEM-T Easy Vector fue obtenido de Promega y los productos X-Gal e IPTG de Q-Biogene.

### 3.1.7.- Reactivos usados en las infecciones retrovirales.

El NaCl, CaCl<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se obtuvieron de Merck. El Hepes, la cloroquina y el Polybrene® de Sigma (Madrid, España). Las jeringuillas fueron proporcionadas por Terumo (Bélgica) y los filtros de 0,22 µm (Acrodisc) por Pall Corporation (USA).

La línea celular 293T y los vectores plasmídicos pLZR-IRES-GFP, pMDG-VSV, pNVUL-MLV-gag-pol fueron amablemente proporcionados por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca).

### 3.1.8.- Reactivos usados en transfecciones con Nucleofector®.

El electroporador (Nucleofector®) y el kit de transfección empleado, *Cell Line Nucleofector® Kit R*, fueron proporcionados por amaxa biosystems (USA). Los oligos, siRNA Bim (5'-GAC CGA GAA GGU AGA CAA UUG-3'), siRNA PUMA (5'-AAA GAC AGG AAU CCA CGG CUU-3'), y siRNA no silenciador (5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3'), fueron sintetizadas por Dharmacon (Lafayette, USA).

## **3.2.- MÉTODOS.**

### **3.2.1- Cultivos celulares.**

#### **3.2.1.1.- Líneas celulares establecidas.**

Las líneas celulares que se han utilizado en este trabajo han sido: las líneas de mieloma múltiple humano (RPMI 8226, NCI-H929, U266 (clon B1) y MM.1S), la leucemia de tipo B IM-9, obtenida a partir de la sangre periférica de un paciente con mieloma, y una línea celular derivada de RPMI 8226 con alta capacidad de proliferación (RPMI 8226/hp a partir de ahora). La línea original RPMI 8226 fue amablemente proporcionada por la Dra. Martine Amiot (INSERM U463, Nantes, France), las células MM.1S, por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España) y las líneas NCI-H929, U266, IM-9 y RPMI 8226/hp por el Dr. Antonio Campos Caro (Hospital Puerta del Mar, Cádiz, España).

#### **3.2.1.2.- Sublíneas celulares derivadas.**

Durante el desarrollo del presente trabajo se han obtenido, por medio de infecciones retrovirales, sublíneas celulares derivadas de la línea U266, U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 a partir de ahora, que contienen una o varias integraciones cromosómicas de un constructo vírico (pLZR-IRES-GFP o pLZR-IRES-GFP-mcl-1 respectivamente) (Abad et al., 2002).

#### **3.2.1.3.- Medios de cultivo.**

Todas las líneas anteriores se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycinina, 100 µg/ml). Este medio se denominará, en adelante, medio completo. La L-glutamina se añadió cada 20 días, a partir de una solución stock 200 mM en agua destilada de calidad MilliQ (Millipore, Barcelona), apta para cultivo, que se guardó congelada a -20 °C en alícuotas estériles de 5 ml.

#### **3.2.1.4- Mantenimiento de los cultivos celulares.**

Todas las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 ó 75cm<sup>2</sup> con tapón con filtro. En los frascos de 25 cm<sup>2</sup> se realizaron cultivos de células en suspensión en un volumen de 10 a 15 ml y en los de 75 cm<sup>2</sup>, de 20 a 40 ml.

Las células RPMI 8226, RPMI 8226/hp, NCI-H929 e IM-9 se sembraron a una densidad de  $15 \times 10^4$  cél/ml. Las células U266, U266-pLZR, U266-pLZR-Mcl-1 y MM.1S se sembraron a una densidad mínima de  $30 \times 10^4$  cél/ml. Se cultivaron en un incubador termostatzado (Heraeus Cell, Alemania), a 37 ° C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>. A los 3 ó 4 días de cultivo, alcanzadas densidades entre  $8-12 \times 10^5$  cél /ml, se realizó el pase de los cultivos. Para ello, se determinó el número de células y su viabilidad (en azul trypan) con ayuda de un hemocitómetro o cámara Neubauer al microscopio óptico (Optiphot, Nikon).

Todas las manipulaciones con las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar, España) y en condiciones estériles. El material usado, de vidrio y plástico, se esterilizó previamente en un autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta, España) durante 20-30 minutos a 1,2 atm de presión y las disoluciones añadidas a los cultivos se esterilizaron usando filtros de 0,22 µm (Acrodisc) de Pall Corporation (USA).

#### **3.2.1.5.- Congelación y descongelación de las líneas celulares.**

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido a -196 °C. Para ello,  $6 \times 10^6$  células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de medio completo con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se transvasó la suspensión a un criotubo de congelación (Nunc) estéril. Los viales se introdujeron rápidamente dentro de unas gradillas de poliestireno expandido en un congelador a -80°C, durante al menos 24 h. Pasado este tiempo, se pudieron depositar en el interior de un contenedor de nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su utilización.

Para la descongelación de las células, los criotubos se dejaron atemperar en la campana y se les añadió 1 ml de medio completo atemperado. Conforme se inició la descongelación de las células, se decantó el contenido de cada vial sobre 10 ml de medio RPMI completo, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 5-8 ml de medio completo. Posteriormente, y ya recuperadas

las células del proceso de descongelación, se establecieron cultivos celulares a las densidades normales de sembrado.

### **3.2.1.6.- Contaje y determinación de la viabilidad celular.**

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el contaje con azul trypan. Las células muertas, que han perdido la integridad de su membrana, son permeables a este colorante y adquieren una tonalidad azulada, mientras que las células vivas o apoptóticas, que todavía mantienen su membrana plásmica íntegra, no se tiñen. Para el contaje se mezclaron 50  $\mu$ l de suspensión celular, previamente homogeneizada, y 50  $\mu$ l de una solución estéril de azul trypan al 0,4% en NaCl 0,15M. La mezcla se depositó sobre un hemocitómetro o cámara Neubauer y se observó al microscopio óptico (Optiphot, Nikon). Para determinar la densidad celular se contaron un número de cuadrantes completos de la cámara tal que se obtuvieran como mínimo 100 células totales (viables y no viables). La densidad celular se calculó como el número de células viables dividido del número de cuadrantes contados y multiplicado por la dilución de la suspensión celular y  $10^4$  (ajuste del tamaño de la cámara). La viabilidad celular se evaluó considerando el número de células no coloreadas (viables) respecto al número de células totales y fue siempre superior al 90%.

### **3.2.1.7.- Medida de la proliferación celular.**

Para evaluar la proliferación celular de las diversas líneas, tras ser sometidas a diferentes tratamientos con drogas citotóxicas, se utilizó el método de Mossman modificado por Alley (Alley et al.,1988). Este método relaciona el número de células viables presentes en los cultivos con la cantidad de cristales de azul formazán, insolubles en medio acuoso, producidos por oxidación del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT). Para estimar dicha proliferación, las células se cultivaron a densidades de  $3-5 \times 10^5$  cél/ml en placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano, con un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo, y al menos 4 pocillos por punto experimental, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de droga citotóxica. El cultivo se incubó en la estufa entre 24-48h dependiendo de la cinética de la droga a analizar, y transcurrido este tiempo se añadieron a cada pocillo 10  $\mu$ l de una disolución estéril de MTT (5 mg/ml), preparada en suero fisiológico (PBS: NaCl 0,15M, fosfato potásico 0,01M, pH 7,4). Las placas se incubaron en presencia de MTT durante 2-3 horas y se

centrifugaron durante 20 min, a 3500 rpm. Se eliminó el sobrenadante de los pocillos por inversión rápida y enérgica de la placa sobre papel de filtro (flik). Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo a cada pocillo 100 µl de DMSO y agitando en una placa vibradora (Bioblock, Francia) . Se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (MR5000, Dynatech, USA.) frente a los blancos apropiados (medio de cultivo sometido al mismo procedimiento que los cultivos celulares).

El método del MTT ha sido también utilizado en el presente trabajo como medida indirecta de la muerte celular.

### **3.2.2.-Obtención y análisis de células obtenidas a partir de muestras de médula ósea y/o sangre.**

#### **3.2.2.1.- Obtención de células plasmáticas a partir de aspirados de médula ósea.**

Se obtuvieron células plasmáticas mielomatosas (MMs) a partir de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Las muestras fueron proporcionadas por la Dra. Pilar Giraldo (Serv. Hematología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza). En la mayor parte de los casos se trató de pacientes de nuevo diagnóstico que no habían sido sometidos anteriormente a ningún tratamiento.

La muestra de partida consistió en 1-2 ml de aspirado de médula ósea obtenido por punción en la cresta ilíaca. En gran parte de la muestras existía contaminación con restos de tejido del estroma medular. Por ello, las muestras se diluyeron con 2-3 ml de medio RPMI completo y esta mezcla se añadió sobre 5 ml de Ficoll-Paque. La adición se realizó de forma lenta, sobretodo al principio, para favorecer la formación de una clara interfase. Se centrifugaron los tubos a 1400 rpm y sin freno durante 20 min. Se eliminó con pipeta Pasteur la fase superior (plasma) y se transvasó la interfase o anillo de células mononucleadas (linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células plasmáticas normales y mielomatosas, células del estroma de la médula, etc.) con ayuda de otra pipeta Pasteur a un tubo en el que previamente se habían depositado 10 ml de medio RPMI completo. Se centrifugaron a 1200 rpm 5 min a t.a., se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 3-5 ml y se observaron al microscopio óptico (Optiphot, Nikon). Determinada la viabilidad y la densidad celular una parte de las células se reservaron para realizar el inmunofenotipo (apartado 3.2.2.2.) y el resto se

sembraron a densidad de  $5 \times 10^6$  cél/ml en medio completo para evaluar su sensibilidad a diferentes drogas citotóxicas. Para asegurar la mejor supervivencia *in vitro* de las células mielomatosas, además de las altas densidades de sembrado, también se les añadió 1000 U/ml de interleuquina-6 (IL-6), una citoquina muy importante en la progresión del MM como ya se ha comentado (apartado 2.3.3.4.).

### 3.2.2.2.- Inmunofenotipado y marcaje de células plasmáticas.

Una característica importante de las células de MM es su heterogeneidad, sobretodo en el patrón de marcadores de membrana. Estos marcadores son muy útiles para distinguir células mielomatosas (MMs) de células plasmáticas normales (PCs) y de linfocitos sanos, presentes en la población heterogénea obtenida con el método anterior. La distinción de las diferentes poblaciones es importante para evaluar si el fármaco analizado es tóxico sólo para MMs o si también lo es para otros tipos de células normales de la médula ósea.

Para realizar el inmunofenotipado, se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células de la población heterogénea, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS con un 0,2% de albúmina bovina y se añadieron las siguientes mezclas de anticuerpos:

- mezcla A: 4  $\mu$ l CD-138-FITC/ 4  $\mu$ l CD-19-PE/ 4  $\mu$ l CD-38-Pc5
- mezcla B: 4  $\mu$ l CD-38-FITC/ 4  $\mu$ l CD-56-PE/ 4  $\mu$ l CD-45-Pc5

Se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad, se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo usando un protocolo de 3 colores específicamente diseñado para este fin.

Para evaluar la toxicidad de los fármacos sobre las diferentes poblaciones medulares mediante la translocación de fosfatidilserina (PS), se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células de la población heterogénea por punto, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS con un 0,2% de albúmina bovina y se les añadió: 4  $\mu$ l CD-38-Pc5 y 4  $\mu$ l de CD45-PE y se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad. Las células ya marcadas, se centrifugaron y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de ABB (*Annexing binding Buffer*) (apartado 3.2.6.3.) a los que se añadieron 2,5  $\mu$ l de anexina-V-FITC. Se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad, se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro.



En algunos casos se determinó la caída del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (apartado 3.2.6.3.). Para ello, las células marcadas con CD-38-Pc5 y CD-45-PE se centrifugaron y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de una dilución 2 nM de DiOC<sub>6</sub>(3) en PBS. Se incubaron 10 min a 37°C, se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo. En ambos casos volvió a emplearse el protocolo de tres colores antes mencionado.

### **3.2.2.3.- Obtención de monocitos a partir de sangre periférica.**

Los monocitos de sangre periférica se obtuvieron a partir de sangre de donantes normales. La muestra (500 ml en bolsa heparinizada) procedió del banco de sangre del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Se tomaron 25 ml de sangre por punto y se depositaron en un falcon de fondo cónico sobre 20 ml de Ficoll Paque. Los tubos se centrifugaron 20 min a 1400 rpm y sin freno. Se eliminó con pipeta Pasteur la fase superior (plasma) y se transvasó la interfase o anillo de células mononucleadas (linfocitos T, linfocitos B y monocitos) a un tubo en el que previamente se habían depositado 10 ml de medio RPMI completo. Se centrifugaron a 1200 rpm 5 min a t.a., se eliminó el sobrenadante y se cultivaron a densidad de  $1 \times 10^6$  cél/ml en medio RPMI completo (10% SFB) a 37°C durante 2 h, de modo que los monocitos se adhirieran a las paredes del bote de cultivo. Se eliminó el medio del cultivo, eliminándose así los linfocitos T y B, y se lavó vigorosamente con medio completo para asegurar que sólo los monocitos quedaran adheridos. Posteriormente, se añadió medio RPMI completo y las drogas citotóxicas y se mantuvieron en cultivo 48 h como máximo.

### **3.2.3.- Análisis de proteínas.**

#### **3.2.3.1.- Extracción y fraccionamiento de lisados celulares totales con detergentes.**

Tras someter las células a diversos tratamientos, se recogieron  $5 \times 10^6$  células en tubos Falcon y se centrifugaron 5 min a 1200 rpm. Se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron con 1 ml de PBS y se transfirieron a tubos eppendorff.

Se añadió 100 µl de *tampón de lisis* que contenía: Tritón X-100 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, Tris/HCl 50 mM pH 7,6, glicerol 10% (v/v), EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, leupeptina 10 µg/ml, NaF 10 mM y PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetil sulfonilo) y se incubaron 30 min a 4°C en baño de hielo. Los tubos se centrifugaron 10 min a 10.000 rpm (Microfuga, Beckman Coulter) a 4°C y se recuperó el sobrenadante, descartándose la fracción insoluble. Sobre dicho sobrenadante se añadieron 50 µl de un *tampón de carga* concentrado 3x, que contenía: Tris/HCl 150 mM pH 7,4, SDS (dodecilsulfato sódico) 3%, molibdato de sodio 0,3 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, NaF 30 mM, glicerol 30% (v/v), β-mercaptoetanol 30% (v/v) y BFB (azul de bromofenol) 0,06% (p/v). Finalmente, los lisados celulares se calentaron a 100°C en un baño seco (Selecta) durante 5 min y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

### **3.2.3.2.- Fraccionamiento subcelular I: fracción citosólica y fracción membranosa.**

Tras el tratamiento con distintas drogas, las células ( $5 \times 10^6$ ) se transfirieron a tubos Falcon y se centrifugaron 5 min a 1200 rpm, se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron con 5 ml de PBS pH 7,4 a 4°C. A partir de este momento todas las manipulaciones se realizaron en hielo y las centrifugaciones a 4°C para conseguir que el fraccionamiento citosólico fuera óptimo y no se produjeran contaminaciones entre la fracción citosólica y la fracción membranosa.

Tras el lavado, se añadieron 80 µl del *tampón de fraccionamiento subcelular I* (sacarosa 250mM, digitonina 0,05%, EDTA 1mM, Tris 25 mM pH 6,8, DTT 1mM e inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina 1µM, benzamidina 0,1 mM y PMSF 0,1 mM)) en hielo y se resuspendió varias veces con la micropipeta. Transcurridos 30 s, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm 3 min a 4°C (Microfuga, Beckman Coulter). Tras esto, por un lado se recuperó el sobrenadante (fracción citosólica) y se trasvaso a un tubo eppendorff, prestando especial atención en no rozar el precipitado (fracción membranosa) y siendo aconsejable no recogerlo todo para evitar la contaminación entre fracciones. A esta fracción se le añadieron 26,6 µl del *tampón de carga concentrado 4x* (Tris/HCl 320 mM pH 6,8, SDS (dodecilsulfato sódico) 8%, glicerol 40% (v/v), y BFB (azul de bromofenol) 0,08% (p/v)). Por otro lado, la fracción membranosa se resuspendió con ayuda de micropipeta y agitación en vortex en 106,6 µl de *tampón de carga 1x* (Tris/HCl 80 mM

pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% (v/v), y BFB 0,02% (p/v)). Finalmente, los lisados celulares obtenidos se hirvieron en un baño seco (Selecta) durante 5 min y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Operando de este modo se pudieron obtener por un lado citosoles celulares (citosol y membranas ligeras como el retículo endoplásmico) y por otro las mitocondrias y el núcleo.

### **3.2.3.3.- Separación de proteínas celulares. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.**

La separación de las proteínas celulares en función de su peso molecular se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (8x8cm) que contenían SDS al 0,1%. El porcentaje de poliacrilamida varió entre el 10 y el 15 %, dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar,. Las electroforesis se realizaron en cubetas de electroforesis de Hoefer miniVE, Amersham Biosciences (San Francisco, CA).

Las muestras de lisados o fraccionamientos celulares se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, se centrifugaron (60 s, 12.000 rpm, Minifuga) y se aplicaron en los pocillos del gel (20-35  $\mu\text{l}$ /pocillo). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 180 V durante 2-3 horas.

### **3.2.3.4.- Transferencia de proteínas a membranas.**

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa según un método previamente descrito (Talanian et al., 1997), utilizando un tampón de transferencia compuesto de: Tris/HCl 48 mM pH 8,3, glicina 39 mM, SDS 0,037% y metanol 20% (v/v) de calidad HPLC. La transferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca de BIO-RAD a 20V y 400mA, durante 55 min y se verificó tiñendo la membrana con Rojo Ponceau.

### **3.2.3.5.- Análisis de proteínas por inmunotransferencia (Western blotting) y detección de los inmunocomplejos.**

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de nitrocelulosa se analizaron con la ayuda de anticuerpos específicos, y los pesos moleculares relativos

de las proteínas detectadas, se calcularon en relación a los marcadores de pesos moleculares estándar coloreados (7 $\mu$ l/pocillo) Full Range Rainbow (Amersham, LIFE SCIENCE).

Tras la tinción con Rojo Ponceau, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en PBS, durante 1 h a t.a. o toda la noche a 4°C. Una vez bloqueada, se lavó 3 veces durante 5 min con una solución de lavado que contenía: NaCl 0,12 M, Tris/HCl 10 mM pH 8,0, Tween-20 0,1% (p/v) en PBS pH 7,4 (denominada tampón B). Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario específico (diluído en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo) para detectar la proteína deseada. Las diluciones y el tiempo de incubación se determinaron en cada caso dependiendo del anticuerpo utilizado. Finalizada la incubación, la membrana se lavó abundantemente (3 veces durante 5 min por medio de agitación moderada en tampón B) y se incubó esta vez con un anticuerpo contra IgGs de ratón, conejo, cabra o rata (dependiendo del origen del anticuerpo primario) marcado con fosfatasa alcalina (diluído en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo) durante 1-3 h a t.a. y con agitación suave. La concentración utilizada del segundo anticuerpo fue de 0,2  $\mu$ g/ml en todos los casos. Finalizada la incubación, se retiró la solución de anticuerpo y se lavó la membrana, 3 veces durante 5 min, agitando moderadamente con tampón B.

La detección de los inmunocomplejos se realizó mediante una solución de revelado, preparada en el momento de su utilización, que contenía: 22,5 ml de tampón Tris/HCl 0,2 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 9,6, 2,5 ml de una disolución 1 mg/ml de nitroazul de tetrazolio (NBT) en dimetilformamida (DMF, Scharlau) y 375  $\mu$ l de una disolución 4 mg/ml de bromo-4-cloro-indolil-fosfato (BCIP) en dimetilformamida. Las soluciones de BCIP y NBT se guardaron en oscuridad a -20°C.

La reacción de revelado se detuvo lavando la membrana con abundante agua destilada. Una vez revelada, la membrana se escaneó y se conservó a 4°C durante varios meses. El tiempo de revelado dependió de la cantidad de muestra aplicada y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado, pudiendo oscilar desde 15 min a varias horas. No es conveniente, sin embargo, utilizar un tiempo de revelado muy largo, debido a que conduce a la aparición de coloración inespecífica de fondo.

### **3.2.4.- Análisis de la fragmentación del ADN durante la apoptosis.**

Durante la muerte celular programada se produce una compactación y fragmentación del material nuclear, que puede ser fácilmente detectada usando colorantes que tiñen específicamente la cromatina nuclear. Las células normales se caracterizan por presentar un núcleo compacto y bien definido con una tinción uniforme y difusa, mientras que, en las células que han sufrido apoptosis se observa condensación de la cromatina y fragmentación nuclear.

#### **3.2.4.1.- Tinción con PPDA.**

El reactivo utilizado para la tinción nuclear se preparó a partir de una disolución de p-fenilendiamina (PPDA) (10 mg/ml) en PBS pH 7,4, que se diluyó con glicerol oxidado hasta una concentración final de 1 mg/ml (Vanags et al., 1996). Esta disolución se neutralizó con hidróxido sódico 1M y se irradió durante unas horas con luz UV. Tras un periodo de envejecimiento, mediante exposición a radiación solar, se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegida de la luz. Las tinciones celulares se realizaron utilizando células inmovilizadas sobre cubreobjetos redondos ( $\phi$  13 mm) recubiertos con poli-L-Lisina. Para ello, los cubreobjetos, se lavaron en etanol y se dejaron secar al aire. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de una disolución 0,1% (p/v) de poli-L-Lys en  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, España) sobre una de sus caras y se dejaron reposar durante 20 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró la disolución con una micropipeta y se lavaron los cubres con agua destilada. Una vez secos, se esterilizaron por irradiación con luz UV (254 nm) durante 15 min.

Para realizar el análisis de la fragmentación nuclear, las células ( $5 \times 10^5$ ), tras los diferentes tratamientos, se recogieron en un tubo eppendorf y se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a t.a., se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 1 ml de PBS pH 7,4. Después, las células se fijaron por resuspensión en una solución de paraformaldehído al 1% (v/v) en PBS pH 7,4 e incubación 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se lavaron de nuevo con PBS y se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  del mismo tampón. Se pasaron a una placa de 24 pocillos en la que previamente se habían introducido los cubreobjetos con poli-L-Lys con la cara tratada hacia arriba, de manera que quedase en contacto con la suspensión celular. La placa se centrifugó 5 min a 1200 rpm, se extrajeron los cubreobjetos y se dejaron secar al aire a t. a. durante 10-15 min, cuidando siempre que la cara tratada quedara hacia arriba.

Sobre un porta se añadieron gotitas de la solución de PPDA antes comentada, y los cubres, con la cara tratada hacia abajo se depositaron sobre cada una de ellas. Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia (E600/E400, Nikon) provisto de un equipo de fotografía digital (DXM1200F, Nikon) y se analizaron con los programas de fotografía Nikon ACT-1 y Adobe Photoshop 7.0. Las muestras pueden conservarse a 4° C durante varios meses.

#### **3.2.4.2.- Tinción con Hoechst 33342.**

El reactivo utilizado para la tinción nuclear se preparó a partir de una disolución de Hoechst 33342 (20 mg/ml) que se diluyó con PBS pH 7,4 hasta una concentración final de 20 µg/ml. Esta disolución se guardó a 4°C protegida de la luz. En este caso las tinciones celulares se realizaron sobre células en suspensión.

Tras los correspondientes tratamientos, las células ( $3 \times 10^5$ ) se centrifugaron 5 min a 1200 rpm a t.a. y se resuspendieron en 200 µl de medio RPMI completo que contenía 2 µg/ml de Hoechst 33342. Las células se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad. Finalizada la incubación, se colocaron 15 µl de la suspensión celular sobre un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos (20X20 mm). Finalmente, se observaron con un microscopio de fluorescencia (E600/E400, Nikon) provisto de un equipo de fotografía digital (DXM1200F, Nikon) y se analizaron con los programas de fotografía Nikon ACT-1 y Adobe Photoshop 7.0.

#### **3.2.5.- Inmunolocalización de proteínas por microscopía confocal de fluorescencia.**

Esta técnica se empleó en la inmunolocalización del Factor Inductor de Apoptosis (AIF). Durante el proceso apoptótico la proteína mitocondrial AIF es liberada al citosol y posteriormente se trasloca al núcleo, donde induce la rotura del ADN en fragmentos de alto peso molecular (350-500 kpb).

Las células ( $1-2 \times 10^6$ ) tras los distintos tratamientos, se recogieron, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm, se lavaron con 1 ml de PBS y a continuación se fijaron con 1 ml de una solución de paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS pH 7,4 durante 15 min a t.a. En una placa de 24 pocillos se añadieron cubres de L-poli-Lys (apartado

3.2.4.1) con la cara tratada hacia arriba y sobre ellos las células fijadas. Las placas se centrifugaron 5 min a 1200 rpm para facilitar la adhesión de las células a los cubres. Se eliminó el paraformaldehído de los pocillos por aspiración, y se lavaron con 1 ml de PBS por pocillo. Las células así fijadas en los cubres, se incubaron a continuación con los anticuerpos correspondientes o se mantuvieron a 4 °C (máximo 48 horas) hasta la realización del marcaje. Para realizar el marcaje con anticuerpos, los cubres se sacaron de los pocillos y se lavaron\* con una solución de saponina 0,1% en PBS para seguidamente ser incubados con el anticuerpo primario  $\alpha$ -AIF (dilución 1/200 en saponina 0,1% en PBS con 10% de suero de cabra) durante 30 min a t.a. La incubación se realizó en el interior de una cámara húmeda \*\*, y pasado ese tiempo se lavaron dos veces con saponina 0,1% en PBS (vasos 1 y 2). Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC en las mismas condiciones descritas para el primario, y pasado el tiempo de incubación se lavaron dos veces con saponina 0,1% (vasos 1 y 2), una vez con PBS (vaso 3) y una vez con agua destilada (vaso 4). Tras los lavados, los cubres conteniendo las células marcadas, se montaron con la cara tratada hacia abajo sobre una gota de Mowiol, previamente depositada en un portaobjetos, y se preservaron a 4° C hasta su análisis. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio confocal Zeiss 310, analizadas usando el software LSM 3.95 y finalmente procesadas usando el software Adobe Photoshop 7.0. Las células aisladas fueron observadas en 10 planos de foco sucesivos, separados 0,1  $\mu$ m y ajustados desde la parte inferior a la superior de la célula.

También se empleó la microscopía confocal de fluorescencia para evaluar la aglutinación de receptores DR4 (TRAIL-R1) en balsas lipídicas en algunos tipos celulares, tras el tratamiento con determinados agentes farmacológicos. Este se evaluó estudiando la co-localización de receptores con la subunidad B de la toxina del cólera (CTxB). La toxina del cólera consta de dos subunidades (A y B), la subunidad B carece de toxicidad y su función es permitir a la proteína interaccionar con la membrana celular, ya que esta subunidad liga específicamente cadenas de pentasacáridos de gangliósidos.

---

\* Los lavados se realizaron sujetando el cubre por un extremo con unas pinzas e introduciéndolo en vasos que contenían las soluciones indicadas en cada caso:

1. saponina 0,1% en PBS; 2. saponina 0,1% en PBS; 3. PBS; 4. agua destilada.

\*\* La cámara húmeda consistió en una caja de plástico cerrada con el fondo recubierto con papel de filtro humedecido con agua destilada, sobre el cuál se colocó una capa de parafilm. En este parafilm se depositaron las diluciones de los anticuerpos (50 $\mu$ l/cubre) y sobre éstas los cubres con las células adheridas siempre con la cara tratada hacia abajo.

Para realizar este doble marcaje de membrana, se recogieron  $1 \times 10^6$  células, sometidas o no (controles) a los distintos tratamientos, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm, se lavaron con 1 ml de PBS pH 7,4 y a continuación se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS pH 7,4 con un 5% de suero de cabra. Se añadió el anticuerpo primario  $\alpha$ -DR4 (1  $\mu$ g/ml) y se incubó durante 20 min a t.a. Posteriormente, las células se lavaron con PBS pH 7,4 y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS pH 7,4 con 5% de suero de cabra y dilución 1/1000 del anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488. Se incubaron 20 min a t.a. , se lavaron con PBS y nuevamente se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS pH 7,4 con 5% de suero de cabra, a los que se añadió, esta vez, la subunidad B de la toxina del cólera marcada directamente con Alexa Fluor 555 (dilución 1/1000). Las células se incubaron durante 20 min a t.a y se lavaron con PBS pH 7,4. Las células marcadas se fijaron en 500  $\mu$ l de paraformaldehído al 1% en PBS durante 15 min a 4°C. En una placa de 24 pocillos se añadieron cubres de L-poli-Lys (apartado 3.2.4.1) con la cara tratada hacia arriba, y sobre ellos se añadieron las células fijadas. Las placas se centrifugaron 5 min a 1200 rpm para facilitar la adhesión de las células a los cubres. Se eliminó el paraformaldehído de los pocillos por aspiración y se lavaron con 1 ml de PBS por pocillo. Tras esto, los cubres, conteniendo las células fijadas y marcadas, se montaron con la cara tratada hacia abajo sobre una gota de Mowiol, previamente depositada en un portaobjetos, y se preservaron a 4° C hasta su análisis. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio confocal Leica DMIRE2, analizadas usando el software Leica Confocal y procesadas usando el software Adobe Photoshop 7.0.

### **3.2.6.- Citometría de flujo (FACS).**

Se ha utilizado la citometría de flujo para el estudio de distintos parámetros característicos del proceso apoptótico y para analizar los niveles de expresión de diferentes proteínas, intracelulares y de membrana, en las células.

El análisis de las muestras se realizó en un citómetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter, USA), disponible en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, gracias a la colaboración del Dr. Luis Larrad y la Dra. Pilar Lasierra.



### 3.2.6.1.- Análisis de la expresión de proteínas de membrana.

Para analizar la expresión de los receptores DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DcR1 (TRAIL-R3) y DcR2 (TRAIL-R4) se tomaron  $2 \times 10^5$  células y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS con un 0,2% de albúmina bovina (p/v). Se añadieron 2  $\mu$ l del anticuerpo anti-DR4-PE, anti-DR5-PE, anti-DcR1-PE o anti-DcR2-PE o 0,5  $\mu$ l de anti-IgG-PE inespecíficas y se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad. Tras la incubación, las muestras se diluyeron hasta 500  $\mu$ l con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo.

La expresión de Fas en la membrana plasmática se llevó a cabo incubando  $2 \times 10^5$  células en 50  $\mu$ l de PBS con un 0,2% de albúmina bovina (p/v) y se añadieron 1,5  $\mu$ l de anti-Fas-FITC o 0,5  $\mu$ l de anti-IgG-FITC inespecíficas. Las muestras se incubaron 15 min a t.a. en oscuridad y después se diluyeron hasta 500  $\mu$ l con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo.

El análisis de la expresión del receptor de IFN $\alpha$  se realizó a partir de  $2 \times 10^5$  células que se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS y 50  $\mu$ l de suero humano AB. Se añadieron 0,4  $\mu$ l de anti-IFNRA2 o 0,4  $\mu$ l de anti-IgG inespecíficas sin marcar y se incubaron durante 30 min a t.a. Las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS y 50  $\mu$ l de suero humano AB a los que se añadió 0,4  $\mu$ l de anti-IgG-FITC. Se incubaron 20 min a t.a., se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo.

### 3.2.6.2.- Análisis de proteínas intracelulares.

Para analizar el cambio conformacional de Bax y Bak se tomaron  $1 \times 10^6$  células tratadas o sin tratar (controles) y se lavaron con 1 ml de PBS. Se añadieron 330  $\mu$ l de paraformaldehído al 0,5% en PBS y se incubaron 15 min a 4°C. Tras esto, se lavaron con PBS y, primero se resuspendieron en 95  $\mu$ l de saponina al 0,1% en PBS que se incubó durante 15 min a 4°C, y después se añadieron 5  $\mu$ l de suero de cabra, incubándose 5 min más, esta vez a t.a. Se añadió entonces el anticuerpo primario en función de la proteína a analizar: 5  $\mu$ l de anti-Bak, 1  $\mu$ l de anti-Bax o 1  $\mu$ l de IgGs inespecíficas y se incubó 20 min a t.a. Las células se lavaron 2 veces con 500  $\mu$ l de saponina al 0,03% en PBS y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de saponina al 0,1%-suero de cabra 5% con 0,4  $\mu$ l de anticuerpo anti-IgG-FITC hecho en ratón. Se incubaron 20

min a t.a., se lavaron 2 veces con saponina al 0,03% en PBS y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS pH 7,4. Finalmente, se analizaron en el citómetro de flujo. También es posible preservar las muestras a 4°C durante 20-24h hasta el momento de su análisis en el citómetro.

La liberación de citocromo c durante el proceso apoptótico se analizó mediante citometría de flujo de acuerdo al método descrito por Waterhouse y Trapani (2003).  $1 \times 10^6$  células, tratadas o sin tratar, se permeabilizaron mediante tratamiento con 100  $\mu$ l de digitonina (50  $\mu$ g/ml en PBS 100mM de KCl) durante 5 min a 4°C. Se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 frío y se centrifugaron 3 min a 5500 rpm a 4°C. Se añadieron 100  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% en PBS y se incubaron 20 min a t.a. Se diluyeron a 1ml con PBS pH 7,4, se centrifugaron 3 min a 5500 rpm, esta vez a t.a., se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de bloqueo (albúmina bovina al 3% y saponina al 0,05% en PBS) y se dejaron 1 hora en reposo a t.a. Pasado este tiempo, se añadieron 0,5  $\mu$ l de anticuerpo anti-citocromo c y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 2 veces con PBS pH 7,4 y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de bloqueo, se añadieron 0,5  $\mu$ l de anti-IgG-FITC y se incubaron 1 hora a t.a. en oscuridad. Finalmente, se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron por el citometría de flujo.

Los cambios en los niveles intracelulares de Apo2L/TRAIL en diversas situaciones experimentales se analizaron partiendo de  $5 \times 10^5$  células, que se lavaron con PBS pH 7,4 y se fijaron por resuspensión en 300  $\mu$ l de paraformaldehído al 1% en PBS durante 15 min a 4°C. Tras la fijación, se lavaron con PBS pH 7,4, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de saponina al 0,1% y se mantuvieron 10 min a 4°C. Se añadió 1  $\mu$ l del anticuerpo anti-Apo2L/TRAIL (5C2) o 0,5  $\mu$ l de IgG inespecíficas y se incubaron una hora más a t.a. Se lavaron 2 veces con PBS pH 7,4, se resuspendieron en 50  $\mu$ l de saponina al 0,1% con 0,5  $\mu$ l de anti-IgG-FITC, se incubaron 30 min a t.a y finalmente, se diluyeron hasta 500  $\mu$ l con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo.

### **3.2.6.3.- Determinación simultánea del potencial mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la translocación de fosfatidilserina.**

La exposición de fosfatidilserina (PS) en la semicapa externa de la membrana de las células durante la apoptosis se determinó analizando la unión de anexina V, proteína que liga de forma específica este fosfolípido.

Por otro lado, el potencial de membrana mitocondrial es generado por el gradiente de protones ( $H^+$ ) entre la matriz (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). Las células viables, con mitocondrias energizadas, se caracterizan por tener un potencial de membrana mitocondrial alto y constante (de aproximadamente  $-130$  mV), cuyo valor desciende en las primeras etapas del proceso apoptótico. Para la medida de dicho potencial se utilizó la sonda fluorescente lipofílica  $DiOC_6(3)$  (ioduro de 3,3'-dihexiloxa carbocianina) que está cargada positivamente y se acumula en la matriz. Cuando desciende el valor de dicho potencial, desciende la cantidad de sonda retenida en la matriz y disminuye la fluorescencia. Dado que la medida de ambos parámetros aporta información complementaria, con el fin de reducir el número de muestras y de obtener la máxima información posible de cada una de ellas, se ajustaron las condiciones para realizar doble marcaje anexina-V-PE y  $DiOC_6(3)$ . Ello fue posible ya que no se observó interferencia entre las fluorescencias emitidas por la ficoeritrina ( $\lambda_{abs}=480-565$  nm,  $\lambda_{em}=578$  nm) y la sonda  $DiOC_6(3)$  ( $\lambda_{abs}=485$  nm,  $\lambda_{em}=505$  nm).

Para realizar este doble marcaje, las células a analizar ( $3 \times 10^5$ ) se recogieron en tubos eppendorff y se incubaron en  $200 \mu l$  de una dilución  $2$  nM de la sonda  $DiOC_6(3)$  en un tampón óptimo para el funcionamiento de la anexina (Hepes/NaOH  $10$  mM pH  $7,4$ , NaCl  $140$  mM,  $CaCl_2$   $2,5$  mM) y que llamaremos ABB (*Annexin Binding Buffer*). Las células se incubaron durante  $15$  min a  $37$  °C para permitir la entrada de la sonda a las mitocondrias. Transcurrido este tiempo, se añadieron  $0,5 \mu l$  de anexina V-PE ( $0,1$   $\mu g/ml$ ) y se incubaron  $15$  min a t.a. Finalmente, las muestras se diluyeron con el tampón ABB hasta  $1$  ml y se mantuvieron en oscuridad a t.a. hasta su análisis en el citómetro de flujo.

#### **3.2.6.4.- Análisis de ciclo celular.**

Se recogieron  $1 \times 10^6$  células, tratadas o no, y se lavaron con tampón de ciclo celular ( $1$  mg/ml de glucosa en PBS). Tras el lavado, las células se fijaron con  $1$  ml de etanol al  $70$  % preenfriado en hielo. El etanol se fue añadiendo gota a gota sobre las células, que se iban resuspendiendo en él, suavemente, con la ayuda de un vortex. Las células una vez fijadas, se pueden guardar a  $-20$ °C hasta su utilización, siendo recomendable mantenerlas en estas condiciones al menos  $24$  horas para obtener un mejor marcaje.

Una vez fijadas, las células se centrifugaron 10 min a 3000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 500 µl de tampón de ciclo celular y 0,5 mg/ml de RNasa. Se añadió ioduro de propidio (20 µg/ml) y se incubaron durante 1 hora a t.a. en oscuridad. Finalizada la incubación, las células se analizaron por citometría de flujo. Tras el análisis, se realizaron lavados más abundantes y prolongados del citómetro para eliminar los posibles restos de ioduro de propidio (PI).

### **3.2.6.5.- Análisis de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Durante la exposición de células a diferentes drogas citotóxicas, se producen situaciones de estrés celular y a menudo la generación de pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS). Si la cantidad generada de estos radicales libres es muy elevada, pueden contribuir a actuar como mensajeros en el proceso de la muerte celular (Nakazato et al., 2005).

Para analizar la generación de anión superóxido se utilizó la sonda 2-hidroetidio (DHE). Es una molécula que en presencia de anión superóxido se reduce a etidio y pasa a emitir fluorescencia roja. Para realizar el marcaje, se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl de medio completo que contenía DHE a una concentración de 2 µM y se incubaron 15 min a 37°C. Tras la incubación, las células se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo.

Para analizar la generación de peróxido de hidrógeno, empleamos la sonda 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato-acetiléster (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) y que abreviaremos como DCFDA. Se trata de un compuesto que se reduce en presencia de peróxidos y cuya forma reducida emite fluorescencia verde. Esta sonda es muy inestable en presencia de oxígeno y las alícuotas se deben guardar protegidas de la luz y una vez reconstituidas deben ser utilizadas en el plazo de una semana. Para realizar el marcaje, se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µl de medio completo que contenía DCFDA a concentración de 10 µM. Se incubaron 15 min a 37°C. Tras la incubación, las células se diluyeron hasta 1 ml con PBS, se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de PBS pH 7,4. Finalmente, se analizaron en el citómetro de flujo lo más rápidamente posible dada la inestabilidad del compuesto reducido generado.

### 3.2.7.- Técnicas de biología molecular.

#### 3.2.7.1.- Preparación de medios y cultivos bacterianos.

Todas las manipulaciones con medio autoclavado y con cultivos bacterianos, se realizaron dentro del área estéril creada por la llama de un mechero de alcohol.

Para preparar medio Luria Bertani (LB), se pesaron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Se disolvieron en 1 l de agua destilada, se vertió la disolución en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en un autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Tras atemperarse, las botellas se almacenaron a 4°C.

Para preparar placas de LB-agar, se pesaron 17,5 g de Plate Count Agar (Sigma) y se disolvieron en 1 l de agua destilada. Se vertió la mezcla en botellas de vidrio de 500 ml y se esterilizaron en autoclave (Autestar Mod 4376, Selecta). Enfriadas las botellas, se fundió el LB-agar con ayuda de un microondas y se atemperó colocando la botella bajo el agua del grifo. Una vez atemperado, se le añadió el antibiótico de selección a 100 µg/ml, se homogeneizó por agitación suave y se fue vertiendo sobre placas Petri (50 ml /placa). El medio de las placas se dejó solidificar con estas semiabiertas bajo la llama del mechero durante 1-2 horas, y una vez solidificado, las placas se cerraron, se recogieron y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Para crecer bacterias en medio líquido, se tomó un falcon estéril de 50 ml con 10 ml de LB, se añadió el antibiótico de selección a una concentración de 100 µg/ml, se esterilizó a la llama el asa de cultivo, se tomó una colonia de un cultivo bacteriano en placa con ayuda del asa que se resuspendió en el LB del falcon, rozando con el asa las paredes del tubo para asegurar la correcta resuspensión. La suspensión bacteriana se incubó a 37°C durante 2-5 h en agitador orbital (Selecta) y transcurrido ese tiempo, se vertió sobre un erlenmeyer con 40 ml de LB y antibiótico de selección a 100 µg/ml. El erlenmeyer se cerró con un tapón hecho de algodón y gasa estéril y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitador orbital (Selecta).

Para crecer bacterias en placas se añadieron 150 µl de suspensión bacteriana sobre una placa de LB-agar con el antibiótico de selección a 100 µg/ml. Se esterilizó el asa de siembra a la llama, se dejó enfriar y se distribuyó con ella la solución bacteriana por toda la superficie de la placa. Las placas se incubaron boca abajo, para evitar la condensación de agua sobre el cultivo bacteriano, en reposo y en estufa (Kowell) a 37°C.

### 3.2.7.2.- Obtención de bacterias competentes y transformación bacteriana.

Para la obtención de bacterias competentes, se sembró una colonia bacteriana en 10 ml de LB con antibiótico (apartado 3.2.7.1.), y se dejaron crecer durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se tomaron 300  $\mu$ l del cultivo y se diluyeron con 30 ml de LB. Se dejaron crecer en agitación a 37°C y periódicamente se fueron haciendo medidas de absorbancia del cultivo a  $\lambda=600$  nm, hasta que se alcanzó un valor entorno a 0,35 (a esta absorbancia las bacterias están en fase de crecimiento exponencial, la más adecuada para este proceso). El cultivo con la absorbancia adecuada se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugaron 20 ml del cultivo durante 8 min a 4°C y 3500 rpm (Jouan, CR 3.12). El pellet bacteriano se lavó con agua milliQ estéril para elevar la competencia, y después se resuspendió, primero con 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío, y luego añadiendo 10 ml más. Se dejaron en hielo durante 15 min y después se centrifugaron 10 min a 4°C y 3500 rpm. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 4ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM en frío. En esas condiciones las células están listas para ser transformadas o bien para almacenarse a -80°C hasta el momento de su utilización.

Para transformar bacterias se emplearon 2 tipos de técnicas. Cuando se trató de plásmidos comerciales, con el único objetivo de expandirlos, se empleó la transformación rápida. Para ello, se mezclaron en un eppendorff 10  $\mu$ l de células competentes con unos 0,05  $\mu$ g de plásmido, se mantuvieron durante 2 min a 42°C en baño seco (Selecta), luego 2 min en hielo y se añadió sobre la mezcla 200  $\mu$ l de LB atemperado. Finalmente, se plaquearon en placas Petri de LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente a 100  $\mu$ g/ml. Para transformar bacterias con constructos resultado de ligaciones, se empleó el método de transformación lenta. Para ello, se mezclaron 100  $\mu$ l de células competentes con 5  $\mu$ l del plásmido y se dejaron en hielo durante 30 min. Después se tuvieron 2 min a 37°C en baño seco (Selecta) y 2 min en hielo. Sobre la mezcla se añadieron 400  $\mu$ l de LB atemperado y se incubaron en agitador orbital (Selecta) 1 h a 37°C. Finalmente, se plaquearon en placas Petri de LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente a 100  $\mu$ g/ml..

### 3.2.7.3.- Técnicas de ingeniería genética.

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en tubos eppendorff. Para ello, se añadieron: 0,5  $\mu$ l de cada una de las enzimas de restricción necesarias, 4  $\mu$ l del tampón Y+/TANGO (2x), 2-3  $\mu$ g del ADN plasmídico y se completó con agua milliQ hasta 20  $\mu$ l. Se realizó una breve centrifugación (Minifuga) de la mezcla y se incubó en baño seco a 37°C durante 2-3h. En caso de usar una sola enzima de restricción se añadieron 0,5  $\mu$ l de esta y 4  $\mu$ l del buffer específico la enzima, en vez del tampón Y+/TANGO.

La defosforilación de vectores digeridos, para evitar su recircularización y poder ligarlos a un inserto, se llevó a cabo a partir de una muestra de vector digerido (2-3  $\mu$ g) en 50  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5 ). Se añadieron 40  $\mu$ l de Tris 10 mM pH 8,3, 3  $\mu$ l de la enzima fosfatasa alcalina y 10  $\mu$ l del tampón de la enzima (10x). La muestra se incubó durante 30 min a 37°C, se añadió 1  $\mu$ l de EDTA 0,5M pH 8 y se incubó 10 min a 75°C para inactivar la enzima. Para purificar el vector defosforilado, se dejó enfriar la muestra y se realizó una extracción fenol-cloroformo. Para ello, se añadieron 110  $\mu$ l de fenol sobre la mezcla, se vortexó y centrifugó durante 2 min a 12000 rpm (Minifuga, Beckman Coulter). Se trasvasó la fase superior a otro eppendorff y sobre ella se añadieron 55  $\mu$ l de fenol y 55  $\mu$ l de cloroformo. Se vortexó y se centrifugó 2 min más a 12000 rpm y se trasvasó la fase superior a un tercer eppendorff. Se añadieron 11  $\mu$ l de NaAcO 3M pH 7 y 230  $\mu$ l de EtOH. Se mezcló bien y se incubó 15 min en hielo. Tras esto, se centrifugó de nuevo 10 min a 12000 rpm y 4°C para precipitar el DNA purificado, se desechó el sobrenadante y se lavó con 200  $\mu$ l de EtOH al 70 %. Finalmente, el ADN se disolvió en 20  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5 ) y se guardó a -20°C hasta su utilización.

Las ligaciones de ADN también se realizaron en tubos eppendorff. La proporción vector/inserto dependió de las concentraciones de partida de ambos, pero como mínimo el inserto debe estar a una concentración doble respecto del vector. Se prepararon 3 tubos, uno en que se añadió sólo vector (control de recircularización inespecífica del plásmido), otro en que se añadió sólo inserto (control negativo) y un tercero con vector e inserto. Los 3 se completaron con agua milliQ hasta 8  $\mu$ l. Se mantuvieron 5 min a 45°C, se enfriaron en hielo y se añadió a cada uno 1  $\mu$ l de T4DNA ligasa y 1  $\mu$ l del tampón de la enzima (10x). Las muestras se dejaron 2 h a t.a. o 16 h a 4°C.

Para extraer ADN de cultivos bacterianos el producto de partida fueron siempre cultivos líquidos. Si el objetivo era tan sólo analizar una construcción génica, las extracciones se hicieron de volúmenes entre 2-10 ml mediante la técnica de Miniprep. Se usó el kit comercial *CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System 250 Reactions* (Gibco BRL). Cuando lo que se deseaba era cantidades considerables de vector para después trabajar con él, las extracciones se hicieron de volúmenes entre 200-400 ml de cultivo bacteriano mediante la técnica de Maxiprep. Se usó el kit comercial *Jet Star Plasmid Purification MAXI Kit/20*. En uno y en otro caso el producto final de la extracción se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5) en condiciones estériles y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para analizar ADN se realizaron electroforesis de ADN en geles de agarosa. Se prepararon geles al 1% de agarosa en TBE (0,045M Tris-borato, 1 mM EDTA) y se añadieron 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio (EtBr). Se cargaron entre 10 y 40  $\mu\text{l}$  de muestra, dependiendo de si el objetivo era sólo visualizar bandas o purificarlas. Como tampón de carga se empleó *Loading Buffer 10x* (Takara). Las electroforesis se realizaron en cubetas Mini-Sub CELL GT (BioRad) a voltajes entre 80-130V y amperaje constante. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar 100 pb *DNA ladder* de Promega. La visualización de los geles se llevó a cabo con un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad) y se analizó mediante el programa Bio-Rad Multi-Analyst (PC versión 1.1).

Cuando se quiso purificar ADN a partir de alguna de las bandas, la banda se recortó con ayuda de una cuchilla y bajo la luz del transiluminador, se introdujo en un eppendorff y este en un baño seco (Selecta) a  $60^{\circ}\text{C}$  para fundir la agarosa que contenía la banda. Una vez fundida se empleó el kit "*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*" (Amersham Biosciences) y finalmente, el ADN se eluyó con 20-50  $\mu\text{l}$  de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5) y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### **3.2.7.4.- Obtención de la construcción pLZR-IRES-GFP-mcl-1.**

Los productos de partida fueron el vector pcDNA3.0, en el cual estaba clonado el gen mcl-1 entre los sitios de restricción HindIII y BamHI, que fue amablemente proporcionado por el Dr. Victor Yuste (Instituto Pasteur, París) y el vector pLZR-IRES-GFP (Abad et al., 2002), en que quería clonarse el gen entre dos sitios EcoRI, amablemente proporcionado por el Dr. Atanasio Pandiella (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca).



Se buscó la secuencia del gen *mcl-1* en PUBMED y a partir de ella se obtuvo el mapa de restricción del gen y los diferentes marcos de lectura, con sus pesos moleculares (PM) y su número de pares de bases. Se contrastó que las enzimas de restricción de interés (*HindIII*, *BamHI* y *EcoRI*) no cortaran al gen en ningún punto de su secuencia y se buscó una enzima de restricción conocida que si lo hiciera (*XhoI* en este caso). De los marcos de lectura, se seleccionó aquel cuyo PM encajaba con el de la proteína *Mcl-1* y se contrastó que dicha secuencia encajara con la obtenida para el gen por secuenciación del vector *pcDNA3.0-mcl-1*. Tomando como base la secuencia del gen, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (oligosen y oligoantisen) para amplificar el gen por PCR y a la vez cambiar los extremos de restricción (*HindIII* y *BamHI* por extremos *EcoRI*). Las secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores fueron:

**MCL1- 5-ECORI (oligosen)** 5'-ATG AAT TCA TGT TTG GCC TCA AAA G -3'

**MCL1- 3-ECORI (oligoantisen)** 5'AAG AAT TCC TAT CTT ATT AGA TAT GCC -3'

La amplificación del gen se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía: 5 µl de tampón de reacción 10x ( $MgCl_2$  15 mM, KCl 500 mM, 1% Tritón, Tris-HCl 100 mM pH 8.8), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1,5 µl de oligosen (10 µM), 1,5 µl de oligoantisen MC1-3-ECORI (10 µM), 1 µl de TaqDNA polimerasa, 1 µl del vector *pcDNA3.0-mcl-1* y 39 µl de agua milliQ estéril, completándose así un volumen final de 50 µl. Como control negativo se empleó la misma mezcla anterior pero sin DNA.

El programa de PCR empleado fue:

- 1- Hot Start : 94°C/5'
- 2-Desnaturalización : 94°C/30''
- 3-Hibridación : 57°C/30''
- 4-Extensión : 72°C/1'30''
- 5-Extensión : 72°C/7'

2-4: 35 ciclos

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda del tamaño esperado (1200 pb) se purificó (apartado 3.2.7.3.). Finalmente, el fragmento amplificado se resuspendió en 50 µl de TE (10 mM Tris-Hcl, 1mM EDTA pH 7.5) y se estimó su concentración por medida de absorbancia de DNA de doble cadena en un espectrofotómetro.

Se subclonó el fragmento de PCR en el vector *p-GEM-T Easy Vector* de Promega, un vector idóneo para el clonaje de productos de PCR. Este vector, tiene una zona rica en timinas dentro de la secuencia del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, que liga las colas de adeninas que la PCR añade a ambos lados del fragmento amplificado interrumpiéndose la expresión del gen de la  $\beta$ -galactosidasa cuando tal ligación se produce, y dando colonias blancas en vez de azules por la incapacidad de degradar el X-gal e IPTG presentes en el medio. El subclonaje en p-GEM-T fue necesario porque al estar los dos sitios de restricción EcoRI tan próximos a los extremos del fragmento amplificado, la enzima EcoRI era incapaz de unirse y a la vez cortar correctamente.

El subclonaje se realizó de acuerdo al kit del vector: se transformaron bacterias por transformación lenta (apartado 3.2.7.2) y se plaquearon en placas de LB-agar con el antibiótico de selección, a las que previamente se les había añadido 100  $\mu$ l de IPTG 100 mM y 20  $\mu$ l de X-Gal (50 mg/ml) y que se habían mantenido al menos 30 min a 37°C en estufa (Kowell). Al día siguiente, se seleccionaron las colonias blancas, aquellas en que la expresión del gen  $\beta$ -galactosidasa se había interrumpido por ligación del fragmento amplificado, se crecieron en medio líquido (10 ml) (apartado 3.2.7.1.) y se realizaron minipreps (apartado 3.2.7.3.). Se digirieron con EcoRI (apartado 3.2.7.3.) los productos de las minipreps y se corrieron en gel de agarosa al 1%. Se comprobó que en todos los casos la inserción y digestión habían sido correctas y que los fragmentos obtenidos eran del tamaño esperado. Se purificaron dichos fragmentos (apartado 3.2.7.3.) y se ligaron con el vector pLZR-IRES-GFP, previamente digerido con EcoRI y defosforilado (apartado 3.2.7.3.). Se transformaron bacterias con el método de transformación lenta y se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de selección. Se seleccionaron colonias de la placa correspondiente a la ligación vector-inserto, se crecieron en 10 ml de medio LB-antibiótico y se hicieron minipreps de nuevo. En estas minipreps se evaluó, no sólo la presencia del gen, sino también que éste se hubiera insertado en la orientación correcta, pues al estar flanqueado en ambos extremos por sitios EcoRI podía insertarse en ambos sentidos. Para ello, los productos de las minis se digirieron por un lado con EcoRI, y por otro, con BamHI (corta antes del gen) y con XhoI (corta en el interior del gen, casi al final, dando un fragmento grande y un fragmento pequeño). Los productos de estas digestiones se corrieron en gel de agarosa al 1% y se evaluaron bajo el trasiluminador Gel Doc 2000 (BioRad).

De las 10 colonias que se picaron, tan sólo en un caso el gen estaba clonado en el vector pLZR-IRES-GFP y en la orientación correcta. Con el vector aislado de esta miniprep se realizó una transformación rápida, se crecieron bacterias en volúmenes cada vez mayores y se realizó una maxiprep. Finalmente la construcción se eluyó en condiciones estériles en 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5) y se estimó su concentración en el espectrofotómetro.

### **3.2.8.- Infecciones retrovirales.**

Esta técnica se ha empleado para obtener células que sobre-expresen un gen de forma estable. Consiste en la generación de retrovirus capaces de integrar parte de su genoma en los cromosomas eucariotas. Podemos así, introduciendo un gen exógeno en el genoma del virus, insertarlo en el ADN de las células eucariotas y obtener, tras un clonaje por dilución límite, líneas celulares estables que sobre-expresen el gen de interés. Se empleó un vector bicistrónico, pLZR-IRES-GFP (Abad et al., 2002) como genoma del virus. Los vectores bicistrónicos se caracterizan por la presencia de un sitio de unión interna al ribosoma (IRES; *internal ribosome entry site*) que permite que el gen marcador y el gen de interés se expresen independientemente, pero a partir de una misma unidad de transcripción, por lo que una eficiente expresión de uno correlaciona con una eficiente expresión del otro. En este caso se usó como marcador el gen de la proteína fluorescente verde (GFP).

#### **3.2.8.1.- Generación de retrovirus.**

Se empleó la línea celular de ratón 293T como células empaquetadoras. El medio de cultivo en esta etapa fue siempre DMEM con suero fetal bovino al 10%. Se emplearon 3 tipos de plásmidos diferentes: pLZR-IRES-GFP o variantes suyas por clonaje de genes exógenos en su polilinker, pMDG-VSV (contiene los genes que codifican las proteínas de la envuelta vírica) y pNVUL-MLV-gag-pol (contiene los genes que codifican las proteínas de la cápsida vírica y la retrotranscriptasa del virus). Tras la transfección de las células empaquetadoras con estos 3 plásmidos, la maquinaria celular genera gran cantidad de viriones, que provocan la lisis y muerte celular liberándose al medio de cultivo.

El protocolo seguido fue el siguiente (Carvajal-Vergara et al., 2005) : 16 horas antes de la transfección se sembraron células 293T en placas de 60 mm a densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml y un volumen de 3 ml. Al día siguiente, se prepararon las mezclas de transfección en tubos eppendorff. Estas contenían: 3  $\mu$ g pLZR-IRES-GFP o pLZR-IRES-GFP-gen exógeno, 2,5  $\mu$ g pMDG-VSV, 5  $\mu$ g pNVUL-MLV-gag-pol, 61  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2 M y agua milliQ hasta 500  $\mu$ l. Sobre cada eppendorff se añadieron 500  $\mu$ l de 2xHBS (NaCl 274 mM, hepes 50 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5 mM pH 7), se agitaron por inversión y se burbujeó con una pipeta pasteur provista de filtro durante 15 segundos. Paralelamente a esto, se añadió a cada una de las placas de células 293T 1  $\mu$ l de cloroquina 25  $\mu$ M (agente lisosomotrópico), se agitó suavemente describiendo círculos y se incubaron en la estufa a 37°C durante al menos 5 min. Tras esto, se añadió sobre las placas poco a poco la mezcla de transfección, agitándose suavemente describiendo círculos concéntricos y se volvieron a introducir en la estufa. A las 6-8 h se retiró el medio de las placas por aspiración y se les añadió 3 ml de medio nuevo. Tras 24 h se retiró el medio y se les añadió esta vez 4 ml a cada placa.

Todo el material empleado en estas últimas etapas se lavó abundantemente con lejía tras su uso para eliminar los posibles restos de virus.

### **3.2.8.2.- Infección de células eucariotas con retrovirus.**

Transcurridas 20 h desde el último cambio de medio, se procedió a la infección de las células de MM con los retrovirus presentes en el sobrenadantes de las células transfectadas. Para ello,  $3-5 \times 10^5$  células de MM se centrifugaron y se resuspendieron con el filtrado (0,22  $\mu$ m) de los 4 ml de sobrenadante de las células transfectadas cargado de retrovirus. Se le añadió Polybrene® (Sigma) a 6  $\mu$ g/ml a la suspensión celular a partir de un stock a 4 mg/ml y se transfirió a un bote de cultivo. Al cabo de 2-3 h, se añadieron 8 ml de medio RPMI completo sobre el cultivo, para asegurar que las células tuvieran todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Al día siguiente, las células infectadas se centrifugaron, se desechó el sobrenadante con los restos víricos sobre lejía y las células se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI completo.

### **3.2.8.3.- Obtención de líneas estables mediante clonaje por dilución límite.**

La eficacia de la técnica anterior fue baja, sólo entre un 15-20% de las células de MM integraron el genoma vírico. Para conseguir líneas estables, en que todas las células tuvieran la inserción y todas en el mismo sitio del genoma, se realizó un clonaje por dilución límite. Para ello, se prepararon diluciones de suspensión celular hasta conseguir un volumen medible entre 5-10  $\mu$ l que contuviera tan sólo 100 células, portaran o no la integración cromosómica. Se tomó este volumen y se añadió en 20 ml de medio RPMI acondicionado (medio completo obtenido a partir de un cultivo de 24 h tras centrifugación y posterior filtrado). El medio acondicionado se caracteriza por la presencia de citoquinas y factores de crecimiento que han sido secretados por las células en cultivo, sustancias que ayudan a que las células en condiciones de dilución límite sobrevivan e incluso proliferen. Se agitó la mezcla y se fue añadiendo la suspensión en placas de 96 pocillos de fondo curvo, a razón de 100  $\mu$ l/pocillo, lo que suponía un promedio de 0,5 células/pocillo. Las placas se introdujeron en la estufa a 37°C y se dejaron durante 2-3 semanas. Trascurrido ese tiempo, se observaron todos los pocillos al microscopio óptico invertido (CK, Olympus) y se seleccionaron aquellos que contenían clones. Estos pocillos se observaron después al microscopio invertido de fluorescencia (Nikon, TE300/TE200) y se seleccionaron los clones que expresaban la GFP. A estos clones, se les añadió 100  $\mu$ l más de medio RPMI completo y al cabo de un par de días se transvasaron a una placa de 24 pocillos y se diluyeron hasta 500  $\mu$ l. Conforme los clones seleccionados fueron creciendo, se fueron diluyendo con medio RPMI completo hasta conseguir una línea clonal estable.

### **3.2.9.- Transfecciones con Nucleofector®.**

Esta técnica se ha empleado para silenciar genes de forma transitoria empleando RNAs de interferencia (RNAi). El RNAi consiste en el silenciamiento post-transcripcional de un gen mediante el empleo de duplex de RNA de entre 21-23 nucleótidos y extremos 3' protuberantes, llamados siRNAs, cuya secuencia es homóloga a parte de la secuencia del gen que se quiere silenciar.

El día previo a la transfección, las células se diluyeron hasta la densidad de sembrado (apartado 3.2.1.4.) para que al día siguiente estuvieran en fase exponencial de crecimiento, fase en que se optimiza el proceso de transfección. Se tomaron  $2,5 \times 10^6$  células por punto experimental, se centrifugaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de mezcla de transfección (81,8  $\mu$ l *Cell Line R Nucleofector® Solution* y 18,2  $\mu$ l suplemento 1). Se añadieron 1,5  $\mu$ l de siRNA 50  $\mu$ M (75 pmoles), y la mezcla se depositó en el interior de una cubeta de transfección (Amaxa biosystems). Se transfectaron las células empleando el programa T-01 y posteriormente se añadió a la cubeta de transfección 1 ml de medio RPMI completo. Las células se trasvasaron a una placa de 6 pocillos con ayuda de una pipeta estéril (Amaxa biosystems) y se les añadió otros 4 ml de medio completo. Al cabo de 6 h en estufa a 37°C, y recuperadas las células del proceso de transfección, se añadieron sobre las células las drogas objeto de estudio y se incubaron durante los tiempos correspondientes. A dichos tiempos, se realizaron extractos de proteínas para comprobar el silenciamiento del gen y/o se evaluó la toxicidad de las drogas en las condiciones de silenciamiento.

## **4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

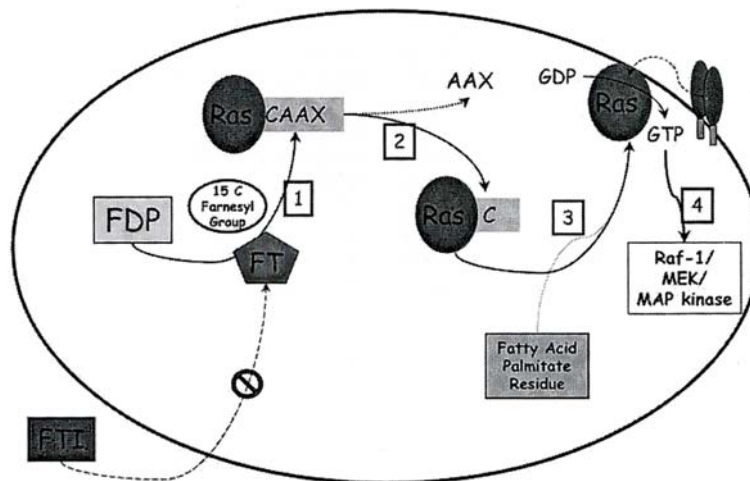




## 4.1.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR EL INHIBIDOR DE FARNESIL-TRANSFERASAS BMS-214662.

### 4.1.1.- Introducción.

Las células de mamífero expresan tres prenil-transferasas diferentes. Por un lado, esta la enzima **farnesil-transferasa (FT)**, que cataliza la transferencia de una cadena isoprenoide de 15 átomos de carbono desde un farnesil-pirofosfato al residuo de cisteína de una secuencia conservada CAAX presente en el extremo C-terminal de algunas proteínas citosólicas (C=Cys; A=cualquier aa alifático; X=Ser o Met) (Sebti, 2003).



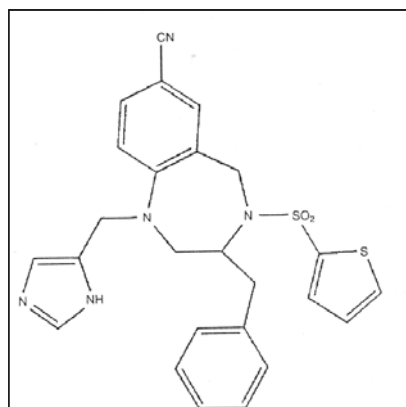
**Figura 4.1.- Farnesilación de la proteína Ras** (O'Regan and Kuri, 2004). (1) transferencia de la cadena isoprenoide a la cisteína de la secuencia CAAX catalizada por la enzima FT; (2) corte del motivo AAX; (3) unión de un residuo de ácido palmítico; (4) la proteína Ras ya tiene una parte hidrofóbica, lo que permite su unión a la membrana y su activación.

Existen varias proteínas identificadas como sustrato de la enzima farnesil-transferasa (FT). Entre ellas cabe destacar: Ras, proteína clave en el control de la proliferación celular a través de la vía Raf/MAPK/ERK y en el control de la supervivencia celular a través de la vía PI3K/Akt (Hu et al., 2003), Rho B, una proteína involucrada en el control de la remodelación del citoesqueleto de actina y en procesos de endocitosis (Du et al., 1999), CENP-E y CENP-F, dos proteínas centroméricas implicadas en el control de la transición G<sub>2</sub>-M (Ashar et al., 2000), la chaperona citosólica HDJ-2 (Adjei et al., 2001), la proteína peroxisomal PxF y las láminas A y B (Haluska et al., 2002).

Por otro lado, esta la enzima **geranilgeranil-transferasa-1 (GGT-1)**, que cataliza la transferencia de una cadena isoprenoide de 20 átomos de carbono desde un geranilgeranil-pirofosfato a la cisteína presente en la secuencia conservada CAA<sub>X</sub> si X=Leu o Ile (Basso et al., 2006). Finalmente, existe también la enzima **geranilgeranil-transferasa-2 (GGT-2) o Rab geranilgeraniltransferasa (RabGGT)**, que cataliza la transferencia de cadenas isoprenoides de 20 átomos de carbono, pero a una secuencia conservada CXC presente en el extremo C-terminal de las GTPasas de la familia Rab (Basso et al., 2006).

Los inhibidores de la enzima farnesil-transferasa (FTIs) se diseñaron inicialmente con la idea de bloquear la actividad de Ras, dada su alta frecuencia de mutación en gran número de cánceres (existen cuatro isoformas mutadas de Ras: H-,N-,K-RasA / K-RasB, todas ellas constitutivamente activas). Se ha evaluado su capacidad de inducir apoptosis tanto en líneas celulares, como en ensayos pre-clínicos con células de pacientes y en ensayos clínicos de fase I, demostrando en todos los casos un gran potencial como agentes anti-tumorales. Sin embargo, hoy en día se sabe que en la mayor parte de las líneas celulares y de los tejidos tumorales su toxicidad no correlaciona con el estado mutado de Ras (Haluska et al., 2002), lo que hace necesario analizar el mecanismo apoptótico desencadenado por estos agentes y discriminar que proteínas farnesiladas son clave y cuales no, en la respuesta citotóxica. Además no todos los FTIs muestran la misma capacidad de inducir apoptosis, algunos sólo son capaces de inhibir el crecimiento celular, mientras que otros muestran una elevada actividad citotóxica. Incluso la toxicidad de un FTI varía de un tipo de cáncer a otro, dificultando todavía más la caracterización de su mecanismo de acción (Basso et al., 2006).

BMS-214662 es un inhibidor de farnesil-transferasas no peptídico (Singh and Lingham, 2002), mil veces más selectivo para la FT que para la GGT-1 (Rose et al., 2001). Se trata de una tetrahydrobenzodiazepina que contiene un grupo imidazol y que ha sido desarrollado por la compañía Bristol Myers-Squibb. BMS-214662 tiene importantes diferencias con otros FTIs en cuanto a que favorece la curación y regresión del tumor, mientras que otros FTIs sólo actúan como drogas citostáticas y producen regresiones no curativas (Rose et al., 2001).



**Figura 4.2.- BMS-214662.** (Stephen RD Johnston, 2003).

BMS-214662 se ha evaluado en ensayos clínicos de fase I, administrado por goteo intravenoso durante 1 h cada 21 días a pacientes con tumores sólidos avanzados, ya sea como agente único (Papadimitrakopoulou et al., 2005; Ryan et al., 2004) o combinado con otros agentes como cis-platino (Mackay et al., 2004). Estas condiciones de administración no han resultado tóxicas y han mostrado una pronunciada inhibición de la actividad farnesil-transferasa en las células mononucleares de sangre periférica. Sin embargo, la duración de la inhibición enzimática fue transitoria, coincidiendo la recuperación de actividad farnesil-transferasa con la disminución de los niveles plasmáticos de BMS-214662 (Ryan et al., 2004). Recientemente se han realizado otros ensayos de fase I en que BMS-214662 se ha administrado por goteo intravenoso durante 24 h , semanalmente, tres de cada cuatro semanas (Eder et al.,2006). Estas condiciones han resultado en una menor inhibición máxima de la actividad farnesil-transferasa, pero las condiciones de inhibición se han mantenido durante más tiempo.

En nuestro estudio hemos evaluado la sensibilidad a BMS-214662 de diferentes líneas celulares de mieloma múltiple (MM) y hemos caracterizado el mecanismo apoptótico inducido por este FTI en cada una de ellas. También se ha evaluado la posible implicación de diferentes proteínas susceptibles de farnesilación en la apoptosis inducida por BMS-214662.

#### **4.1.2.- Efecto de BMS-214662 en la proliferación, viabilidad y morfología celular.**

El estudio se realizó sobre las líneas IM-9, NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266. BMS-214662 indujo una drástica reducción de la proliferación celular en todas las líneas analizadas. El porcentaje de reducción dependió de la concentración de BMS-214662 y del tiempo de incubación con la droga (figura 4.3.A), aunque la sensibilidad a la misma varió de una línea celular a otra, y se correspondió con el porcentaje de apoptosis inducido. La línea NCI-H929 fue la más sensible, con una  $IC_{50}$  de 50 nM a las 22h, seguida por las líneas IM-9 y RPMI 8226/hp, con una  $IC_{50}$  entorno a 0,2  $\mu$ M a las 22h. Las más resistentes fueron las células U266 con una  $IC_{50}$  de 0,8  $\mu$ M a las 22h de tratamiento (figura 4.3.A).

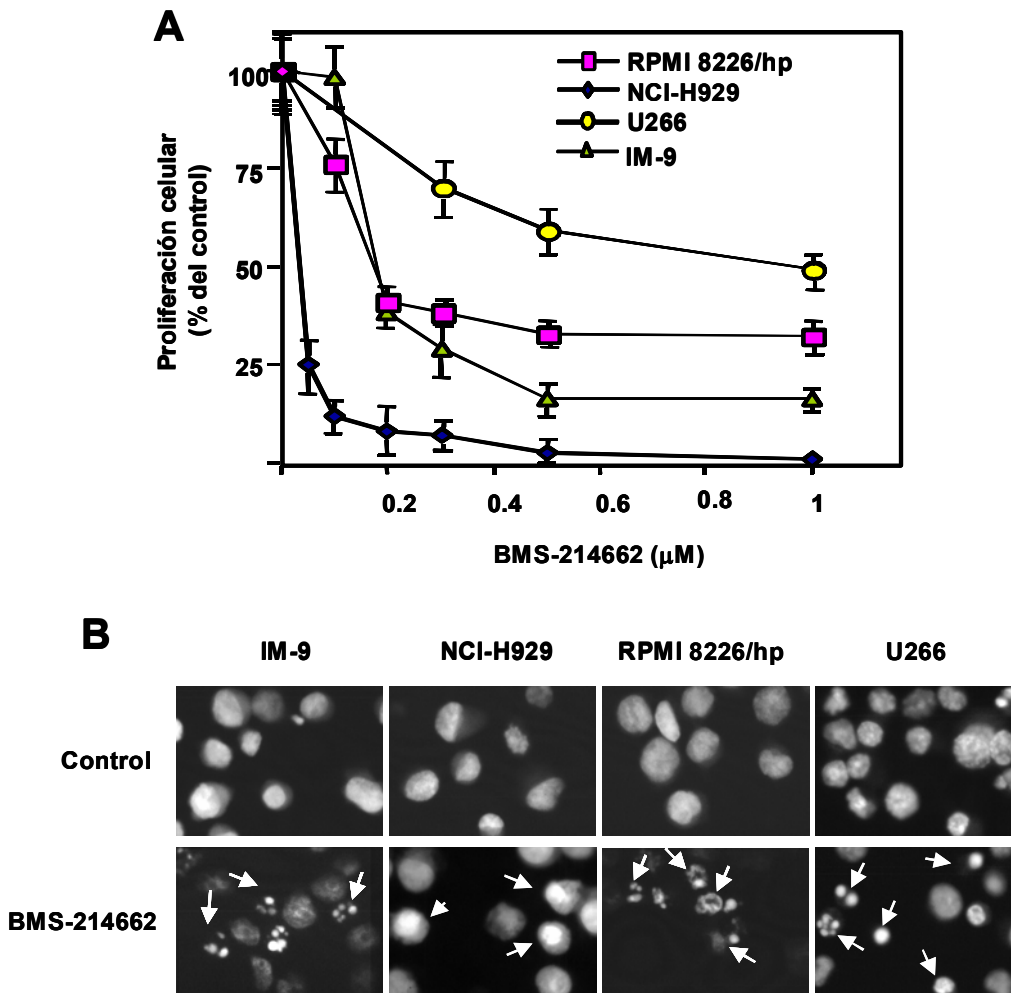
El análisis de la morfología se realizó por microscopía óptica de luz blanca. Todas las líneas mostraron características morfológicas típicas de la apoptosis como el encogimiento celular, que fue más acusado en IM-9 y RPMI 8226/hp, y la formación de burbujas. En U266 se observó la formación de protuberancias en la membrana plasmática a modo de pseudópodos, mientras que las células NCI-H929 mostraban el típico núcleo apoptótico refringente. La condensación y fragmentación de cromatina se analizó por microscopía de fluorescencia y se observó en todas las líneas analizadas (figura 4.3.B).

#### **4.1.3.- Efecto de BMS-214662 sobre la farnesilación de proteínas.**

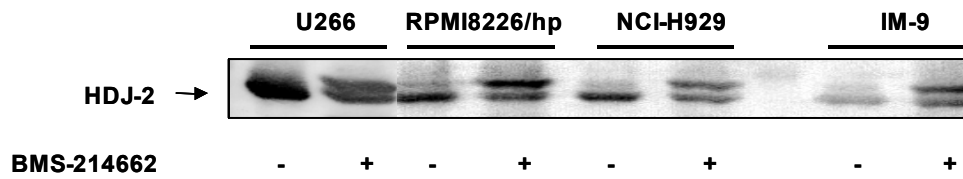
Para asegurar que el tratamiento con BMS-214662 a las dosis empleadas en todos los experimentos (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp y 1 $\mu$ M en U266, ligeramente superiores a la  $IC_{50}$ ) y el tiempo de incubación (22 h) eran capaces de inhibir la actividad farnesil-transfera, se evaluó mediante western blotting la ausencia o no de farnesilación de la chaperona HDJ2/DNAJ (proteína citosólica que se usa habitualmente como indicador de la actividad de FTIs (Adjei et al.,2001)) tras el tratamiento con BMS-214662.

La inhibición de la farnesilación se caracteriza por la aparición de una banda de menor movilidad, correspondiente a la forma no farnesilada de la proteína, en la que se ha bloqueado también el procesamiento proteolítico post-farnesilación (Adjei et al.,

2001; Karp, 2001). La presencia de esta banda demostró que BMS-214662 inhibió significativamente la farnesilación en todas las líneas celulares estudiadas a las dosis y tiempos empleados (figura 4.4.).



**Figura 4.3.- Efecto de BMS-214662 en la viabilidad de células de mieloma. (A)** Células IM-9, NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con diferentes concentraciones de BMS-214662 en medio completo en placas de 96 pocillos. La proliferación celular se estimó a las 22h por el método del MTT. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro determinaciones individuales y están expresados como porcentaje de viabilidad relativa respecto a las células control (sin BMS-214662). **(B)** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266), se tiñeron con el colorante nuclear PPDA y se examinaron y fotografiaron por microscopía de fluorescencia. Las flechas señalan células con compactación de cromatina y fragmentación nuclear. Aumento original x400.

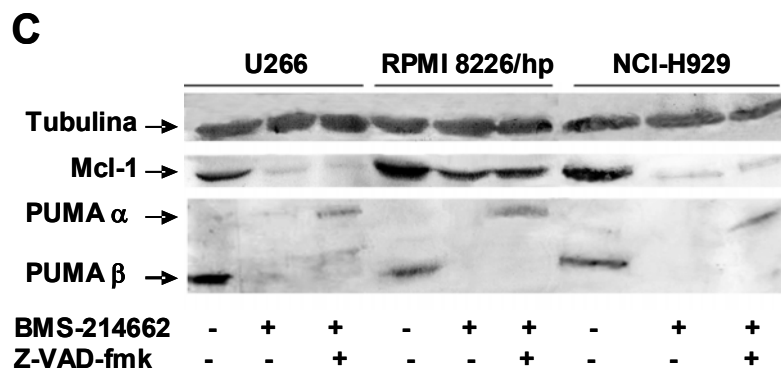
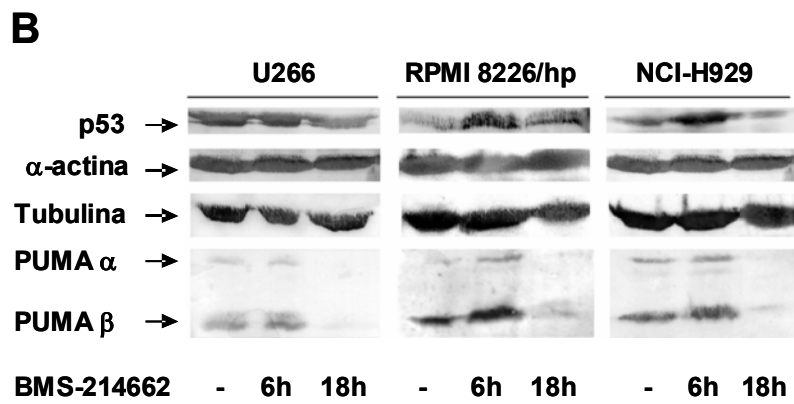
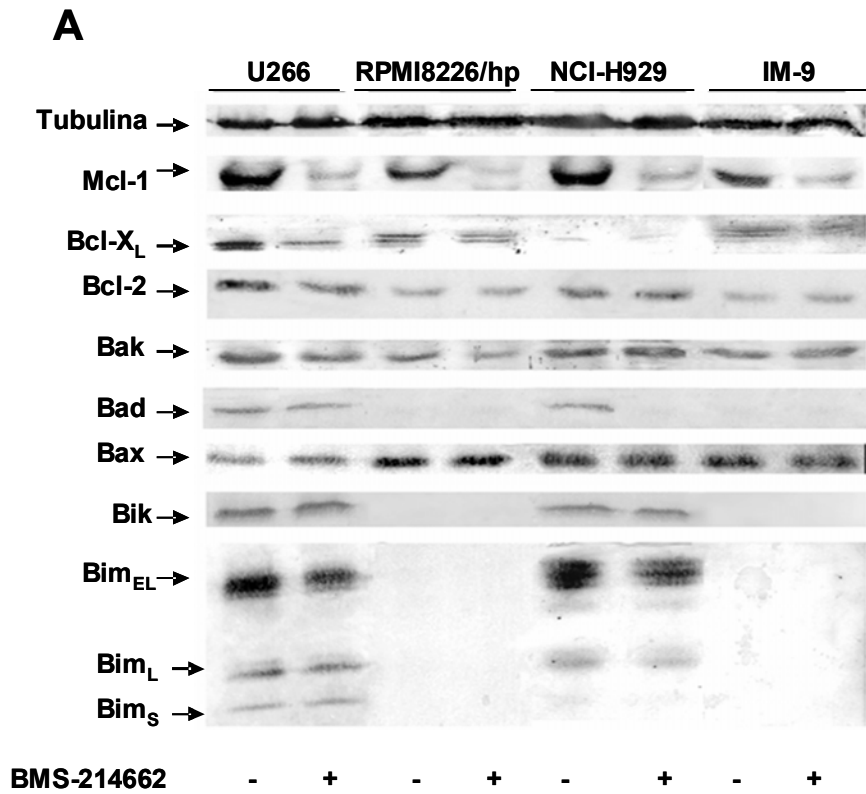


**Figura 4.4.- Efecto de BMS-214662 sobre la farnesilación de HDJ2/DNAJ.** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266), se realizó una extracción total de proteínas y se evaluó por Western blot la inhibición de la farnesilación de la chaperona HDJ2/DNAJ, usada como marcador. En todas las líneas el tratamiento con BMS-214662 provocó la aparición de una banda de menor movilidad correspondiente a la forma no farnesilada de la proteína.

#### 4.1.4.- Implicación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 en la apoptosis inducida por BMS-214662.

##### 4.1.4.1.- Efecto de BMS-214662 sobre los niveles de expresión de las proteínas de la superfamilia Bcl-2.

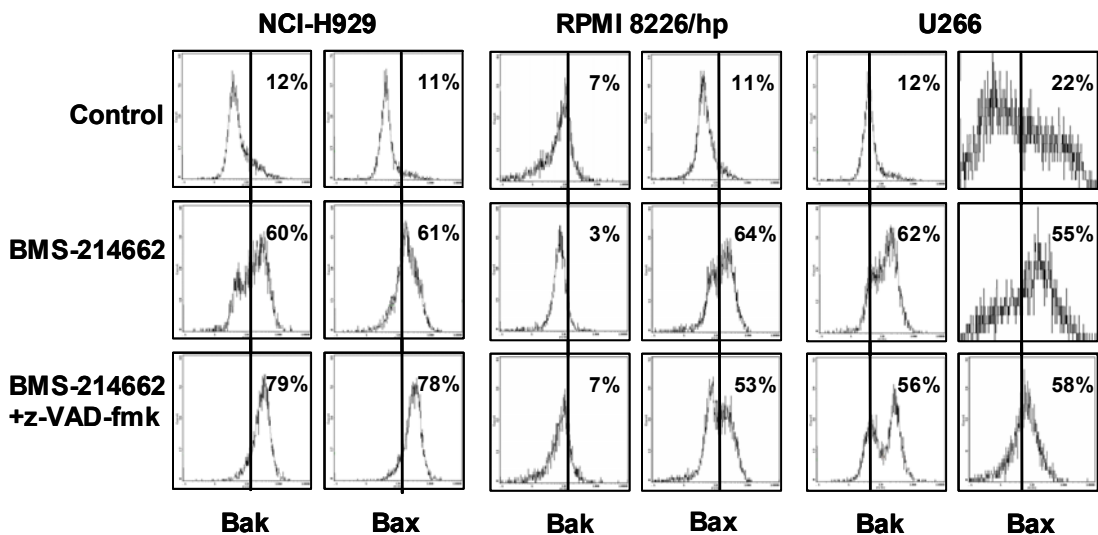
Se estudió el efecto del tratamiento con BMS-214662 sobre los niveles de expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bik, Bim y PUMA) y anti-apoptóticas (Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>). El tratamiento no afectó significativamente a los niveles de Bcl-2, Bax ni Bak en ninguna de las líneas estudiadas. Las proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” Bim, Bik y Bad se expresan en las células U266 y NCI-H929 pero no en las células RPMI 8226/hp e IM-9. Sus niveles no cambiaron, de modo significativo tras el tratamiento con BMS-214662 en U266, y solamente los niveles de Bad disminuyeron en NCI-H929 (figura 4.5.A). BMS-214662 indujo una reducción importante de los niveles de Mcl-1 en todas las líneas celulares (figura 4.5.A), que no se pudo evitar por co-incubación con Z-VAD-fmk (figura 4.5.C). Los niveles de Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub> también disminuyeron, aunque en menor grado, en las células U266, RPMI 8226/hp e IM-9 (figura 4.5.A). La proteína “sólo BH<sub>3</sub>” PUMA, fue expresada por todas las líneas celulares, tanto la isoforma  $\alpha$  como la  $\beta$ . Sus niveles aumentaron significativamente en RPMI 8226/hp y NCI-H929, pero no en U266, tras 6 h de tratamiento con BMS-214662 (figura 4.5.B). Este incremento de niveles de PUMA se correspondió con un incremento en los niveles de la proteína p53 (figura 4.5.B). A tiempos de incubación prolongados con BMS-214662, los niveles de PUMA disminuyeron en todas las líneas analizadas (figura 4.5.B).



**Figura 4.5.- Efecto de BMS-214662 en los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2.** (A) Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266), se realizó una extracción total de proteínas y se evaluaron por western blot los niveles de las proteínas anti-apoptóticas (Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>) y de las proteínas pro-apoptóticas (Bak, Bax, Bad, Bik y Bim) usando anticuerpos específicos. (B) Las células se trataron análogamente a (A) , se realizaron extractos a las 6 y 18 h y se analizaron los niveles de p53 y de PUMA usando anticuerpos específicos. (C) Las células se pre-incubaron 1 h con Z-VAD-fmk, después se añadió BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266) y se incubaron 22 h más. Se realizaron extractos celulares y los niveles de Mcl-1 y PUMA se analizaron por western blot usando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\alpha$ -tubulina o  $\beta$ -actina, según se indica.

#### 4.1.4.2.- Efecto de BMS-214662 en la conformación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak.

Se analizó la inducción de cambio conformacional de Bax y Bak, como prueba de la participación temprana de dichas proteínas en la apoptosis inducida por BMS-214662 en las líneas NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266. El tratamiento con BMS-214662 indujo el cambio conformacional de Bax y de Bak en NCI-H929 y U266 y sólo de Bax en RPMI 8226/hp (figura 4.6.). De acuerdo con esta última observación, otras drogas como doxorubicina y daunorubicina tampoco indujeron el cambio conformacional de Bak pero si el de Bax en RPMI 8226/hp. La inhibición de las caspasas con Z-VAD-fmk no impidió el cambio conformacional de Bax y de Bak en ninguna de las líneas estudiadas, potenciándolo incluso en H929 (figura 4.6.).



**Figura 4.6.- BMS-214662 induce el cambio conformacional proapoptótico de Bax y de Bak.** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266) en ausencia o presencia de Z-VAD-fmk 100  $\mu$ M. Después se fijaron, se incubaron con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la conformación pro-apoptótica : anti-Bax (A67) y anti-Bak (Ab-1) y se analizaron por citometría de flujo.



#### **4.1.5.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por BMS-214662.**

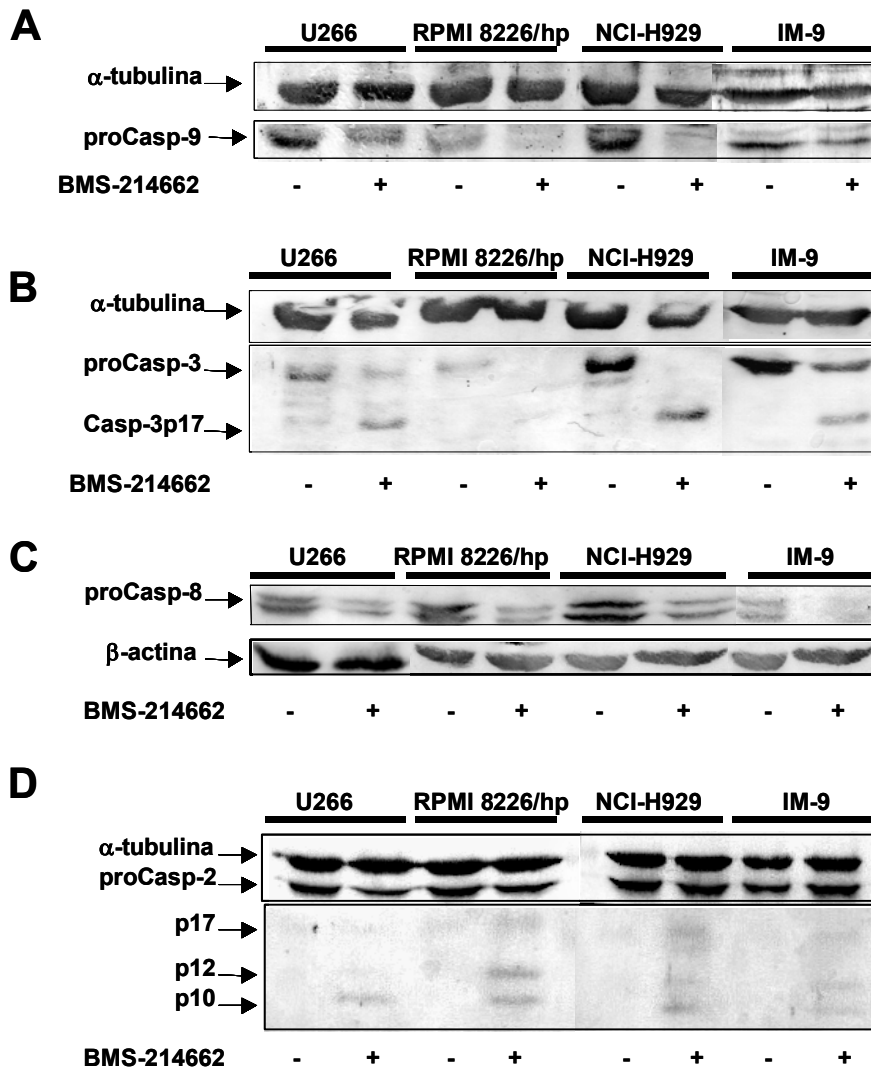
##### **4.1.5.1.- Análisis de la activación de caspasas.**

Se analizó la activación de las caspasas -2,-3,-8 y -9 en respuesta a BMS-214662 por electroforesis e inmunotransferencia de las proteínas extraídas de cada una de las diferentes líneas tratadas o sin tratar (controles). En todas las líneas, BMS-214662 indujo una activación considerable de caspasa-9 (figura 4.7.A) y caspasa-3 (figura 4.7.B), detectada por un descenso significativo en la cantidad de proenzima, y en el caso de la caspasa-3, también por la aparición de la subunidad activa de 17 kDa (figura 4.7.B). Las células RPMI 8226/hp expresaron muy bajos niveles de caspasa-3, por lo que no se llegó a observar la banda de activación (figura 4.7.B). También se detectó activación de caspasas -8 y -2 en todas las líneas (figuras 4.7.C y D).

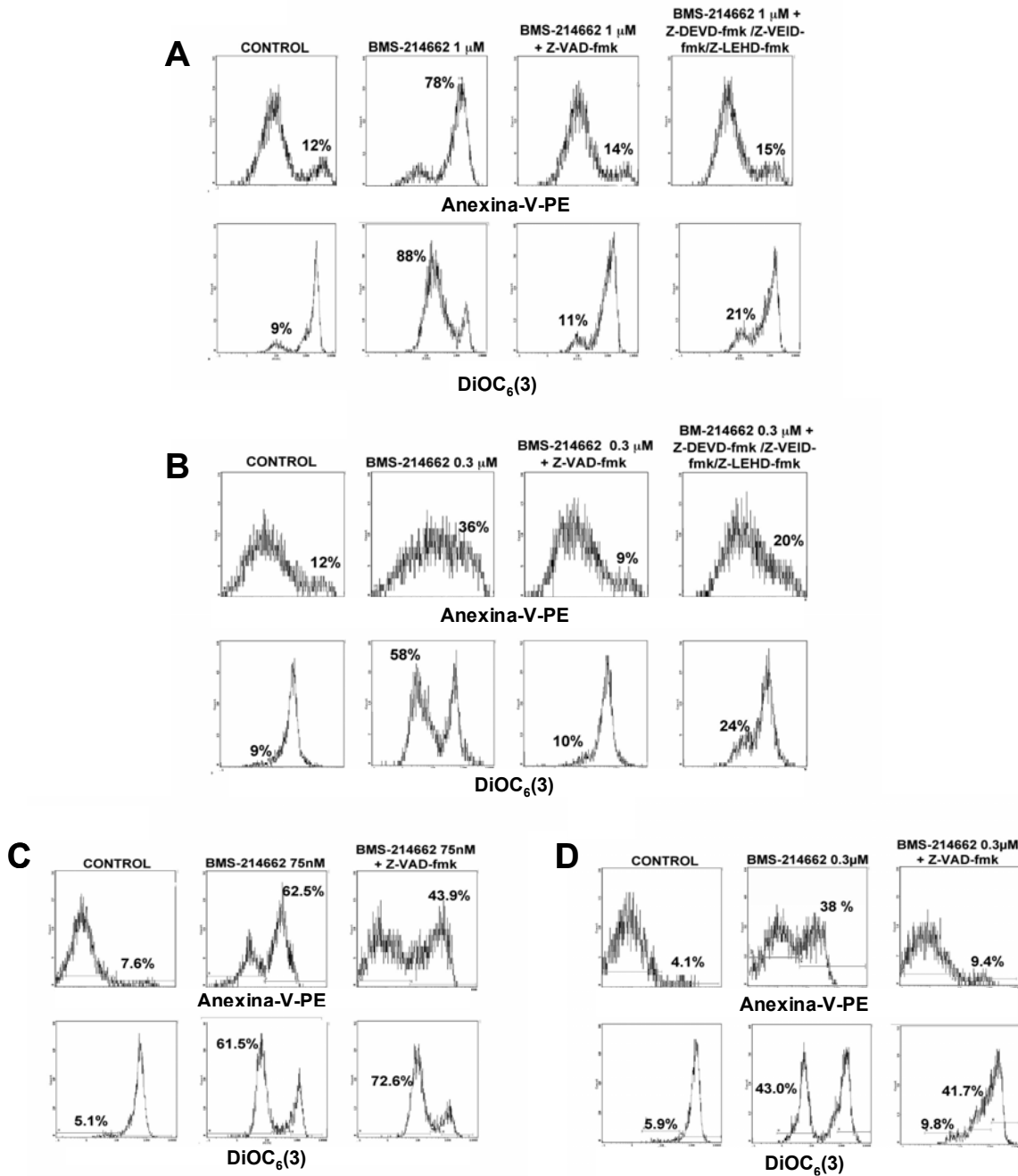
##### **4.1.5.2.- Efecto de los inhibidores de caspasas.**

Se analizó el efecto de diferentes inhibidores de caspasas sobre la apoptosis inducida por BMS-214662 en las líneas de mieloma. Se evaluó su efecto en eventos tempranos como la exposición de fosfatidilserina (PS) o la disminución del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), y en eventos más tardíos como la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear.

El tratamiento con BMS-214662 indujo en todas las líneas exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática y pérdida del  $\Delta\Psi_m$  (figura 4.8.). El inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk no previno de la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , aunque si atenuó la translocación de PS en la línea NCI-H929 (figura 4.8.C). Sin embargo, en U266 y RPMI 8226/hp, Z-VAD-fmk impidió por completo tanto la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  como la exposición de fosfatidilserina a las 22h del tratamiento (figura 4.6.A y B). En IM-9, la inhibición de la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  no fue completa (figura 4.8.D). Una proporción considerable de células mostraron un potencial intermedio comparado con el de las células sin tratar ( $\Delta\Psi_m$  alto) y las células tratadas solamente con BMS-214662 ( $\Delta\Psi_m$  bajo) (figura 4.8.D).



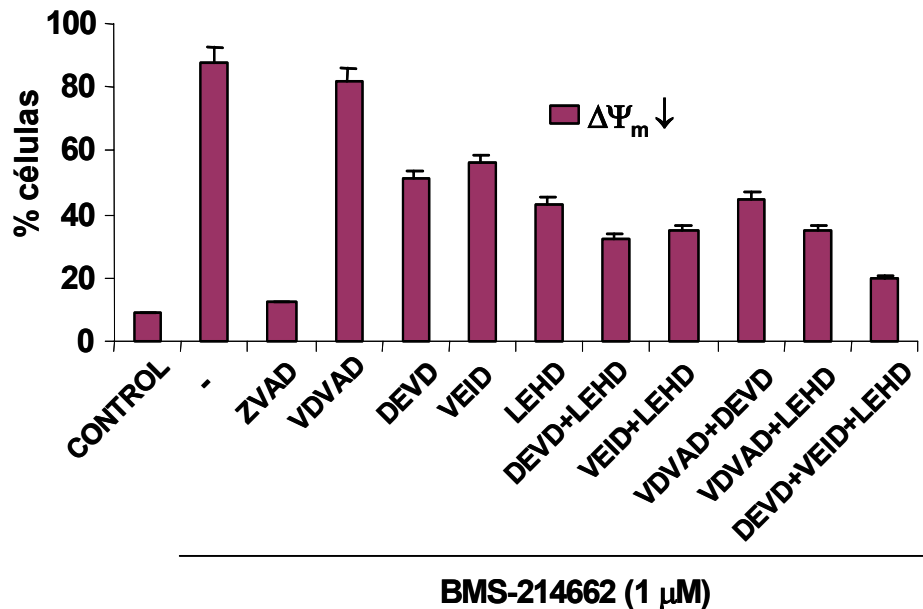
**Figura 4.7.- Activación de caspasas inducida por BMS-214662.** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266), se realizó una extracción total de proteínas y se evaluó la activación de caspasa-9 (A), caspasa-3 (B), caspasa-8 (C) y caspasa-2 (D) por western blot usando anticuerpos específicos. La activación se detectó por el descenso de la cantidad de proenzima, y en el caso de las caspasas -2 y -3, por la aparición de las subunidades activas. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\alpha$ -tubulina o  $\beta$ -actina, según se indica.



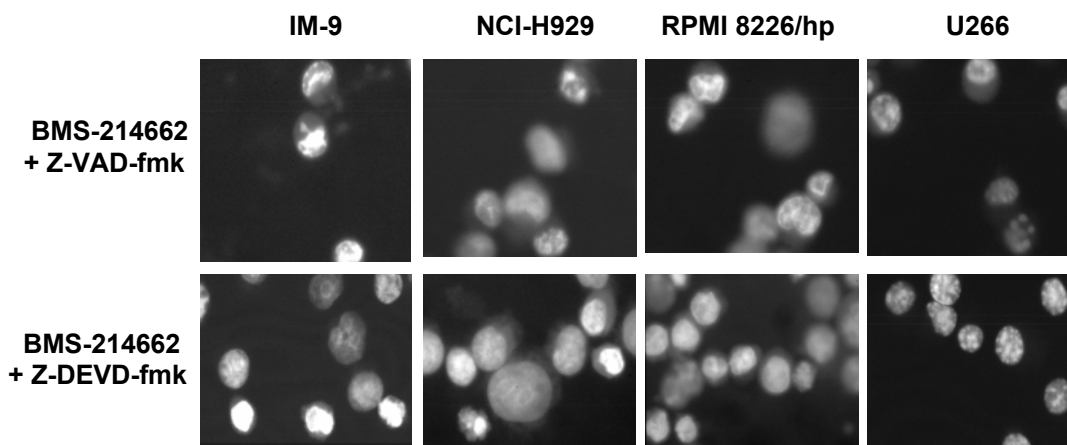
**Figura 4.8.- Efecto de los inhibidores peptídicos de caspasas sobre la apoptosis inducida por BMS-214662. (A)U266; (B) RPMI 8226/hp; (C) NCI-H929; (D) IM-9.** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp, y 1  $\mu$ M en U266) en ausencia o presencia de 100  $\mu$ M Z-VAD-fmk o la mezcla triple Z-DEVD-fmk+ Z-VEID-fmk + Z-LEHD-fmk (100  $\mu$ M cada uno). Se analizó la exposición de fosfatidilserina y la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  mediante marcaje con anexina-V-PE y con DiOC<sub>6</sub>(3), respectivamente. Los experimentos mostrados son representativos de 4 determinaciones diferentes para cada línea celular.

Por otro lado, analizamos el efecto de los inhibidores de caspasas selectivos en la apoptosis inducida por BMS-214662 en aquellas líneas en que el efecto protector de Z-VAD-fmk era mayor (U266 y RPMI 8226/hp). Z-DEVD-fmk (inhibidor de las caspasas -3 y -7), Z-VDVAD-fmk (mínimo inhibidor de la caspasa -2), Z-IETD-fmk (inhibidor de la caspasas -8 y -10), Z-VEID-fmk (inhibidor de la caspasa -6) y Z-LEHD-fmk (inhibidor de la caspasa -9) no fueron capaces de impedir la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , aunque si redujeron la exposición de PS (figura 4.9.). Se probaron combinaciones de dos y de tres inhibidores y se comparó su efecto protector frente al de Z-VAD-fmk. Solamente la combinación triple de los inhibidores Z-LEHD-fmk, Z-DEVD-fmk y Z-VEID-fmk, a 100  $\mu\text{M}$  cada uno, consiguió mimetizar al 85-90% el efecto protector del inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk (figuras 4.8.A y B y 4.9.).

La condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear inducidas tras el tratamiento con BMS-214662 (figura 4.3.) se evitaron en presencia del inhibidor selectivo Z-DEVD-fmk y del inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk en RPMI 8226/hp y U266 (figura 4.10.). En las células IM-9 y H929 se evitó la fragmentación nuclear, pero se detectó condensación de la cromatina perinuclear, característica de la acción de AIF (ver más adelante, apartado 4.1.7.).



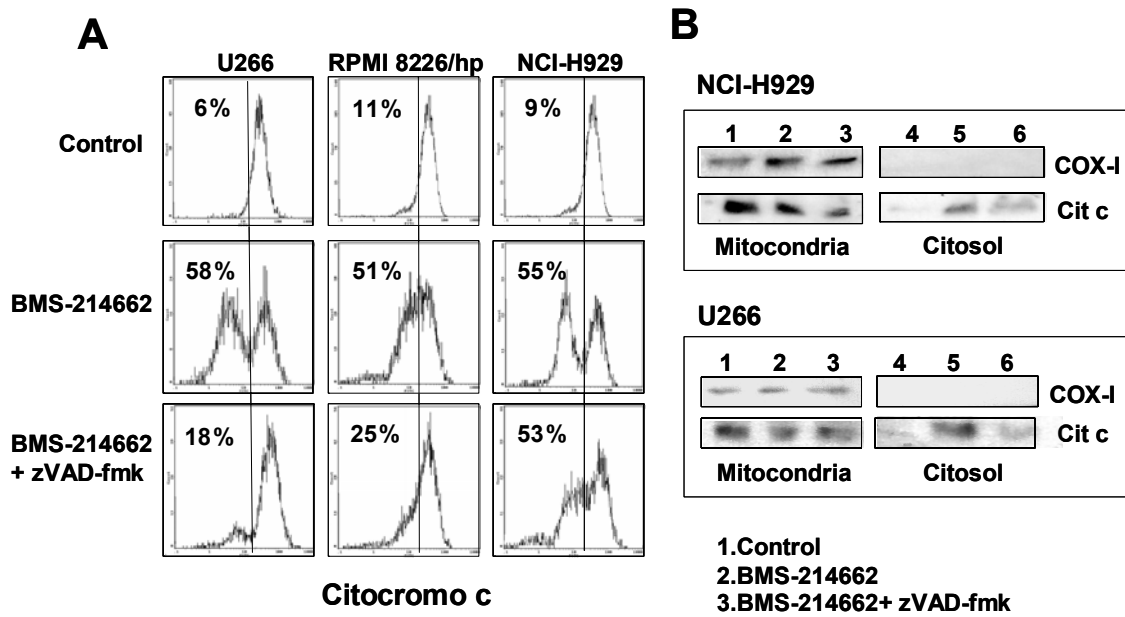
**Figura 4.9.- Efecto de los inhibidores selectivos de caspasas en la apoptosis inducida por BMS-214662 en las células U266.** Las células se incubaron durante 1h con el inhibidor de caspasa-2 (Z-DVAD-fmk), de caspasa-3 (Z-DEVD-fmk), de caspasa-6 (Z-VEID-fmk), de caspasa-9 (Z-LEHD-fmk) o mezclas de ellos (todos a 100  $\mu\text{M}$ ) en medio completo, según se indica. Posteriormente se añadió BMS-214662 1 $\mu\text{M}$  y se incubaron 22h más. La viabilidad se estimó por pérdida del  $\Delta\Psi_m$  mediante la sonda DiOC<sub>6</sub>(3). Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.



**Figura 4.10.- Efecto de Z-DEVD-fmk y Z-VAD-fmk en la condensación y fragmentación nuclear inducida por BMS-214662.** Las células se pre-trataron durante 1 h con Z-DEVD-fmk o Z-VAD-fmk (100  $\mu$ M) y después se añadió BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M en IM-9 y RPMI 8226/hp, y 1  $\mu$ M en U266) y se incubaron 22 h más. Transcurrido este tiempo, se tiñeron con PPDA y se observaron y fotografiaron por microscopía de fluorescencia. Ambos inhibidores impidieron la condensación y fragmentación nuclear en RPMI 8226/hp y U266 (figura 4.3.).

#### **4.1.6.- Liberación de citocromo c mitocondrial inducida por BMS-214662 y su dependencia de la acción de las caspasas.**

Se analizó la salida de citocromo c de las mitocondrias en la apoptosis inducida por BMS-214662 en las líneas NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266 y la dependencia de este proceso de la acción de las caspasas. Para ello, se emplearon dos métodos diferentes: citometría de flujo y fraccionamiento subcelular seguido de análisis por western blotting. Los resultados de citometría indicaron que el tratamiento con BMS-214662 induce la liberación de citocromo c al citosol en todas las líneas estudiadas (figura 4.11.A) y que el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk previene gran parte de la liberación de citocromo c en la células U266 y RPMI 8226/hp pero no en las células NCI-H929 (figura 4.11.A), lo que concuerda con el efecto inhibitor de Z-VAD-fmk sobre la exposición de PS, la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la muerte celular en U266 y RPMI 8226/hp, pero no en NCI-H929 (figura.4.8.). El fraccionamiento subcelular, realizado sólo en las células H929 y U266, condujo a resultados similares.



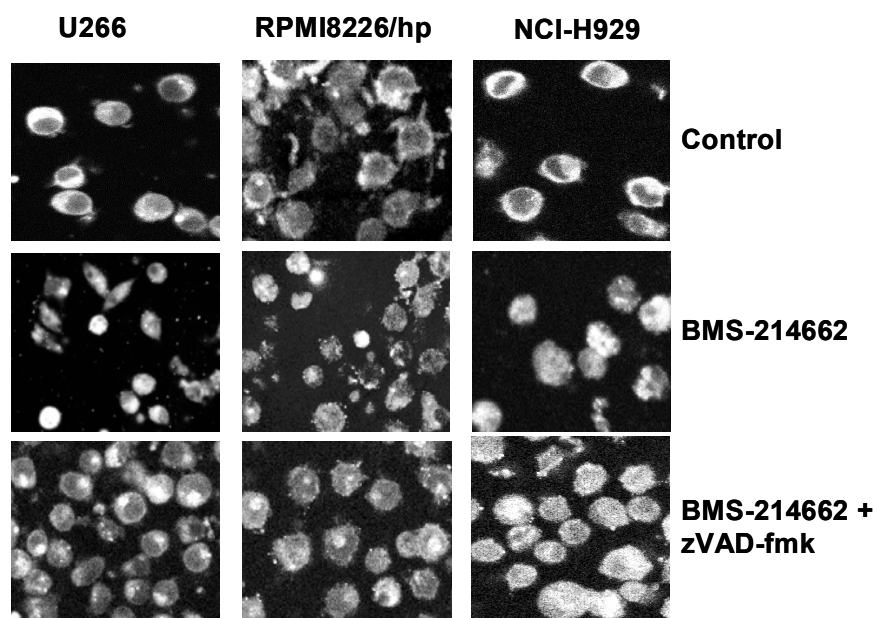
**Figura 4.11.- Liberación de citocromo c inducida por BMS-214662.**(A) Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266) en ausencia o presencia de Z-VAD-fmk (100  $\mu$ M). Tras esto, se permeabilizaron, se fijaron, se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo c nativo (6H2.B4) y se analizaron por citometría de flujo. (B) Las células se trataron análogamente a (A) y se prepararon fracciones subcelulares (membranosa y citosólica) que se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% e inmunotransferencia. Como control de la integridad mitocondrial se usó la subunidad I de la Citocromo oxidasa (COX I).

#### 4.1.7.- Traslocación nuclear de la proteína AIF inducida por BMS-214662.

AIF es una proteína mitocondrial que al producirse la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  es liberada al citoplasma e importada al núcleo (Susin et al., 1999). Una vez en el núcleo, AIF induce, mediante un mecanismo independiente de caspasas, condensación de la cromatina en la periferia nuclear y fragmentación del ADN en fragmentos de alto peso molecular (Susin et al., 1999).

Se analizó la localización intracelular de AIF mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal, antes y después del tratamiento con BMS-214662 en las células NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266. El análisis reveló que las células sin tratar mostraban un marcaje punteado, principalmente perinuclear, congruente con su localización citosólica (figura 4.12.), mientras que en las células tratadas con BMS-214662 un alto porcentaje presentaban con un marcaje difuso localizado en el citoplasma y en el núcleo.

La translocación de AIF fue bloqueada por la inhibición de caspasas con Z-VAD-fmk en las células U266 y RPMI 8226/hp, pero no en NCI-H929, (figura 4.12.) El tratamiento con el inhibidor selectivo de las caspasa -3, Z-DEVD-fmk (100  $\mu$ M) sin embargo, no impidió la translocación de AIF en ninguna línea celular.

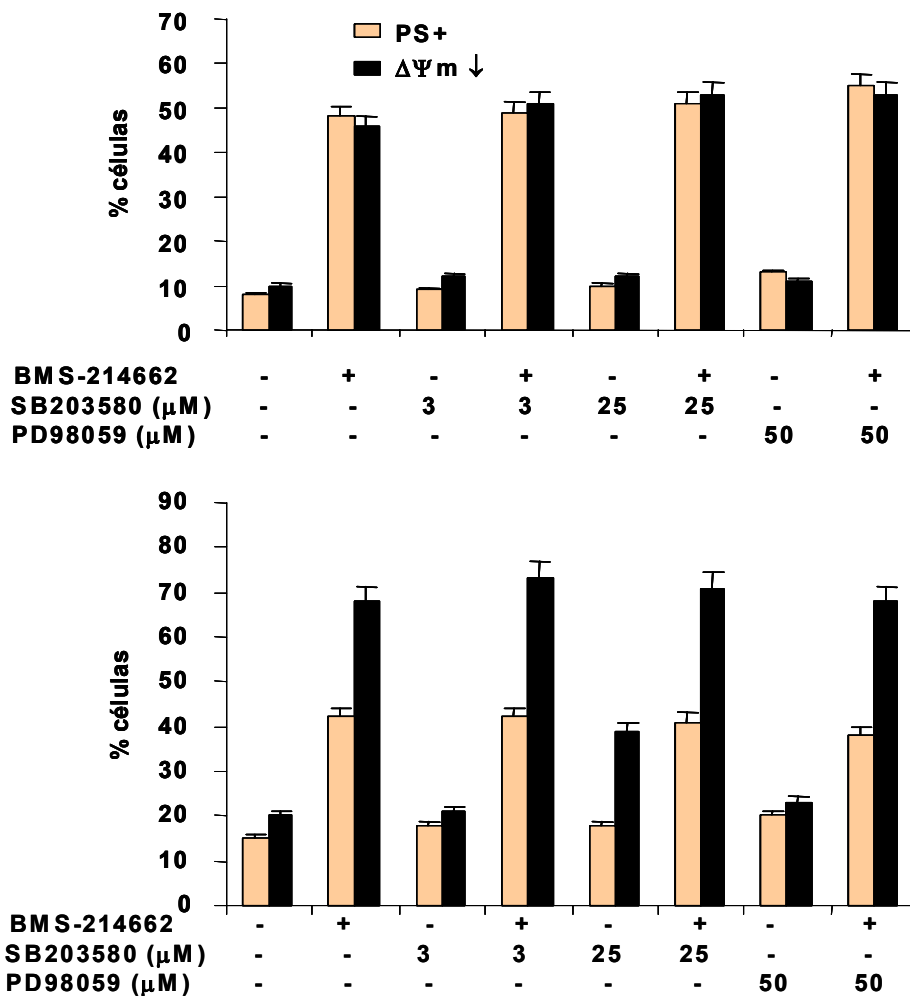


**Figura 4.12.- Translocación nuclear de AIF.** Las células se trataron durante 22h con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266) en ausencia o presencia de Z-VAD-fmk 100  $\mu$ M. Tras esto, se fijaron con paraformaldehído y se marcaron con un anticuerpo anti-AIF. Finalmente se analizaron por microscopía confocal. Las células tratadas con BMS-214662 muestran una localización nuclear de AIF, que excepto en el caso de las células NCI-H929, fue bloqueada por Z-VAD-fmk.

#### 4.1.8.- Evaluación de la posible implicación de las MAP-quinasas p38 y JNK en la apoptosis inducida por BMS-214662.

La familia de quinasas activadas por mitógeno **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), incluye cuatro subfamilias de quinasas: **JNK** (*c-Jun-terminal Kinase*), **p38MAPK**, **ERK** (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) y **Erk5** (Carvajal-Vergara et al., 2005). Muchos de los fármacos utilizados en quimioterapia activan alguna de estas vías de transducción. En algunos casos su activación es independiente de la inducción de apoptosis (Okano and Rustgi, 2001), en otros, parece ser previa a la activación de caspasas (Sánchez-Pérez and Perona, 1999). Se evaluó la posible contribución de esta familia de quinasas en la apoptosis inducida por BMS-214662 en las líneas celulares RPMI 8226/hp y U266 utilizando los inhibidores **SB203580** y **PD98059**.

La molécula **SB203580** inhibe preferentemente a la p38MAPK a bajas concentraciones (3 $\mu$ M), pero también inhibe a la JNK a concentraciones mayores (25 $\mu$ M) (Clerk and Sugden, 1998). Las células se incubaron con el inhibidor 1 h antes de la adición de BMS-214662 y transcurrido el tiempo de incubación con la droga se cuantificó la muerte celular sin observarse protección y descartándose por tanto la implicación de JNK o p38MAPK en el mecanismo de inducción de apoptosis del FTI en estas células (figura 4.13.). Análogamente se analizó el efecto de la inhibición de la ERK por **PD98059** (Davies et al., 2000) en la citotoxicidad inducida por BMS-214662, encontrándose que este inhibidor tampoco ofrecía protección significativa (figura 4.13.)



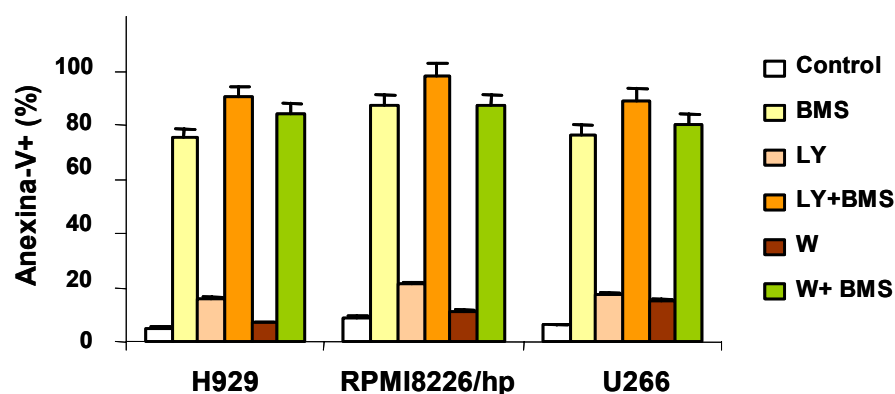
**Figura 4.13.- La inhibición de las MAP-quinasas no protege de la apoptosis inducida por BMS-214662 en las células U266 (A) y RPMI 8226/hp (B).** Las células ( $3 \times 10^5$  cél/ml) se pre-incubaron en medio completo durante 1 h con SB203580 (3 ó 25  $\mu$ M) o PD98059 (50  $\mu$ M), según se indica. Seguidamente se añadió BMS-214662, 1  $\mu$ M (A) y 0,3  $\mu$ M (B) y se incubaron durante 21 h más. La viabilidad celular se analizó mediante translocación de PS y pérdida del  $\Delta\Psi_m$ . Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.



#### 4.1.9.- Evaluación de la implicación de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por BMS-214662.

Se ha relacionado el efecto de los FTIs con el grado de actividad de esta vía al observarse que tras el tratamiento de células tumorales con alguno de estos agentes se reduce la fosforilación de Akt (Sebti and Der, 2003). Se ha planteado como hipótesis que por encima de Akt debería existir una proteína activadora susceptible de farnesilación que al inhibirse su farnesilación produciría una inhibición global de la vía PI3K/Akt y con ello la inducción de apoptosis (Sebti and Der, 2003). Además, la sobre-expresión de Akt, pero no de H-Ras, insensibiliza a las células NIH 3T3 a la apoptosis inducida por el inhibidor FTI-277, y células tumorales humanas con Akt constitutivamente activo son resistentes a la apoptosis inducida por el FTI-277 (Jiang et al., 2000).

Para ver si esta vía era o no relevante en la supervivencia de las células de mieloma y en la apoptosis inducida por BMS-214662, se analizó el efecto de dos inhibidores diferentes de la PI3K, LY294002 y wortmanina, siendo este último más específico (Davies et al., 2000). A las dosis y tiempos utilizados, estos inhibidores por si solos no indujeron ninguna toxicidad, por lo que la vía PI3K/Akt no parece imprescindible para la supervivencia celular (figura 4.14.). Cuando se administraron conjuntamente los inhibidores y BMS-214662 tampoco se observó variación significativa en la toxicidad del FTI (figura 4.14.).



**Figura 4.14.- Efecto de los inhibidores de la vía PI3K/Akt sobre la toxicidad de BMS-214662.** Las células ( $3 \times 10^5$  cél/ml) se preincubaron en medio completo durante 1 h con LY294002 (10  $\mu$ M) o Wortmanina (100 nM), según se indica. Seguidamente se añadió BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3  $\mu$ M RPMI 8226/hp y 1  $\mu$ M en U266) y se incubaron 22 h más. La viabilidad celular se analizó mediante la unión de anexina-V-PE. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

#### **4.1.10.- Evaluación de la implicación en la apoptosis de distintas dianas moleculares de BMS-214662.**

##### **4.1.10.1.- Ras como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.**

Existen tres genes *ras* que codifican para cuatro proteínas Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras-4A y K-Ras-4B). Las proteínas Ras son GTPasas que participan a modo de interruptores celulares, unen e hidrolizan GTP, presentando un estado inactivo (Ras - GDP) o activo (Ras-GTP). Ras-GTP regula positivamente la proliferación celular y es necesaria para la entrada en fase S del ciclo celular (Mulcahy et al., 1985). Existe una alta tasa de mutación de Ras en cánceres humanos. En general, todas estas mutaciones suelen suprimir la actividad GTPasa, permitiéndolo que Ras permanezca constantemente unido a GTP y constitutivamente activo (Bos, 1989). Sin embargo, para que Ras desempeñe correctamente su función es necesario su previo anclaje a la membrana plasmática, lo que consigue gracias a la incorporación de una cadena isoprenoide hidrofóbica. En condiciones basales, la modificación que experimentan las proteínas Ras es siempre farnesilación, aunque en condiciones de inhibición de la actividad farnesil-transferasa, K-Ras y N-Ras, pero no H-Ras, son geranilgeraniladas con lo cual siguen manteniendo su asociación a la membrana plasmática y su función (Whyte et al., 1997; Sebti, 2003). Estos resultados plantean que la actividad anti-tumoral de los FTIs dependería más de la inhibición de la farnesilación de otras proteínas que de la de N-Ras o K-Ras, ya que al ser geranilgeraniladas seguirían en estado activo, y ponen de manifiesto que los FTIs podrían considerarse más bien compuestos anti-FTasa que compuestos anti-Ras (Sebti and Der, 2003).

Múltiples estudios apoyan la independencia entre el estado de Ras y la sensibilidad a los FTIs. Así, los FTIs inhiben el crecimiento de muchas líneas tumorales independientemente de que expresen Ras silvestre o mutado y han demostrado ser capaces de inhibir el crecimiento *in vivo* de tumores con Ras silvestre (Liu et al., 1998; Feldkamp et al., 2001).

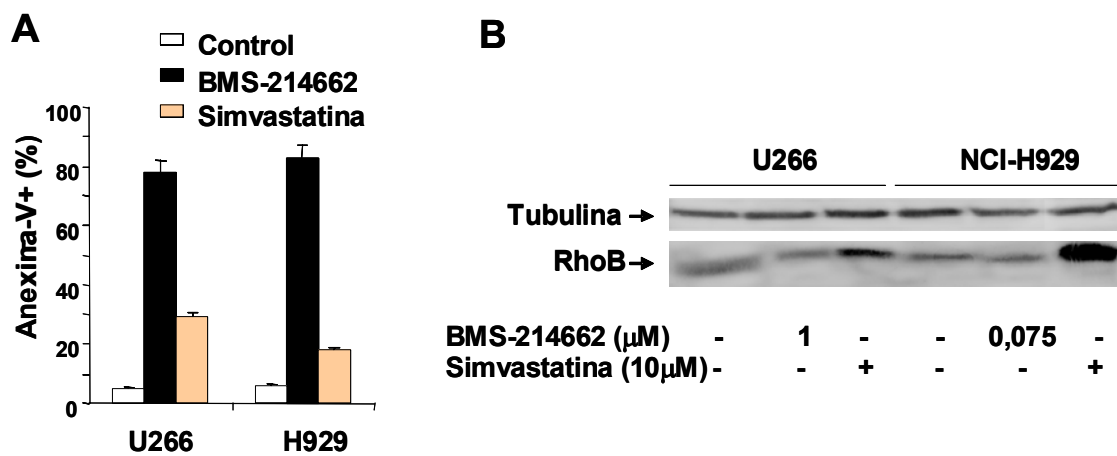
En nuestro caso, el tratamiento con BMS-214662 inhibió el crecimiento celular e indujo apoptosis en todas las líneas celulares independientemente del estado de Ras (NCI-H929, N-Ras; RPMI 8226/hp, K-Ras; U266, Ras silvestre) (Bolick et al., 2003), descartándose a Ras como diana principal, aunque si pudiera existir cierta relación entre el estado de Ras y la dosis de BMS-214662 necesaria para inducir apoptosis (figura 4.3.A.).

#### 4.1.10.2.- Rho B como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.

Las proteínas Rho son GTPasas de la superfamilia Ras que participan en la regulación del citoesqueleto de actina, la adhesión y la movilidad celular, la proliferación y la apoptosis (Wherlock et al., 2004). Una de estas proteínas es RhoB, localizada en endosomas tempranos y membranas nucleares. Está especializada en el tráfico intracelular de receptores de citoquinas como el del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Liu et al., 2000). La isoprenilación de RhoB es crucial para su correcta localización en membrana, para establecer interacciones con otras proteínas y para desempeñar sus funciones fisiológicas. La mayor parte de RhoB se geranilgeranila (70%), excepto una pequeña cantidad que se farnesila. En presencia de un FTI, todo el RhoB celular se geranilgeranila, alterándose su localización (deja de estar presente en la membrana de los endosomas) (Lebowitz et al., 1995) y alterándose el transporte del receptor de EGF, contenido en los endosomas, hasta la membrana plasmática (Wherlock et al., 2004). El bloqueo en la ruta de secreción, junto con las alteraciones del citoesqueleto celular, podrían ser las causas que explicasen la toxicidad de los FTIs si RhoB fuera la diana principal. Sin embargo, posteriormente, múltiples estudios han rechazado a RhoB como mediadora de la actividad tumoral de los FTIs (Sebti, 2003) y se ha demostrado que la sobre-expresión de cualquiera, RhoB, RhoB-F o RhoB-GG, es capaz de inhibir el crecimiento tumoral (Chen et al., 2000).

Para poder evaluar si BMS-214662 estaba afectando a los niveles de RhoB e induciendo un acúmulo de la forma no farnesilada en nuestras células, realizamos extractos de proteínas de células U266 y H929 (en las que la apoptosis inducida por el FTI iba acompañada de cambios más aparentes en la morfología celular) tratadas con BMS-214662 o no (controles), que después se analizaron por electroforesis e inmunotransferencia. Dado que los niveles basales de RhoB son muy bajos en estas células, también se realizaron experimentos en células tratadas con simvastatina. La simvastatina es un compuesto de la familia de las estatinas, empleado como fármaco en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Actúa bloqueando la conversión de hidroximetilglutaril-CoA en mevalonato. Al ser el mevalonato precursor de farnesil-pirofosfato y de geranilgeranil-pirofosfato, la simvastatina va a inhibir tanto la farnesilación como la geranilgeranilación de RhoB, lo que impedirá la degradación de la proteína que se acumulará en el citosol en la forma no isoprenilada (Stamatakis et al., 2002).

En ambos tipos celulares el tratamiento con simvastatina indujo un aumento de los niveles de la proteína RhoB y el acúmulo de la forma no isoprenilada de ésta. Además, la simvastatina resultó un poco tóxica en las células U266 llegando a inducir apoptosis (figura 4.15.A). Las células U266 apoptóticas presentaban prolongaciones de su membrana en forma de pseudópodos que recordaban la morfología apoptótica inducida por el tratamiento con BMS-214662 (apartado 4.1.2.). El tratamiento con BMS-214662 no indujo acúmulo de RhoB en ninguna de las líneas y sólo en las células U266 la banda correspondiente a las células tratadas aparecía ligeramente retardada con respecto a la banda de las células control, consecuencia de la alteración en los procesos de isoprenilación por BMS-214662 en esas células (figura 4.15.B).



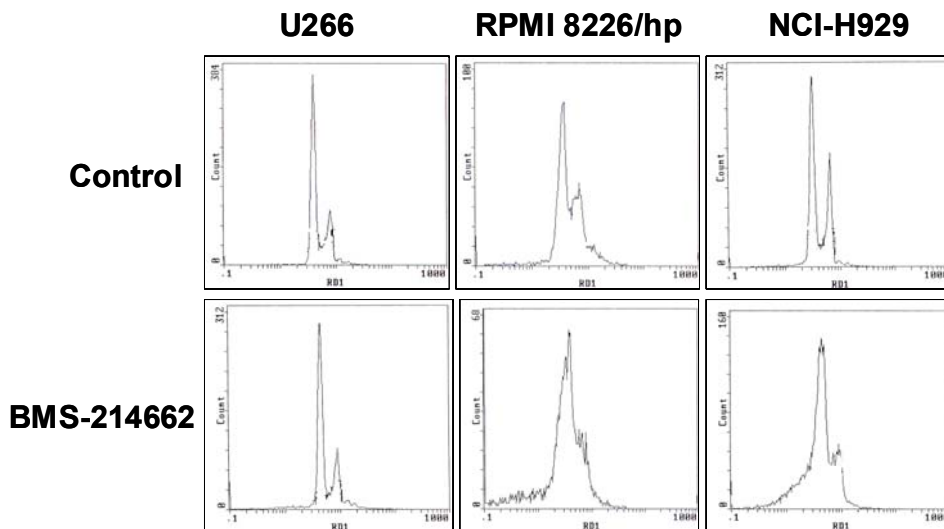
**Figura 4.15.- Efecto de BMS-214662 y de Simvastatina sobre la proteína RhoB. (A)** Las células ( $3 \times 10^5$  cél/ml) se incubaron en medio completo en presencia de BMS-214662 (75 nM en NCI-H929 y 1 μM en U266) o de simvastatina 10 μM durante 22h. Pasado este tiempo la apoptosis se evaluó por unión a anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. **(B)** Las células se trataron análogamente a (A) y transcurrido el tiempo de incubación se realizaron extractos celulares. Se analizaron los niveles de la proteína RhoB mediante electroforesis e inmunotransferencia. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de α-tubulina.

#### 4.1.10.3.- CENP-E y CENP-F como dianas candidatas en la apoptosis inducida por BMS-214662.

CENP-E y CENP-F son dos proteínas que se expresan preferencialmente durante la mitosis y que están implicadas en el punto de control de la transición G<sub>2</sub>-M del ciclo celular. Ambas contienen una secuencia CAAX en su extremo C-terminal y son sustrato de la FT pero no de la GGT-I.

En la literatura, existen trabajos que describen que la mayor parte de las líneas tumorales sensibles a los efectos de los inhibidores de farnesil-transferasas experimentan tras el tratamiento un acúmulo en G<sub>2</sub>-M (excepto las células con H-Ras activo que se acumularían en G<sub>1</sub>) (Ashar et al., 2000). Se han estudiado en más detalle los efectos de los FTIs sobre estas proteínas, observándose que la inhibición de la farnesilación no afecta a su localización en los cinetocoros, pero sí a la interacción entre CENP-E y los microtúbulos. Se ha propuesto que al inhibirse la farnesilación de CENP-E se altera la interacción microtúbulo-centrómero bloqueándose así la división celular en metafase (Ashar et al., 2000).

Para evaluar si CENP-E y CENP-F eran relevantes en la toxicidad inducida por los FTIs, se analizó si BMS-214662 inducía parada del ciclo. En ningún caso se observó acumulación en G<sub>2</sub>-M. En las células U266 el tratamiento con BMS-214662 no afectó a la distribución celular en cada una de las fases del ciclo (figura 4.16.). En las líneas RPMI 8226/hp y H929, aunque BMS-214662 si indujo parada de ciclo, las células se acumularon en G<sub>1</sub>. Estos efectos inducidos por el FTI sobre las células parecen corresponder mejor con el estado de p53 (mutado y no funcional en U266; funcional en RPMI 8226/hp y H929 (Bolick et al., 2003)), que con la posible implicación de CENP-E y CENP-F como responsables de la toxicidad del FTI.

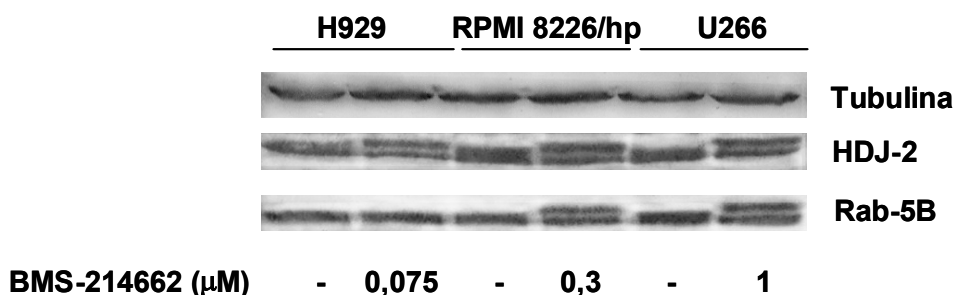


**Figura 4.16.- Efecto de BMS-214662 sobre en ciclo celular en U266, RPMI 8226/hp y H929.** Las células ( $1 \times 10^6$  cél/ml) se incubaron en medio completo en presencia o no de BMS-214662 (75 nM en NCI-H929 y 1  $\mu$ M en U266) durante 22h. Posteriormente se fijaron con etanol al 70%, se marcaron con yoduro de propideo (PI) y se analizaron por citometría de flujo.

#### **4.1.10.4.- RabGGT como diana candidata en la apoptosis inducida por BMS-214662.**

Recientemente se ha propuesto una nueva candidata como diana de algunos FTIs, la enzima Rab geranilgeranil-transferasa (RabGGT) (Lackner et al., 2005). A diferencia de las enzimas FT y GGT, que reconocen motivos CAAX en el extremo C-terminal de sus sustratos y modifican primero la cisteína por isoprenilación para favorecer así posteriores modificaciones (Clarke,1992), la RabGGT reconoce motivos CXC, en los que isoprenila ambas cisteínas y no se producen posteriores modificaciones (Lackner et al., 2005). Pese a las diferencias que existen entre ellas, las tres prenilasas tienen sitios activos y mecanismos de modificación del sustrato extraordinariamente similares, lo cual permite que un mismo inhibidor, por ejemplo un FTI, pueda inhibir a la vez la actividad de las tres enzimas (Long et al.,2002).

Se ha demostrado que la pérdida de función de RabGGT induce apoptosis independientemente de p53 por alteración de numerosas proteínas involucradas en la ruta secretora (Lackner et al., 2005). Para valorar si este podía ser el caso en nuestro modelo, determinamos el grado de inhibición de la enzima RabGGT tras el tratamiento de las células con BMS-214662. Para ello, evaluamos la ausencia de isoprenilación en la proteína Rab5B, una proteína involucrada en la ruta secretora y diana de la enzima RabGGT, y en la proteína HDJ-2, considerada un buen marcador de inhibición de la actividad farnesil-transferasa, en células NCI-H929, RPMI 8226/hp y U266 tratadas con BMS-214662. En las tres líneas el tratamiento con BMS-214662 inhibió la actividad farnesil-transferasa, como se esperaba, y en RPMI 8226/hp y U266 , BMS-214662 también inhibió la actividad RabGGT (figura 4.17.), como muestra la banda de menor movilidad correspondiente a la proteína no isoprenilada. Sin embargo, en las células NCI-H929 no se observó la banda indicativa de inhibición de la actividad RabGGT (figura 4.17.). Para averiguar si esta falta de inhibición se debía a la baja dosis de BMS-214662 empleada en las células NCI-H929, las células se trataron con BMS-214462 (1  $\mu$ M) durante 10 h (89% apoptosis), pero el análisis por western blotting de los correspondientes extractos celulares tampoco mostró ninguna banda retardada. Esto sugiere que la ausencia de inhibición de la actividad RabGGT es una característica intrínseca de las células H929, y que la inhibición de esta actividad enzimática no está implicada en la apoptosis inducida por BMS-214662 en estas células, aunque la inhibición de la RabGGT si pudiera estar implicada en la inducción de apoptosis por BMS-214662 en RPMI 8226/hp y U266.



**Figura 4.17. – BMS-214662 inhibió la actividad RabGGT en algunas líneas de mieloma.** Las células se trataron con BMS-214662 (75 nM en NCI-H929, 0,3 μM RPMI8226/hp y 1 μM en U266) durante 22h. Transcurrido este tiempo, se realizaron extractos celulares totales y la proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Para evaluar la inhibición de actividad RabGGT, se usaron anticuerpos específicos contra Rab5B, una proteína diana de la enzima. Como control de la inhibición de actividad FT se empleó un anticuerpo específico contra HDJ-2 (apartado 4.1.3.).

#### 4.1.11.- Discusión.

Los FTIs fueron diseñados como agentes anti-cancerígenos dirigidos contra la proteína oncogénica Ras (Adjei et al., 2001). La mutación de Ras es frecuente en el mieloma múltiple, y dado que los pacientes con Ras mutado responden peor a la quimioterapia y tienen una media de supervivencia menor (Santucci et al., 2003), se convierte en un buen candidato, a priori, a la terapia con FTIs.

Los ensayos clínicos realizados hasta ahora les auguran un futuro prometedor como agentes anti-neoplásicos en diferentes tipos de tumores. Sin embargo, la respuesta al tratamiento no siempre correlaciona con la presencia de mutaciones en Ras, lo que sugiere que deben ser otras proteínas farnesiladas las dianas moleculares relevantes (Morgan et al., 2003). Se han realizado múltiples estudios en busca de nuevas dianas sin llegar a conclusiones claras. Es muy probable que la actividad anti-tumoral de los FTIs no pueda explicarse por medio una sola proteína, sino por una combinación de varias de ellas. Además, las dianas de los FTIs parecen ser diferentes dependiendo del cáncer o incluso de la línea celular de que se trate, y también dependiendo del FTI objeto de estudio (Sebti and Der, 2003). Esto hace que mientras que los ensayos clínicos con FTIs como drogas anti-tumorales continúan, la búsqueda de las proteínas farnesiladas responsables de su acción quede todavía sin resolver y complicándose cada vez más.

Gran parte de los FTIs inducen solamente inhibición del crecimiento en las células sensibles, favoreciendo muerte por negligencia pero no induciendo directamente apoptosis ( Du et al., 1999; Le Gouill et al., 2002; Bolick et al., 2003). En algunas líneas celulares de mieloma, FTIs como R115777 (Zarnestra®) y el ácido perílico si inducen una clara apoptosis (Beaupre et al., 2003, 2004). Como mostramos en este estudio, también BMS-214662 es un potente inductor de apoptosis en células de mieloma, incluso a dosis más bajas que otros FTIs (Le Gouill et al., 2002; Bolick et al., 2003). Se ha sugerido que su actividad apoptótica podría ser independiente de la actividad inhibidora de la FT (Sebti and Der,2003; Basso et al., 2006), explicando así su mayor toxicidad respecto a otros FTIs.

En nuestras células, BMS-214662 induce apoptosis a través de la vía mitocondrial, con pérdida del potencial de membrana mitocondrial, salida de citocromo c al citosol, activación de caspasas y translocación de AIF al núcleo. También provoca cambios en los niveles de algunas proteínas de la familia Bcl-2, anti-apoptóticas (reducción de los niveles de Mcl-1) y pro-apoptóticas (aumento de los niveles de PUMA a tiempos cortos y cambio conformacional de Bax y Bak). La contribución relativa de las caspasas y de las proteínas de la familia Bcl-2 dependió de cada línea celular. Así, el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk, protege de la muerte celular inducida por BMS-214662 en las células U266 y RPMI 8226/hp durante las primeras 30 y 48 h respectivamente, pero no a tiempos más largos. Por el contrario, en NCI-H929 tan sólo impide la aparición de ciertas características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis, pero no de la muerte celular. Ninguno de los inhibidores selectivos de caspasas empleados (Z-VDVAD-fmk, Z-DEVD-fmk, Z-VEID-fmk, Z-LEHD-fmk y Z-IETD-fmk) es capaz por si sólo de impedir la muerte celular inducida por BMS-214662, aunque la triple combinación de Z-DEVD-fmk + Z-VEID-fmk + Z-LEHD-fmk si mostró un efecto protector de la apoptosis comparable al de Z-VAD-fmk. Estos resultados indican que no existe ninguna caspasa que se active a nivel pre-mitocondrial y que las aparentes diferencias encontradas entre la protección conferida por Z-LEHD-fmk (inhibidor de la caspasa-9) y Z-VAD-fmk (inhibidor general de caspasas) se deben probablemente a la mejor biodisponibilidad del segundo. Estos resultados también descartan el posible papel iniciador de la apoptosis de la caspasa-2.

Procesos como el cambio conformacional de Bax y Bak y la disminución de los niveles de Mcl-1 no son inhibidos por Z-VAD-fmk en ninguna de las líneas analizadas, mientras que otros procesos como la caída del potencial mitocondrial, la liberación de citocromo c y la translocación de AIF sí lo son en las líneas U266 y RPMI 8226/hp.

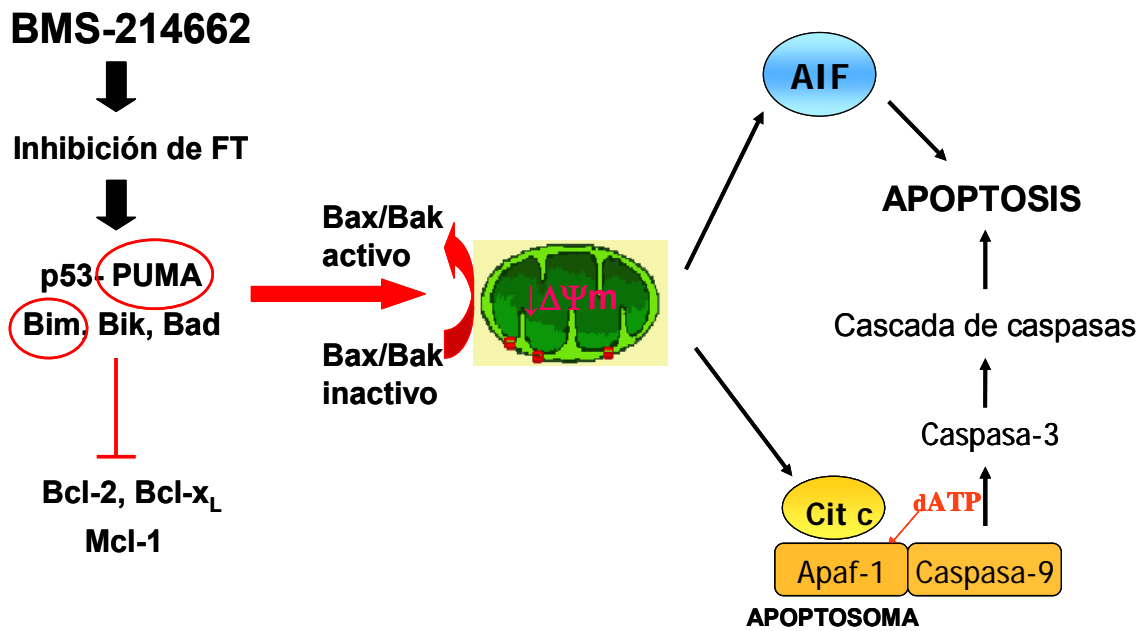


Este resultado concuerda con publicaciones previas, que muestran que la salida de citocromo c puede ocurrir en dos etapas, siendo la primera independiente de la participación de las caspasas, y la segunda, mediada por un ciclo de retroalimentación ejecutado por ellas (Chen et al., 2000).

Proponemos que en la apoptosis inducida por BMS-214662 existe un mecanismo iniciador dependiente de PUMA/Bax/Bak/Mcl-1, previo a la activación de caspasas, a partir del cual hay que hacer una distinción entre líneas:

- En NCI-H929, la oligomerización de Bax/Bak sería suficiente para inducir fallo mitocondrial y liberación de proteínas apoptogénicas, no siendo necesario el ciclo de retroalimentación de caspasas (figura 4.18.).
- En RPMI 8226/hp y U266, la oligomerización de Bax/Bak sólo permitiría una pequeña salida de citocromo c, haciéndose necesario el ciclo de retroalimentación mediado por caspasas para que se induzca una segunda salida de citocromo c (en mayor cantidad), acompañada de la salida de los otros factores apoptogénicos, entre ellos AIF (figuras 4.19. y 4.20.).

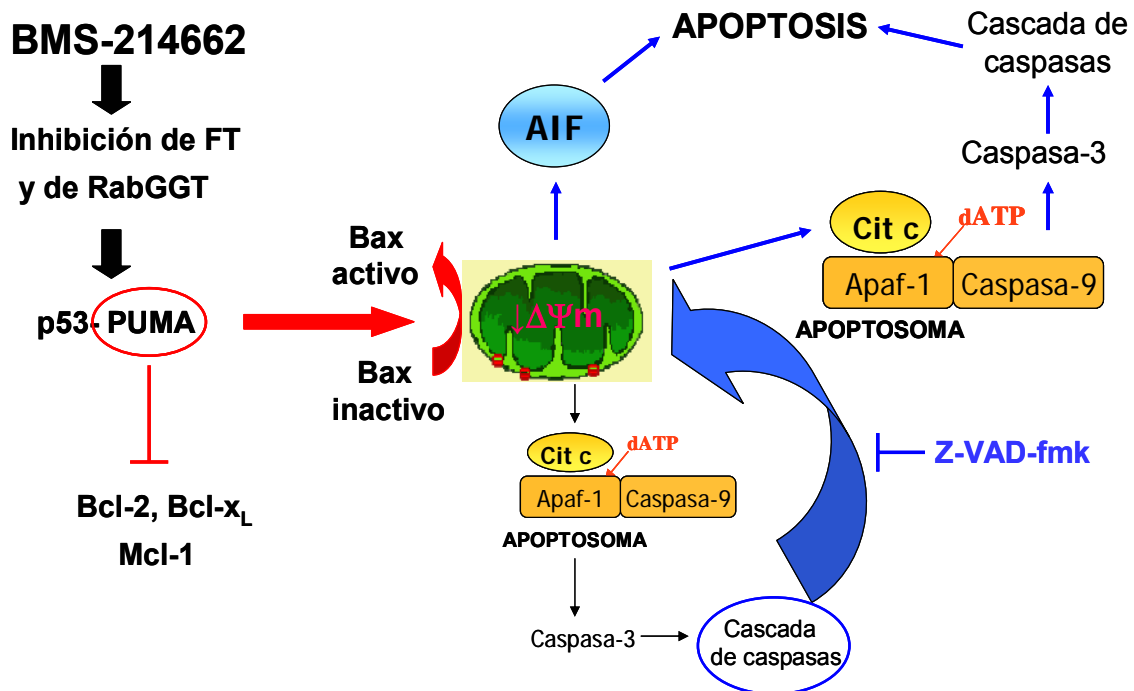
Las diferencias en el mecanismo apoptótico observadas entre las líneas de mieloma, no son sino un mero reflejo de la realidad: las diferencias y la gran diversidad existente entre las células de mieloma obtenidas de diferentes pacientes. La explicación al diferente comportamiento entre líneas podría estar en la presencia o ausencia de diferentes proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (de tipo “sólo BH<sub>3</sub>”) en cada una de las líneas, proporcionando así mayor o menor capacidad para neutralizar el efecto de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. En todos los casos, e independientemente de que se necesiten o no para la ejecución del proceso apoptótico, las caspasas aceleran el proceso de muerte celular y son las responsables de la adquisición de la morfología y de las características bioquímicas de la apoptosis. Así, en todas las líneas estudiadas, tras la pérdida del potencial mitocondrial y la liberación de citocromo c, se produce el reclutamiento de la caspasa-9, la formación del apoptosoma, la activación en cascada de caspasas, la degradación de sus sustratos y la acción nuclear de AIF, dando lugar a una morfología apoptótica común.



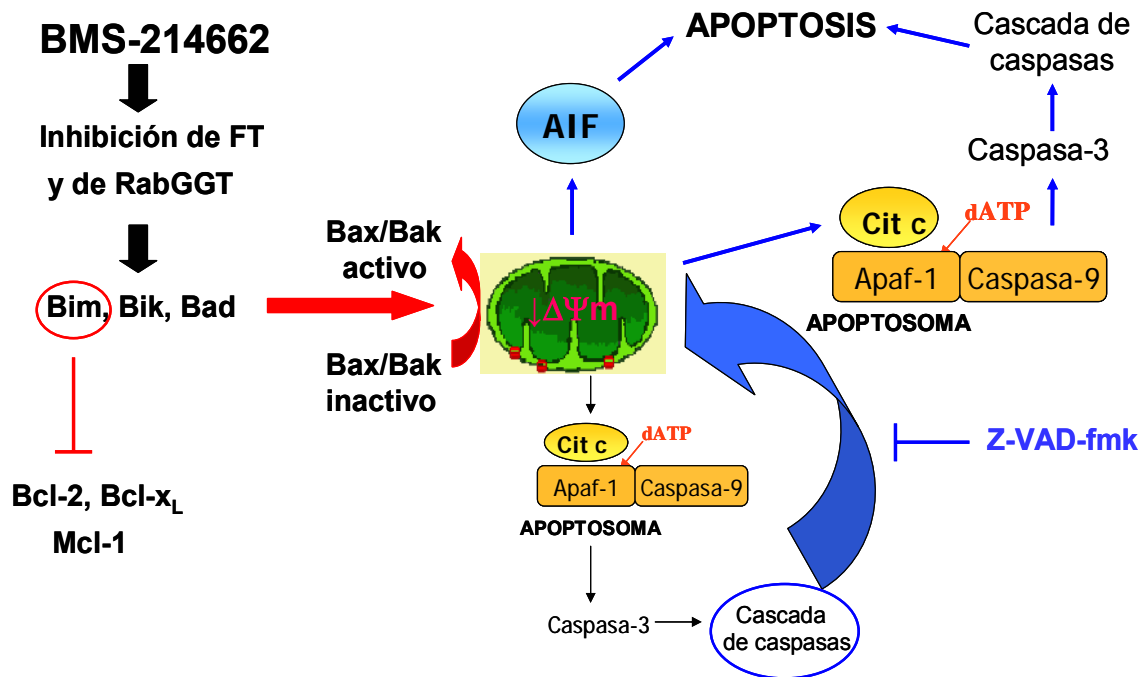
**Figura 4.18.- Esquema hipotético del mecanismo de inducción de apoptosis de BMS-214662 en las células NCI-H929.** BMS-214662 es internalizado en las células e inhibe la actividad de la enzima farnesil-transferasa (FT), impidiendo de este modo la farnesilación y posterior procesamiento de diferentes proteínas diana. Como consecuencia, por un lado aumentan los niveles de p53 y PUMA, y por otro se activan y /o translocan a la mitocondria las proteínas pro-apoptóticas Bim, Bik y Bad. Estas proteínas, mayoritariamente Bim y PUMA (Willis and Adams, 2005) neutralizan el efecto de las proteínas anti-apoptóticas e inducen el cambio conformacional de Bax y Bak y la formación de canales proteicos en la membrana mitocondrial. Como resultado se produce la pérdida del potencial mitocondrial y la salida de citocromo c y AIF al citosol. Citocromo c se une a Apaf-1 y el complejo activa la caspasa-9, que desencadena la cascada de activación de caspasas. AIF se transloca al núcleo y contribuye a la condensación y fragmentación de la cromatina. Todo ello conduce finalmente a la muerte de la célula por apoptosis.

La toxicidad inducida por BMS-214662 no parece estar mediada por la activación de las MAP-quinasas ni por la inhibición de la vía PI3K/Akt. Respecto a los análisis realizados en relación a las proteínas farnesiladas candidatas a ser dianas de BMS-214662 relevantes para la apoptosis, aunque no han señalado a ninguna como diana única y clara, si permiten extraer algunas conclusiones. La apoptosis inducida por BMS-214662 es independiente del estado mutacional de Ras, aunque las dosis necesarias de FTI para inducir apoptosis parecen guardar cierta relación con la existencia o no de mutación. RhoB podría ayudar a la inducción de apoptosis en U266, pero sería una diana secundaria, puesto que su acúmulo causa algo de toxicidad, aunque considerablemente menor a la inducida por el FTI. CENP-E y CENP-F no parecen estar implicadas en la apoptosis inducida por BMS-214662 en las líneas empleadas, ya que ninguna de las líneas mostró bloqueo del ciclo celular en G<sub>2</sub>-M tras el ratamiento. La inhibición de la RabGGT podría ser responsable de la toxicidad

observada en RPMI 8226/hp y U266, pero no en NCI-H929. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis antes comentada de que la actividad anti-tumoral de los FTIs probablemente no pueda ser explicada por la inhibición de la farnesilación de una única proteína diana, sino que se deba más bien a los efectos aditivos de varias y diferentes proteínas susceptibles de farnesilación (Sebti and Der, 2003). También parece que dependiendo del FTI que se ensaye y de los modelos de cáncer estudiados e incluso dentro de cada modelo, dependiendo de cada línea celular o de cada paciente, las dianas implicadas podrían ser diferentes (Sebti and Der, 2003).



**Figura 4.19.- Esquema hipotético del mecanismo de inducción de apoptosis de BMS-214662 en las células RPMI 8226/hp.** BMS-214662 es internalizado en las células e inhibe la actividad de la enzima farnesil-transferasa (FT) y de la enzima Rab-geranilgeraniltransferasa (RabGGT), impidiendo de este modo la farnesilación y posterior procesamiento, o la geranilgeranilación, de diferentes proteínas diana. Como consecuencia, aumentan los niveles de p53 y este induce un aumento de los niveles de la proteína pro-apoptótica PUMA. La carencia de otras proteínas pro-apoptóticas como Bim dificulta la neutralización de proteínas anti-apoptóticas, ejecutada únicamente por PUMA, y el cambio conformacional de Bax/Bak (sólo se produce el cambio conformacional de Bax pero no de Bak). Como resultado, apenas hay caída del potencial mitocondrial y sólo es posible una pequeña salida de citocromo c, que se une a Apaf-1 y activa un poco de caspasa-9, que a la vez activa un poco de caspasa-3 y caspasa-6. Las pequeñas cantidades de caspasas activas inducen por un mecanismo desconocido de retroalimentación una mayor caída del potencial mitocondrial, y favorecen una segunda salida de citocromo c, esta vez considerablemente mayor y acompañada de la salida de AIF. Citocromo c se une a más Apaf-1, activando más caspasa-9 y desencadenando la cascada de activación de caspasas. AIF se transloca al núcleo y contribuye a la condensación y fragmentación de la cromatina. Todo ello conduce finalmente a la muerte de la célula por apoptosis. Este modelo explica como el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk impide la muerte celular al inhibir el ciclo de retroalimentación de las caspasas, verdadero responsable de dicha muerte.



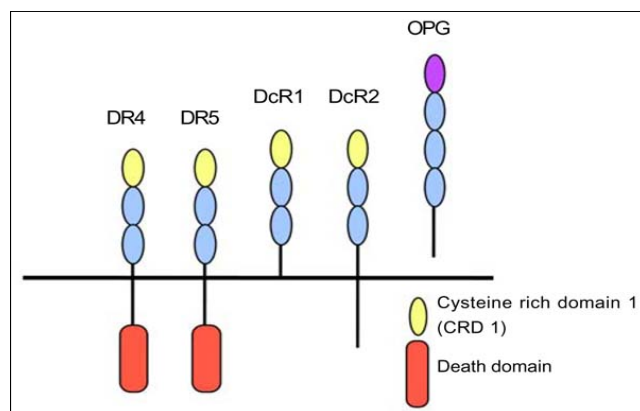
**Figura 4.20.- Esquema hipotético del mecanismo de inducción de apoptosis de BMS-214662 en las células U266.** BMS-214662 es internalizado en las células e inhibe la actividad de la enzima farnesil-transferasa (FT) y de la enzima Rab-geranilgeraniltransferasa (RabGGT), impidiendo de este modo la farnesilación y posterior procesamiento, o la geranilgeranilación, de diferentes proteínas diana. Como consecuencia, se activan y/o translocan a la mitocondria las proteínas pro-apoptóticas Bim, Bik y Bad. Estas proteínas, principalmente Bim (Willis and Adams, 2005) neutralizan el efecto de las proteínas anti-apoptóticas e interactúan, todas ellas, con Bax/Bak, permitiendo el cambio conformacional y la formación de canales proteicos en la membrana mitocondrial. Al ser estas células p53 mutado, este no interviene en la fase de inducción de apoptosis y congruentemente tampoco se detecta un aumento significativo de los niveles de PUMA, descartándose la implicación de esta proteína en la fase de inducción del proceso apoptótico. Como resultado, la caída del potencial mitocondrial es menor. Sólo es posible una pequeña salida de citocromo c, que se une a Apaf-1 y activa un poco de caspasa-9, que a la vez activa un poco de caspasa-3 y caspasa-6. Las pequeñas cantidades de caspasas activas inducen por un mecanismo desconocido de retroalimentación una mayor caída del potencial mitocondrial y favorecen una segunda salida de citocromo c en mayor cantidad y esta vez acompañada de la salida de AIF. Citocromo c se une a más Apaf-1, activando más caspasa-9, desencadenando la cascada de activación de caspasas. AIF se transloca al núcleo y contribuye a la condensación y fragmentación de la cromatina. Todo ello conduce finalmente a la muerte de la célula por apoptosis. Este modelo explica como el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk impide la muerte celular al inhibir el ciclo de retroalimentación de las caspasas, verdadero responsable de dicha muerte.

## 4.2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES DE SENSIBILIDAD A APO2L/TRAIL.0 EN CÉLULAS DE MIELOMA. EFECTO POTENCIADOR DE VPA.

### 4.2.1.- Introducción.

Apo2L/TRAIL es un ligando de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), capaz de inducir apoptosis tras la ligación de sus receptores mortales. Es una proteína que presenta muy buenas perspectivas como futura terapia anti-tumoral, ya que induce apoptosis en muchas células transformadas, pero no en la mayor parte de las células normales (Almasan and Ashkenazi, 2003). Además, se sabe que Apo2L/TRAIL desempeña un papel clave en la vigilancia anti-tumoral mediada por las células NK (Takeda et al., 2002) y que los ratones TRAIL<sup>-/-</sup> desarrollan linfomas de manera espontánea (Zerfa et al., 2005), lo que sugiere que Apo2L/TRAIL podría estar implicado en el control de las neoplasias hematológicas.

Para transducir la señal de muerte, Apo2L/TRAIL interacciona con un complejo sistema de receptores: dos receptores de muerte pro-apoptóticos (DR4 y DR5), que contienen dominios DD (*Death Domain*) intracelulares implicados en la transducción de la señal y dos receptores señuelo (DcR1 y DcR2) funcionalmente inactivos, porque o bien carecen del dominio DD (DcR1) o lo tienen mutado (DcR2). Existe un tercer receptor señuelo soluble denominado osteoprotegerina (OPG). Inicialmente se identificó como receptor de OPGL/RANKL, y posteriormente se detectó su capacidad de unir también a TRAIL (Emery et al., 1998).



**Figura 4.21.- Los cinco receptores de TRAIL.** Los óvalos representan los dominios extracelulares ricos en cisteínas. El primero en amarillo, el resto en azul. Los rectángulos rojos representan el dominio de muerte (DD) (Kimberley and Screaton, 2004).

Son varios los argumentos que apoyan el empleo de Apo2L/TRAIL en la terapia del mieloma múltiple (MM), una neoplasia hematológica de alta incidencia que presenta frecuentes recaídas y resistencias a los tratamientos actuales. En primer lugar, Apo2L/TRAIL induce apoptosis en algunas líneas celulares y en células de pacientes de mieloma múltiple (MM) (Gazitt et al., 1999; Mitsiades, N et al., 2001; Chen et al., 2003) mientras que genera una toxicidad mínima o nula en las células normales (Kelley and Ashkenazi, 2004). Por otro lado, aunque los osteoclastos del hueso sano no expresan receptores de Apo2L/TRAIL, los osteoclastos de la médula ósea de pacientes con mieloma si expresan receptores DR4 funcionales (Roux et al., 2005), sugiriendo que el tratamiento con Apo2L/TRAIL podría simultáneamente paliar la enfermedad ósea asociada al mieloma. También, como se comentará más adelante, el Apo2L/TRAIL secretado por los monocitos de sangre periférica, es probablemente el principal mediador *in vivo* de la acción anti-mieloma del interferon  $\alpha/\beta$  (apartado 4.3; Gómez-Benito et al., 2005b).

Hasta ahora, el principal problema de los estudios realizados en torno al empleo de Apo2L/TRAIL en la terapia del mieloma (Lincz et al., 2001; Mitsiades, CS et al., 2001; Mitsiades, N et al., 2002) es que se han llevado a cabo con formas recombinantes de Apo2L/TRAIL que inducen efectos tóxicos sobre los hepatocitos (Jo et al., 2000) y sobre otras células humanas normales (Nitsch et al., 2000; Quin et al., 2001; Dorr et al., 2002), lo que ha dificultado sus potenciales aplicaciones. En este trabajo, hemos empleado una forma recombinante y soluble de Apo2L/TRAIL, llamada Apo2L/TRAIL.0, que carece de las colas exógenas (residuos 114-281) y es incapaz de inducir apoptosis en ninguna de las células normales humanas en que se ha evaluado (Kelley and Ashkenazi, 2004). Esta variante fue desarrollada por el grupo del Dr. Ashkenazi en Genentech (Lawrence et al., 2001; Kelley and Ashkenazi, 2004) con la idea de ser empleada en ensayos clínicos.

Para poder diseñar un tratamiento anti-mieloma eficiente es necesario que previamente se establezcan los determinantes moleculares que condicionan la sensibilidad de las células a Apo2L/TRAIL, Apo2L/TRAIL.0 en este caso. Aunque se ha planteado que la diferente sensibilidad de las células tumorales frente a la de las células normales podría depender de la relativa expresión de receptores de muerte y receptores señuelo (Sheridan et al., 1997), la realidad parece ser más compleja (Kelley and Ashkenazi, 2004). En las células de mieloma al menos, la sensibilidad no parece correlacionar con los niveles de expresión de receptores señuelo (Lincz et al., 2001).

Por otro lado, se ha mostrado que DR5, pero no DR4, es el principal transductor de la señal de muerte iniciada por Apo2L/TRAIL en un amplio panel de leucemias de células B (Kang et al., 2003), pero sin embargo, DR4 parece ser el principal responsable de la transducción de la señal mortal en células de leucemia linfática crónica de tipo B (MacFarlane et al., 2005) y anticuerpos monoclonales agonistas de ambos receptores, DR4 (HGS-ETR1) y DR5 (HGS-ETR2), son capaces de inducir apoptosis en líneas humanas de leucemia sensibles a Apo2L/TRAIL (Georgakis et al., 2005). También se ha propuesto que la sensibilidad a Apo2L/TRAIL depende del ratio caspasa-8/c-FLIP (Mitsiades et al., 2002; Spencer et al., 2002), propuesta que todavía hoy es materia de controversia.

En este trabajo hemos considerado y analizado cada uno de los elementos que participan en la vía apoptótica inducida por TRAIL.0. y hemos estudiado estrategias para revertir células resistentes a Apo2L/TRAIL.0 en células sensibles y caracterizado su mecanismo de acción.

#### **4.2.2.- Efecto de Apo2L/TRAIL.0 en la proliferación y viabilidad celular.**

En primer lugar, analizamos el efecto de Apo2L/TRAIL.0, una forma recombinante de Apo2L/TRAIL especialmente diseñada para uso clínico, sobre las células IM-9, NCI-H929, MM.1S, RPMI 8226 y U266. Utilizando el método de reducción del MTT, los resultados indicaron que la línea RPMI 8226 era la más sensible a Apo2L/TRAIL.0, con una  $IC_{50}$  de 2 ng/ml (figura 4.22.), seguida por las líneas MM.1S y NCI-H929 con una  $IC_{50}$  entorno a 100 ng/ml (figura 4.22.). En las células IM-9 y U266 se produjo tan sólo una pequeña inhibición del crecimiento a dosis altas de Apo2L/TRAIL.0 (500 ng/ml) (figura 4.22). Por esta razón, decidimos considerarlas resistentes al ligando.

Para averiguar si el efecto tóxico del ligando era debido a la inducción de apoptosis se analizó la translocación de PS mediante la unión de anexina-V-PE en células tratadas con dos concentraciones diferentes (100 y 500 ng/ml) (figura 4.23.). Este análisis condujo a resultados similares al MTT. RPMI 8226 fue la línea más sensible, MM.1S y NCI-H929 mostraron una sensibilidad intermedia que no se modificó de manera significativa al aumentar 5 veces la concentración de Apo2L/TRAIL.0 y no se observó toxicidad significativa en las líneas U266 e IM-9 (figura 4.23.).

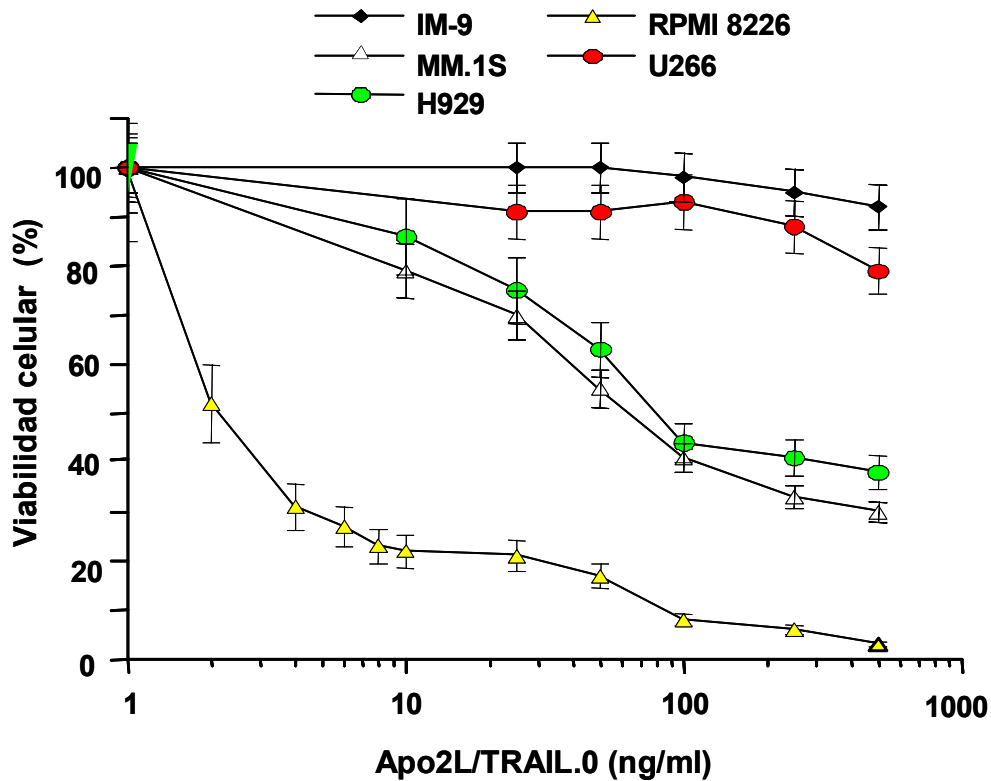


Figura 4.22.- Efecto de Apo2L/TRAIL.0 en la proliferación de las células de mieloma. Las células IM-9, MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226 y U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con diferentes concentraciones de Apo2L/TRAIL.0 en medio completo en placas de 96 pocillos. La proliferación celular se estimó a las 22h por el método del MTT. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro determinaciones individuales y están expresados como porcentaje de viabilidad relativa respecto a las células control (sin Apo2L/TRAIL). RPMI 8226 fue la línea más sensible a Apo2L/TRAIL.0, con una  $IC_{50}$  de 2 ng/ml.

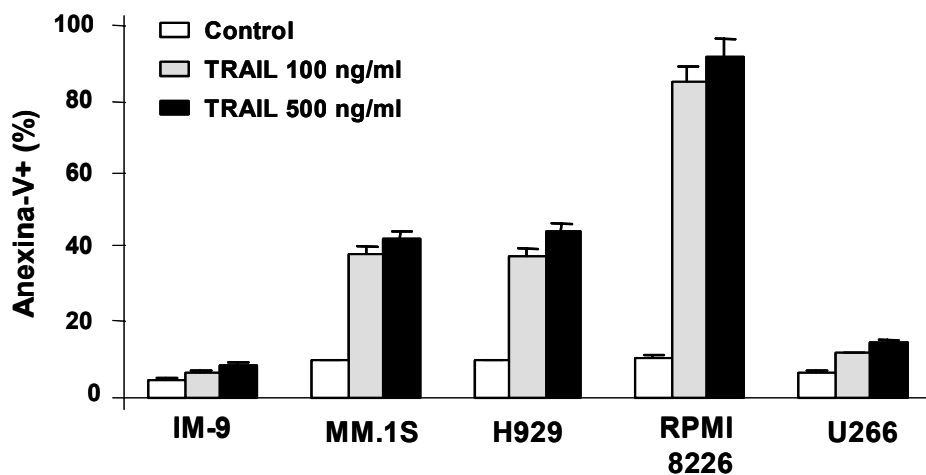


Figura 4.23. – Apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 en líneas de mieloma. Las células IM-9, MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226 y U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 100 o 500 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0, o se dejaron sin tratar (controles) durante 22h en medio completo, según se indica. Pasado este tiempo, la apoptosis se evaluó por unión de anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes



### **4.2.3.- Receptores de Apo2L/TRAIL en células de mieloma.**

#### **4.2.3.1.- Expresión de DR4, DR5, DcR1 y DcR2 en la membrana plasmática de las células de mieloma.**

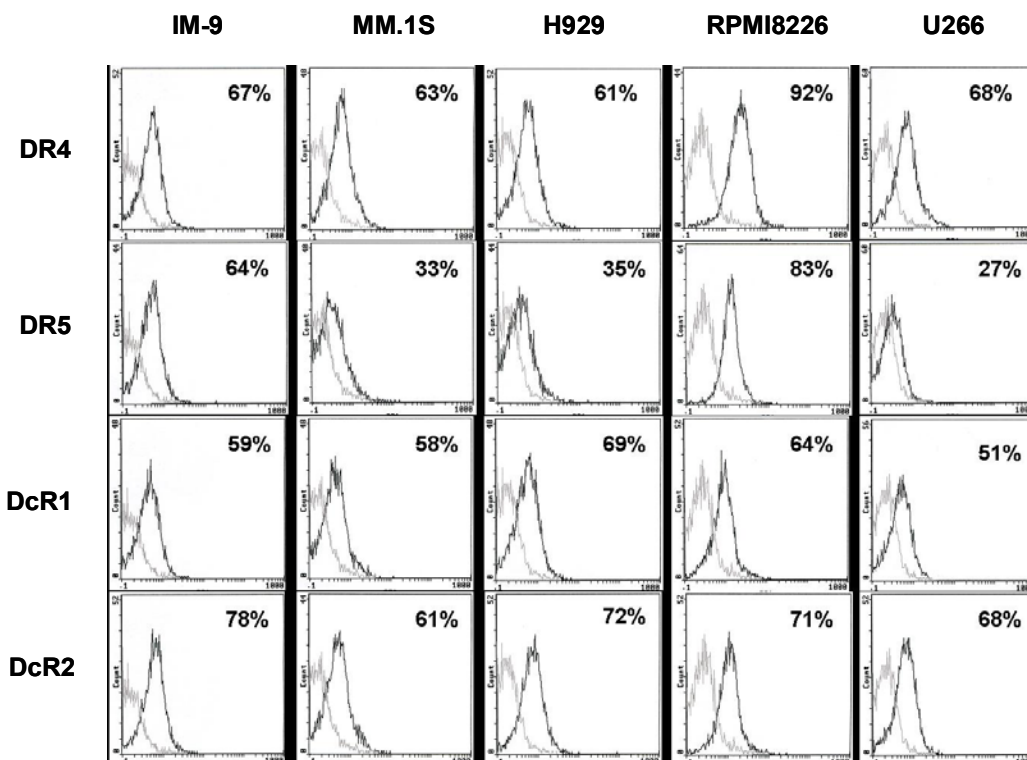
Se analizó la expresión en membrana de receptores de Apo2L/TRAIL, en las células IM-9, MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226 y U266, mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos. El análisis mostró que las células RPMI 8226, las más sensibles a Apo2L/TRAIL.0, fueron también las que expresaron los mayores niveles de DR4 y DR5 entre todas las analizadas (figura 4.24.). Las células IM-9, pese a ser resistentes a Apo2L/TRAIL.0, más de la mitad expresaron niveles significativos de ambos receptores, DR4 y DR5. Posteriormente se observó, por citometría de flujo, que estas células eran capaces de reducir considerablemente la expresión en membrana de DR5 al incubarse en presencia del ligando (figura 4.25.), pudiendo influir este proceso es su resistencia. Las células H929 y MM.1S, parcialmente sensibles a Apo2L/TRAIL.0, y las células U266, resistentes al ligando, expresaron niveles bajos de DR5 y significativos de DR4, aunque no todas fueron positivas para la expresión de este receptor. En las células U266, pese a su resistencia, no se observaron cambios en los niveles de expresión de DR4 o DR5 tras el tratamiento con Apo2L/TRAIL.0.

La expresión de receptores señuelo (DcR1 y DcR2) fue similar en todas las líneas celulares y no correlacionó con sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 (figura 4.24.).

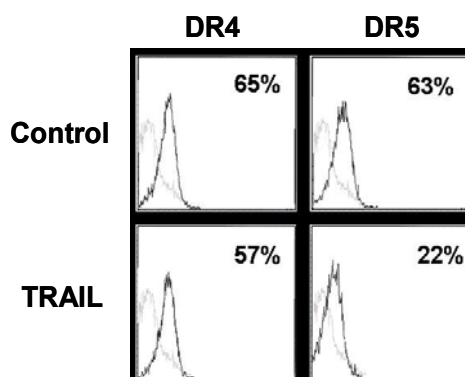
#### **4.2.3.2.- Contribución de DR4 y DR5 a la inducción de apoptosis.**

Para evaluar la contribución relativa de los dos receptores funcionales de Apo2L/TRAIL a la transducción de la señal apoptótica en las líneas sensibles, se utilizaron quimeras de DR4 y DR5 (DR4-Fc y DR5-Fc, respectivamente). Los resultados indicaron que DR5 es más eficiente en la transducción de la señal, pero que esta también puede ser transmitida por DR4. Para cada caso en particular, la implicación de DR4 y DR5 en la inducción de apoptosis dependió de los niveles relativos de expresión entre ambos receptores. Así, en las células RPMI 8226, que expresaron altos niveles de ambos, DR4 y DR5 (figura 4.24.), la quimera DR4-Fc no redujo la toxicidad de Apo2L/TRAIL.0, mientras que la quimera DR5-Fc la eliminó por completo (figura 4.26.). Por otro lado, en las células H929 y MM.1S, parcialmente

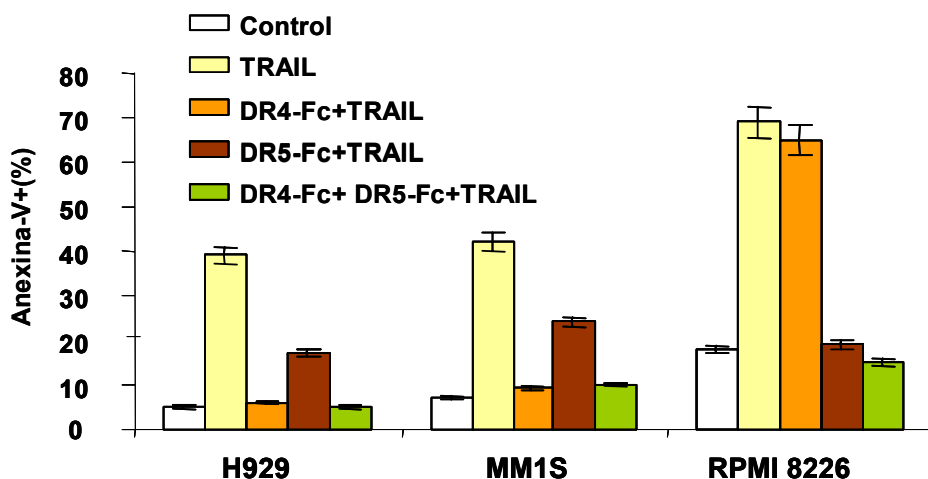
sensibles a Apo2L/TRAIL.0, y que expresan principalmente DR4 (figura 4.24.), el efecto protector de la quimera DR4-Fc fue mucho mayor que el de la quimera DR5-Fc (figura 4.26.).



**Figura 4.24.-** Expresión en membrana de los receptores de Apo2L/TRAIL. Las células ( $2 \times 10^5$  células) se incubaron con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-DR4-PE (IgG1, clon DJR1), anti-DR5-PE (IgG1, clon DJR2-4), anti-DcR1-PE (IgG1, clon DJR3) o anti-DcR2-PE (IgG1, clon DJR4-1). Como control se usó una IgG1-PE de ratón. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo.



**Figura 4.25.-** Reducción de niveles de DR5 en la membrana de células IM-9. Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se incubaron en ausencia (control) o presencia de 100 ng/ml de Apo2L /TRAIL.0 en medio completo durante 22 h. Transcurrido este tiempo,  $2 \times 10^5$  células se incubaron con anti-DR4-PE o anti-DR5-PE, y se analizó la expresión de receptores por citometría de flujo. Como puede observarse, las células incubadas con el ligando redujeron muy significativamente la expresión de DR5.



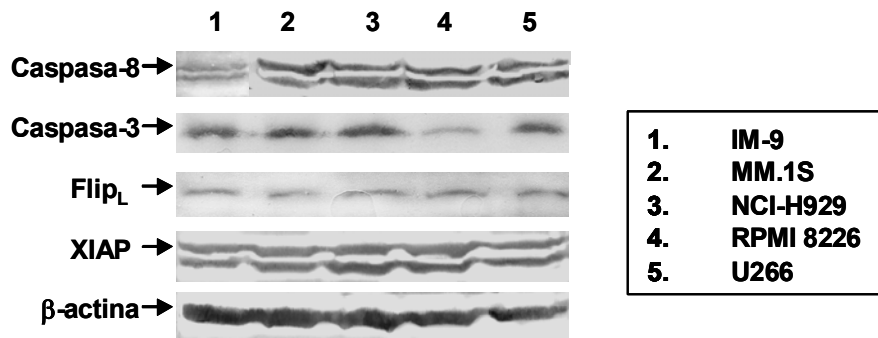
**Figura 4.26.- Contribución de DR4 y DR5 a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0.** Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml para H929 y MM.1S y 2 ng/ml para RPMI 8226) se pre-incubó con las quimeras DR4-Fc, DR5-Fc o ambas (200 ng/ml para H929 y MM.1S y 5 ng/ml para RPMI 8226) durante 25 min a 4°C en medio completo. Por otro lado, las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml), se centrifugaron y los pellets celulares se resuspendieron en 1 ml de las mezclas de TRAIL.0 y quimeras, anteriormente indicadas, o en medio completo (controles) y se incubaron durante 22h. Transcurrido este tiempo, se determinó la apoptosis por unión a anexina-V-PE y citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

#### 4.2.4.- Proteínas implicadas en la vía extrínseca de apoptosis.

##### 4.2.4.1.- Niveles de expresión de proteínas implicadas en la vía extrínseca.

Se analizaron los niveles de expresión de caspasa-8 y caspasa-3, las principales caspasas iniciadora y ejecutora, respectivamente, en la vía extrínseca de apoptosis. Todas las líneas expresaron niveles significativos de caspasa-8, excepto las células IM-9, resistentes a Apo2L/TRAIL.0, cuyos niveles de expresión fueron muy bajos (figura 4.27.). RPMI 8226 expresaron niveles de caspasa-3 inferiores al resto de las células (figura 4.27.).

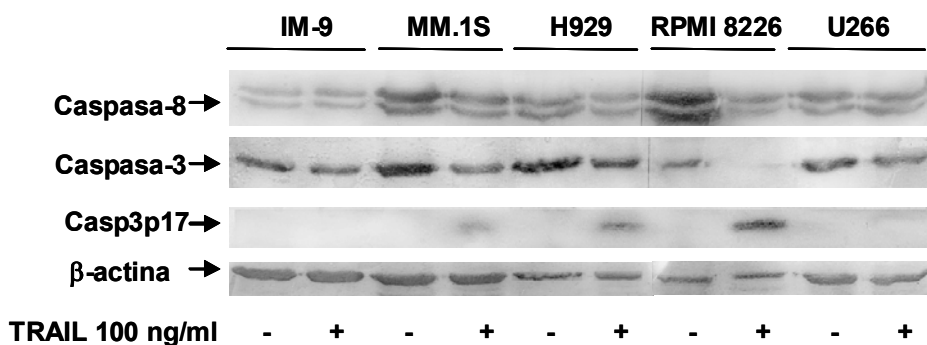
Por otro lado, como la actividad enzimática de las caspasas puede verse alterada por proteínas inhibitoras endógenas (IAPs y FLIPs), se analizaron los niveles de XIAP, c-FLIP<sub>L</sub> y c-FLIP<sub>S</sub>. Los niveles de cIAP1 y cIAP2 no se analizaron, ya que aunque estas proteínas también interactúan con las caspasas, no inhiben su actividad (Eckelman and Salvesen, 2006). Todas las líneas analizadas expresaron el inhibidor de caspasas XIAP en niveles semejantes y mostraron niveles significativos y similares de c-FLIP<sub>L</sub> (figura 4.27.), y muy bajos, casi indetectables, de c-FLIP<sub>S</sub> (no mostrados). Ni los niveles de XIAP ni de c-FLIP<sub>L</sub> correlacionaron con la sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0.



**Figura 4.27.- Niveles de expresión de proteínas implicadas en la apoptosis vía extrínseca.** Se realizaron extractos totales de proteínas a partir de  $5 \times 10^6$  células control para cada una de las líneas celulares objeto de estudio. Posteriormente, las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-12%PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron usando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.

#### 4.2.4.2.- Análisis de la activación de caspasas -8 y -3.

Se analizó la activación de las caspasas -8 y -3, principales caspasas iniciadora y ejecutora, respectivamente, tras el tratamiento con Apo2L/TRAIL.0 de las diferentes líneas. Todas las líneas sensibles al ligando (RPMI 8226, MM.1S y H929) mostraron, en mayor o menor medida, activación de caspasa-8 (estimada por reducción de los niveles de pro-enzima) y de caspasa-3 (estimada por la reducción de los niveles de pro-enzima y por la aparición de la forma activa de 17kDa) correlacionando con su sensibilidad (figura 4.28.). En las células resistentes (IM-9 y U266), no se detectó activación significativa de caspasas tras el tratamiento con Apo2L/TRAIL.0 (figura 4.28.).

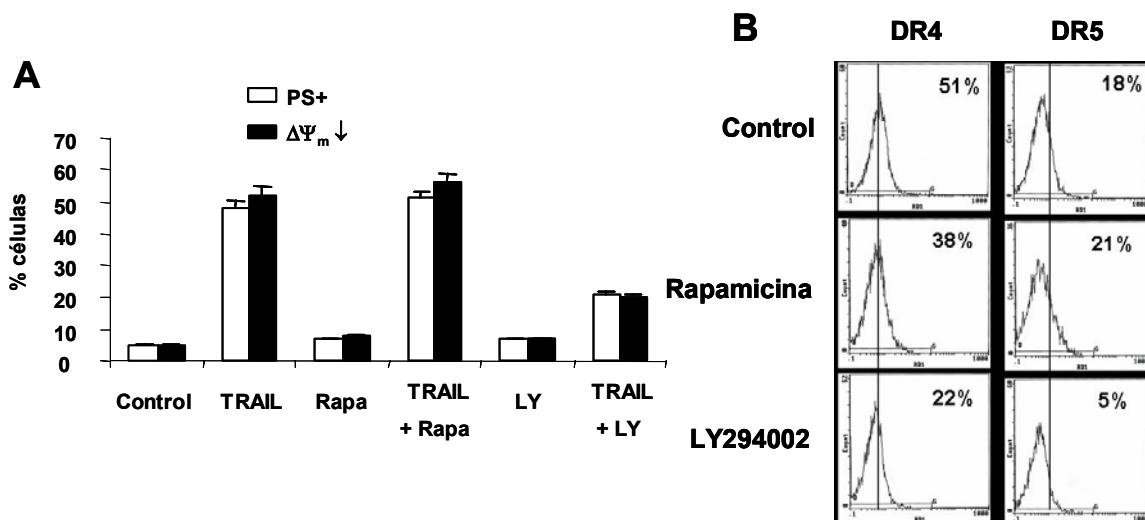


**Figura 4.28.- Activación de caspasas inducida por TRAIL.0.** Las células se trataron durante 22h con 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0. Transcurrido este tiempo, se realizaron extractos de células control y células tratadas ( $5 \times 10^6$  células en cada caso). Posteriormente, se analizó la activación de caspasas mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.

#### 4.2.5.- Evaluación de la implicación de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0.

La señalización vía PI3K/Akt es importante para la supervivencia del mieloma (van de Donk et al., 2005). Además, se ha planteado que la activación de esta vía protege de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL en diferentes líneas tumorales (Coffey et al., 2005) y que su inhibición debiera sensibilizar las células al ligando (Chen,X. et al., 2001; Coffey et al., 2005; Kim and Lee, 2005). Analizamos el efecto del inhibidor de la PI3K (LY294002) y del inhibidor de mTOR (rapamicina) en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 en células H929 y U266. También se evaluó el efecto que un tratamiento prolongado (20h), con LY294002 o rapamicina, produce en los niveles de expresión de receptores de TRAIL en las células H929.

Los inhibidores no tuvieron ningún efecto sensibilizador a Apo2L/TRAIL.0 en las células U266. En las células H929, se observó una pequeña disminución de la citotoxicidad inducida por TRAIL.0 en presencia del inhibidor LY294002 (figura 4.29.A), Sin embargo, esta reducción de la toxicidad correlacionó con una disminución de la expresión en membrana de DR4 y DR5 inducida por el tratamiento prolongado con este inhibidor (figura 4.29.B).



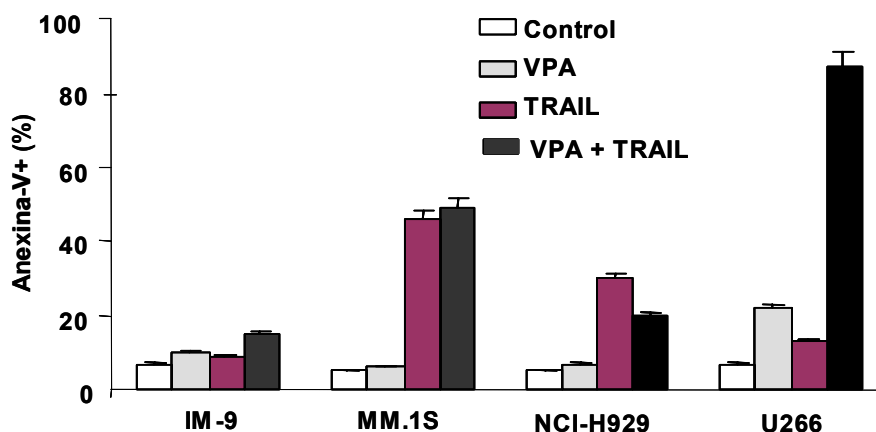
**Figura 4.29.– Efecto de inhibidores de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por TRAIL.0 en las células H929. (A)** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se pre-incubaron durante 1 h con LY294002 (10  $\mu$ M) o rapamicina (100 nM), según se indica. Seguidamente, se añadieron 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0 y se incubaron durante 22h. La muerte celular se estimó por la exposición de PS y pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , mediante citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes. **(B)** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron durante 20 h con LY294002 (10  $\mu$ M) o rapamicina (100 nM), se incubaron con anti-DR4 o anti-DR5, y se analizó la expresión de receptores por citometría de flujo.

#### **4.2.6.- Apo2L/TRAIL.0 y los inhibidores de histona deacetilasas (HDACi).**

Los inhibidores de histona deacetilasas (HDACi) son un nuevo tipo de fármacos que están siendo actualmente testados en ensayos clínicos. Estos agentes presentan características que les hacen idóneos para el uso en la terapia anti-cáncer: reducida toxicidad sobre células normales, capacidad de inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis a bajas concentraciones, etc. Sin embargo, sus mecanismos de acción todavía no se conocen con precisión (apartado 2.3.7.8.). El ácido valproico (VPA; ácido 2-propilpentanoico) pertenece al grupo de HDACi. Es un anti-convulsivo que ha sido empleado en el tratamiento de la epilepsia durante más de 30 años. Además, presenta otros efectos farmacológicos adicionales como paliativo de migrañas, teratogenicidad y en ocasiones hepatotoxicidad (Göttlicher et al., 2001). El VPA es capaz de inhibir la actividad histona deacetilasa (HDAC) a concentraciones terapéuticas y también, al igual que otros inhibidores de HDAC, induce parada de ciclo y diferenciación celular, aunque no se sabe si este efecto es debido a la inhibición de HDAC o a otra diana todavía no caracterizada (Gurvich et al., 2004). Se ha descrito que VPA es capaz de incrementar la sensibilidad a Apo2L/TRAIL en células de B-CLL (MacFarlane et al., 2005), pero no se ha caracterizado su mecanismo de acción.

##### **4.2.6.1.- Efecto sensibilizador de VPA en la apoptosis inducida por TRAIL.0 en células de mieloma.**

Con estos antecedentes, decidimos averiguar si el ácido valproico (VPA) podía sensibilizar a Apo2L/TRAIL.0 a las células de mieloma parcialmente sensibles o resistentes. Para ello, las células se pre-trataron durante 6 h con VPA a dosis terapéuticas (1 mM), y posteriormente se añadió Apo2L/TRAIL.0, incubándose ambos conjuntamente durante 18 h más. VPA por sí sólo no resultó tóxico en las líneas analizadas, excepto una ligera toxicidad en las células U266. Tampoco tuvo un efecto potenciador significativo en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 en IM-9, MM.1S y H929 (figura 4.30.). Sin embargo, en el caso de las células U266, resistentes a Apo2L/TRAIL.0, el pre-tratamiento con VPA si revirtió por completo la resistencia al ligando (figura 4.30.).



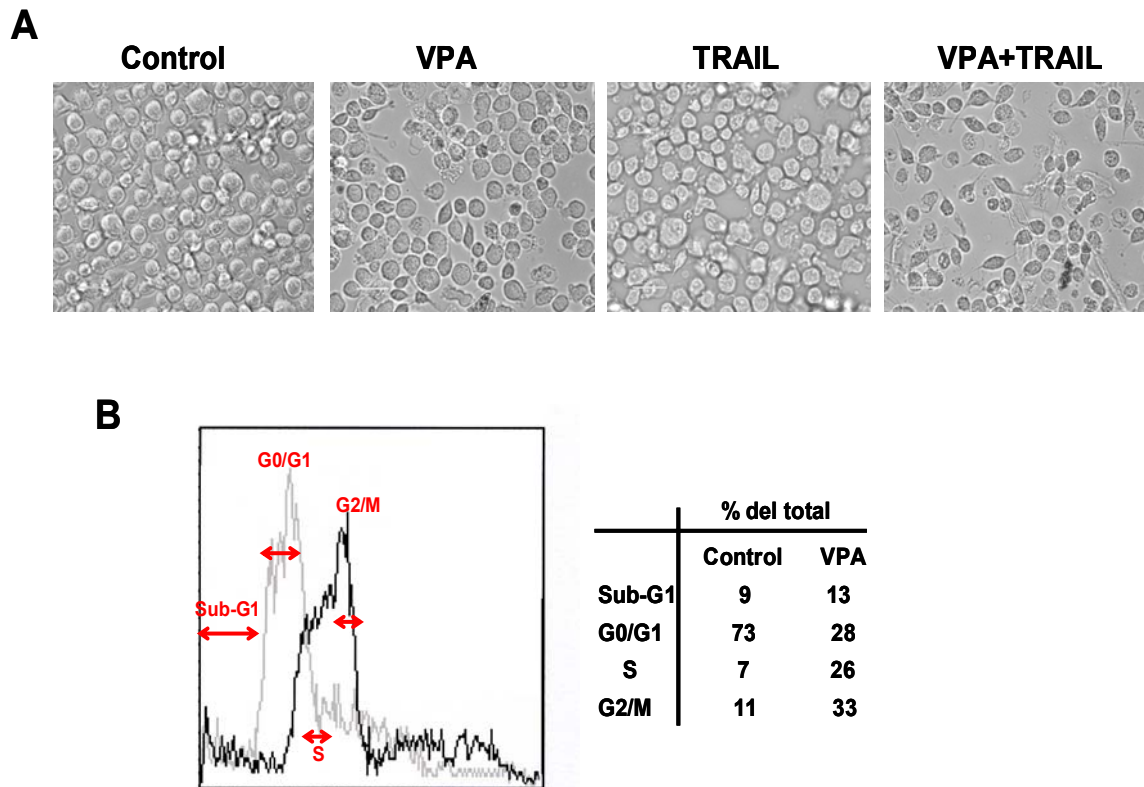
**Figura 4.30.- El ácido valproico sensibiliza las células U266 a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0.** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se pretrataron durante 6 h con ácido valproico (1 mM). Seguidamente, se añadieron o no, según se indica, 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0 y se incubaron durante 18 h más. La apoptosis se evaluó por unión de anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

#### 4.2.6.2.- Efecto de VPA sobre la morfología y el ciclo celular en las células U266.

En las células U266 el tratamiento con VPA durante tiempos prolongados (18-24 h) indujo cambios morfológicos, sugerentes de diferenciación celular (figura 4.31.A). Este tratamiento también ralentizó el ciclo celular, produciéndose un acúmulo de células en fase G<sub>2</sub>-M (figura 4.31.B)

#### 4.2.6.3.- Efecto de VPA sobre las proteínas de la vía extrínseca de apoptosis en las células U266.

Se analizó el efecto del tratamiento con VPA y del tratamiento combinado VPA +TRAIL.0 sobre los niveles intracelulares de caspasas, c-FLIP<sub>L</sub>, XIAP, FADD, Bid, Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> en las células U266. No se detectaron cambios significativos en los niveles de c-FLIP<sub>L</sub>, Bid, Mcl-1 y Bcl-2, que se mantuvieron similares a los de las células sin tratar (figura 4.32.). Sin embargo, el tratamiento con VPA si aumentó ligeramente los niveles de FADD y disminuyó los niveles de XIAP y Bcl-x<sub>L</sub> (figura 4.32.). Estos cambios fueron más acusados en células tratadas con la combinación VPA y TRAIL.0 que en las células tratadas sólo con VPA. Además también se detectó activación de las caspasas -8 y -3, y proteólisis de Bid en las células tratadas con VPA+TRAIL.0 (figura 4.32.).

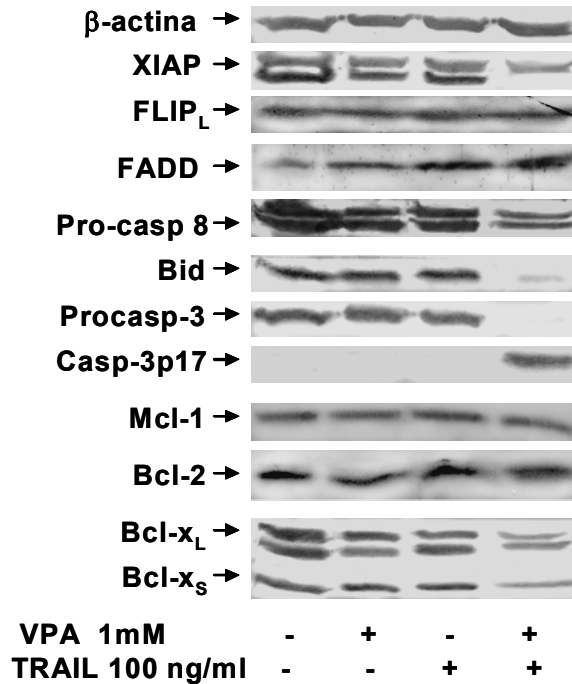


**Figura 4.31.- VPA induce diferenciación celular y parada de ciclo en G2-M en las células U266. (A)** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se pre-trataron durante 6h con VPA (1 mM) en medio completo. Se añadieron 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0 en los pocillos correspondientes y se incubaron 18h más. Transcurrido este tiempo, se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron. Aumento original x200. **(B)** Las células ( $1 \times 10^6$  cél/ml) se incubaron en ausencia (línea gris) o en presencia de VPA (1 mM) (línea negra) durante 22h. Se fijaron con etanol al 70%, se marcaron con yoduro de propideo (PI) y se analizaron por citometría de flujo.

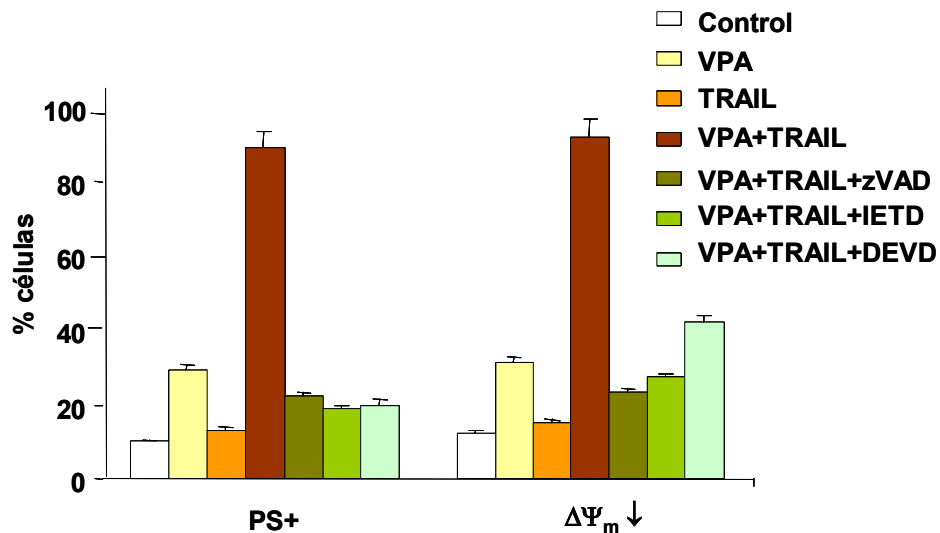
#### 4.2.6.4.- Efecto de los inhibidores de caspasas en la apoptosis inducida por el tratamiento combinado VPA y TRAIL.0.

Se analizó el efecto de diversos inhibidores de caspasas sobre la apoptosis inducida por el tratamiento combinado VPA y Apo2L/TRAIL.0 en las líneas de mieloma. El inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk y el inhibidor de las caspasas -8 y -10, Z-IETD-fmk, impidieron por completo la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la exposición de PS (figura 4.33.). El Z-DEVD-fmk, inhibidor de las caspasas -3 y -7, también impidió la translocación de PS y redujo en una alta proporción la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  inducidas por el tratamiento (figura 4.33.). Estos resultados fueron indicativos de que la toxicidad generada por el tratamiento combinado era mediada a través de la capacitación de la vía extrínseca, no la intrínseca, y debida principalmente al efecto sensibilizador de VPA al ligando Apo2L/TRAIL.0.





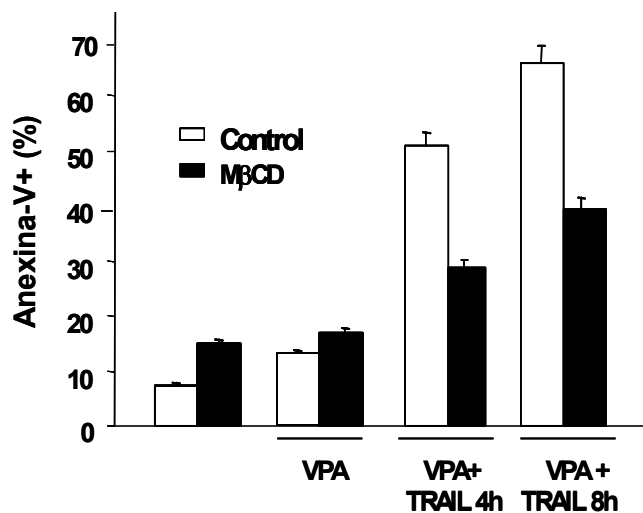
**Figura 4.32.**– Efecto del tratamiento con VPA en los niveles de proteínas implicadas en la vía apoptótica de Apo2L/TRAIL.0 en las células U266. Las células se pre-trataron durante 6 h con 1 mM de VPA. Seguidamente, se añadieron o no, según se indica, 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL y se incubaron durante 18 horas más. Se realizaron extractos celulares que se analizaron por electroforesis e inmuno-transferencia empleando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.



**Figura 4.33.**– Efecto de los inhibidores de caspasas en la apoptosis inducida por TRAIL.0 en células U266 pre-sensibilizadas con VPA. Las células U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se pre-trataron o no, durante 5 h con 1 mM de VPA. Seguidamente, se añadió en los casos indicados Z-DEVD-fmk, Z-IETD-fmk o Z-VAD-fmk (todos a 100  $\mu$ M) y se incubaron 1 h más. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0 y a las 18 h se analizó la exposición de PS y la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  mediante marcaje con anexina-V-PE y DiOC<sub>6</sub>(3), respectivamente. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

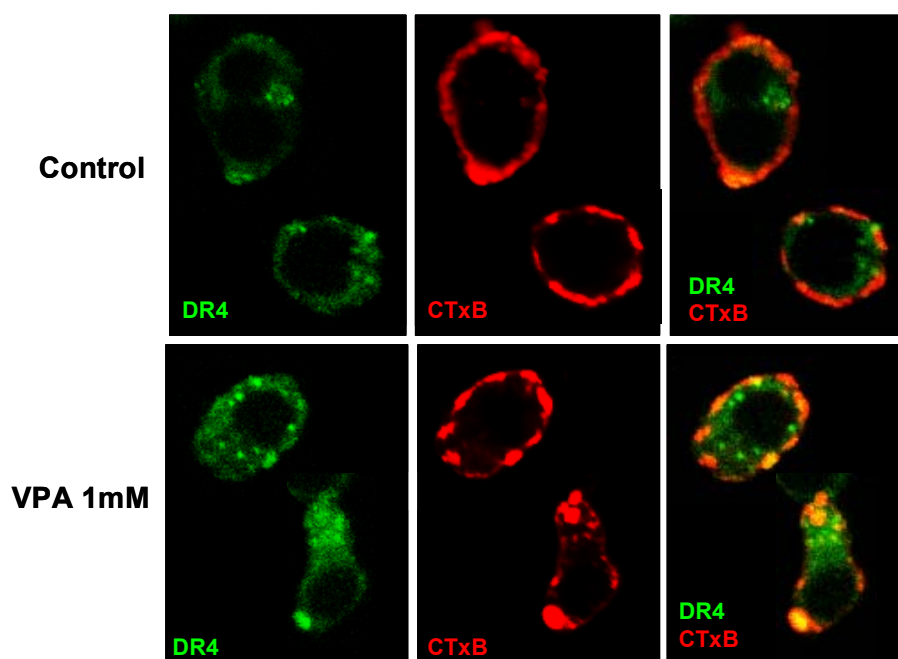
#### 4.2.6.5.- Efecto del agente extractor de colesterol metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) en la apoptosis inducida por el tratamiento combinado VPA y TRAIL.0.

Se evaluó si el pre-tratamiento con VPA aumentaba la expresión en membrana de DR4 ó DR5 en las células U266, pero no se observaron cambios significativos: la expresión de DR5 continuó siendo muy baja y el nivel de expresión de DR4 se mantuvo. Dado que VPA tampoco inducía aumento en los niveles de caspasas, y que el aumento en los niveles de FADD era poco acusado, se analizó si el pre-tratamiento con VPA podía implicar una redistribución de receptores DR4 a las balsas lipídicas de la membrana plasmática, aumentando su agregación y mejorando la transducción de la señal apoptótica. Para ello, tras el tratamiento de las células con VPA (1 mM), se centrifugaron y se incubaron en medio sin suero con el agente captador de colesterol metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) con el fin de disgregar las balsas lipídicas. Tras esto, se volvió a añadir VPA y Apo2L/TRAIL.0, y las células se incubaron durante diferentes tiempos (4-12 h) a los cuales se evaluó la toxicidad inducida por el co-tratamiento. Como se esperaba, se encontró que la disrupción de las balsas lipídicas reducía considerablemente el efecto sensibilizador a Apo2L/TRAIL.0 inducido por VPA (figura 4.34.)



**Figura 4.34.- Efecto de M $\beta$ CD en la apoptosis inducida por TRAIL.0 en células U266 pre-sensibilizadas con VPA.** Las células U266 ( $5 \times 10^5$  cel/ml) se pretrataron durante 12 h con 1 mM de VPA en medio completo. Pasado este tiempo, se centrifugaron y se trataron durante 1 h con 10 mM de M $\beta$ CD en medio RPMI sin suero. Las células se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en medio completo sólo con 1 mM de VPA o con 1 mM de VPA y 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0. En estas condiciones se incubaron durante 4 u 8 h, según se indica. La apoptosis se evaluó por unión a anexina-V-PE por citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Por otro lado, y para verificar que realmente VPA inducía la agregación de receptores DR4 y la traslocación de los agregados a las balsas lipídicas, aumentando así la sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0, se evaluó la localización subcelular de DR4 mediante estudios de co-localización por microscopía confocal, empleando un anticuerpo específico contra DR4 y la subunidad B de la toxina del cólera (CTxB) como marcador de balsas lipídicas. Los resultados confirmaron que el tratamiento de las células U266 con VPA inducía una mayor agregación de los receptores DR4 y que estos agregados se localizan en las balsas lipídicas de membrana (figura 4.35.).

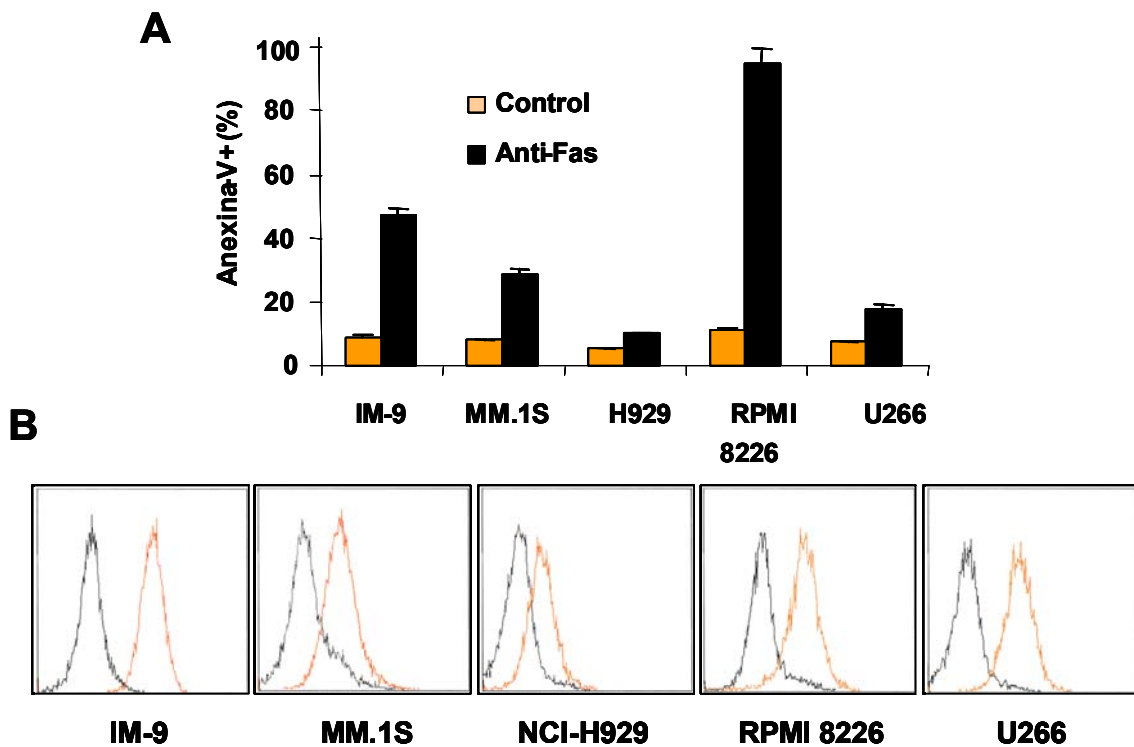


**Figura 4.35.– VPA induce agregación de DR4 y traslocación de los agregados a las balsas lipídicas en células U266.** Las células se trataron durante 22h con 1 mM VPA. Tras esto, se incubaron primero con anti-DR4 y después con la subunidad B de la toxina del cólera (CTxB), se fijaron con paraformaldehído sobre cubres de poli-L-Lys y se analizaron por microscopía confocal. El tratamiento con VPA indujo agregación de moléculas de DR4 que se localizaron en las balsas lipídicas de la membrana plasmática como puede apreciarse por la co-localización.

#### 4.2.7.- Sensibilidad a otros ligandos de muerte.

Se estudió la sensibilidad de las diferentes líneas de mieloma a Fas y su correlación con la expresión de Fas (CD95) en la membrana. Todas las células se incubaron con la misma concentración de IgM anti-Fas (CH11) (100 ng/ml) observándose importantes diferencias de sensibilidad entre las líneas. Las células RPMI 8226 fueron las más sensibles, seguidas por las células MM.1S e IM-9, mientras que NCI-H929 y U266 se mostraron resistentes (Figura 4.36.A).

Por otro lado, se analizó la expresión de Fas/CD95 en membrana. Todas las líneas mostraron niveles considerables, excepto las células NCI-H929, en las que la expresión fue moderada, lo que correlaciona con su resistencia a la apoptosis inducida via Fas (figura 4.36.B). En las células U266, que si expresaron niveles considerables de Fas en membrana, la resistencia podría ser debida a algún defecto en la ruta de transducción de la señal apoptótica, algo que ya ocurría en relación con su sensibilidad a Apo2L/TRAIL. Aunque se intentó revertir la resistencia mediante un tratamiento combinado VPA y anti-Fas, no se consiguieron mejoras significativas.



**Figura 4.36.- Sensibilidad al anticuerpo citotóxico anti-Fas.** (A) Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 100 ng/ml de anticuerpo citotóxico anti-Fas o se dejaron sin tratar (controles) durante 22h en medio completo. Pasado este tiempo, la apoptosis se evaluó por unión de anexina-V-PE y citometría de flujo. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes. (B) **Expresión de Fas (CD95) por las líneas de MM.** Las células ( $2 \times 10^5$  cel/ml) se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Fas-FITC (SM1/23) (línea naranja) o una IgG1-FITC de ratón (línea negra) y se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.2.8.- Discusión.

Apo2L/TRAIL es un ligando mortal capaz de inducir apoptosis en células tumorales, dejando intactas las células normales (Kelley and Ashkenazi, 2004), lo que le convierte en un arma anti-tumoral muy atractiva. Por otro lado, el mieloma múltiple (MM) es todavía hoy una neoplasia hematológica incurable y podría ser un buen candidato a la terapia con Apo2L/TRAIL (Mitsiades, N et al., 2001). Hasta ahora, la mayor parte de los estudios de sensibilidad realizados han empleado formas recombinantes de TRAIL que, a parte de eliminar células tumorales, también inducen toxicidad en hepatocitos y otras células normales, y que han llevado a descartar su uso como agente quimioterapéutico. En este trabajo, se han analizado las utilidades y las limitaciones de otra nueva forma recombinante (Apo2L/TRAIL.0), diseñada específicamente para uso clínico, ya que no presenta hepatotoxicidad ni resulta tóxica para ninguna de las células normales sobre las que se ha ensayado (Almasan and Ashkenazi, 2003). De hecho, ya se ha evaluado en ensayos pre-clínicos el empleo de Apo2L/TRAIL.0, y el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra sus receptores mortales (Peter et al., 2005) obteniéndose en ambos casos resultados esperanzadores.

Los estudios realizados hasta la fecha, muestran que no todas las líneas de mieloma, ni todas las células mielomatosas de pacientes, son sensibles a la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL pese a expresar sus receptores de muerte (Mitsiades, CS et al., 2001; Lincz et al., 2001), quedando todavía sin definir cuales son las razones de esa resistencia. Inicialmente la resistencia se atribuyó a la expresión relativa entre receptores funcionales (DR4 y DR5) y receptores señuelo (DcR1 y DcR2), pero en ningún tipo de cáncer estudiado se ha encontrado una correlación entre la expresión de receptores señuelo y la resistencia a Apo2L/TRAIL. Esto sugiere que pueden ser otros los mecanismos implicados en conferir dicha resistencia (Zhang and Fang, 2005). En este trabajo confirmamos que la expresión de receptores señuelo en la membrana de las células de mieloma no es predictiva de resistencia a Apo2L/TRAIL (Mitsiades, CS et al., 2001), mientras que un nivel significativo de expresión de al menos uno de los dos receptores funcionales (DR4 o DR5) es condición necesaria, aunque no suficiente para la sensibilidad. Nuestros resultados muestran que cuando se expresan ambos receptores, como en el caso de las células RPMI 8226, DR5 contribuye más que DR4 a la transducción de la señal mortal, de acuerdo con su

mayor afinidad por Apo2L/TRAIL (Truneh et al., 2000) y concordante con los resultados obtenidos en estudios de mutantes para estos receptores (Kelley et al., 2005). Sin embargo, cuando la expresión en membrana de DR4 es significativamente mayor que la de DR5, DR4 es competente por sí sólo en la transducción de la señal mortal. Aún así, como habíamos comentado, esta expresión de DRs es necesaria, pero no suficiente, para inducir apoptosis. Por ejemplo, las células IM-9, que expresan ambos receptores, son capaces de disminuir la expresión en membrana de DR5 en presencia de Apo2L/TRAIL.0, y de este modo, reducir su sensibilidad al ligando. Además, y más importante, estas células expresan niveles muy bajos de caspasa-8, la principal caspasa iniciadora de la vía apoptótica extrínseca, y este parece ser el factor determinante de su resistencia a Apo2L/TRAIL.0, como ya se había planteado en trabajos anteriores (Mitsiades, N et al., 2002).

Actualmente está aceptado que c-FLIP<sub>S</sub> es un inhibidor eficiente de la caspasa-8 y por lo tanto de la apoptosis inducida por receptores de muerte (Kirchhoff et al., 2000; Krueger et al., 2001; Bin et al., 2002), mientras que el papel de c-FLIP<sub>L</sub> parece ser más complejo. Inicialmente, se propuso que c-FLIP<sub>L</sub> inhibía la apoptosis porque impedía la activación de la caspasa-8 en el DISC (Thome and Tschopp, 2001), pero posteriormente se ha demostrado que c-FLIP<sub>L</sub> también puede actuar como activador de la caspasa-8 (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002; Dohrman et al., 2005). Todas las células analizadas mostraron niveles considerables de c-FLIP<sub>L</sub> y niveles muy bajos o indetectables de c-FLIP<sub>S</sub>, por lo que la expresión de c-FLIP<sub>L</sub> no parece condicionar la resistencia a la apoptosis mediada por Apo2L/TRAIL.0. También se analizaron los niveles de la proteína inhibidora de caspasas XIAP. Todas las células de mieloma expresaron niveles elevados, por lo que su expresión tampoco parece ser determinante de la resistencia a Apo2L/TRAIL.0. Los niveles de cIAP1 y cIAP2 no se analizaron, ya que aunque estas proteínas anti-apoptóticas se unen, no inhiben a las caspasas (Eckelman and Salvesen, 2006).

Por otro lado, se ha planteado que la activación de la vía PI3K/Akt protege de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL en diferentes líneas tumorales (Coffey et al., 2005) y que la inhibición de esta vía debiera sensibilizar las células a Apo2L/TRAIL (Chen et al., 2001; Coffey et al., 2005; Kim and Lee, 2005). Nuestros resultados muestran que la inhibición de la PI3K y/o de mTOR no tiene efectos potenciadores de la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 en las líneas de mieloma estudiadas, y que la disminución de sensibilidad al ligando que estos inhibidores proporcionan en algunas líneas se debe más bien a la disminución de la expresión de DR4 y/o DR5 .

En este trabajo identificamos un factor alternativo de resistencia a Apo2L/TRAIL.0 en células que expresan DR4 y tienen niveles significativos de caspasa-8. La resistencia en este caso, podría ser revertida mediante un tratamiento combinado con el inhibidor de histona deacetilasas (HDACi) ácido valproico (VPA), un anti-convulsivo actualmente empleado en la clínica en el tratamiento de patologías como la epilepsia. El efecto sinérgico entre VPA y Apo2L/TRAIL también se ha observado en células de leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) (MacFarlane et al., 2005). El efecto sensibilizador de VPA observado en las células U266 parece ser debido a una re-distribución de los receptores de DR4 a las balsas lipídicas, mejorando de este modo su agregación y la señalización apoptótica (Delmas et al., 2004), efecto que también se ha encontrado en el tratamiento de células de cáncer de próstata con otro HDACi diferente (Vanoosten et al., 2005). Además, el tratamiento combinado con VPA en las células U266, aumentó ligeramente los niveles celulares de FADD, y disminuyó los niveles de XIAP y Bcl-x<sub>L</sub>.

De acuerdo con todo lo que se ha expuesto, Apo2L/TRAIL.0 presenta muy buenas perspectivas como agente anti-mieloma debido a su baja toxicidad y su posible efecto paliativo de la enfermedad ósea (Roux et al., 2004). Además, en las células de mieloma resistentes, la combinación Apo2L/TRAIL.0 y VPA podría ser potencialmente útil siempre y cuando las células expresaran DR4 y tuvieran niveles significativos de caspasa-8. Al ser el VPA un eficiente agente anti-angiogénico y anti-vasculogénico (Michaelis et al., 2004) y no ser tóxico para los adultos a las dosis terapéuticas a las que se ha empleado (Brodie and Dichter, 1996), la combinación con VPA y Apo2L/TRAIL.0 podría ser una terapia adecuada para algunos pacientes de mieloma cuyas células cumplieran los requisitos de expresión de DR4 y caspasa-8 anteriormente expuestos.

### **4.3.- ESTUDIO DEL MECANISMO DE APOPTOSIS INDUCIDO POR INTERFERÓN ALFA E IMPLICACIÓN DE Apo2L/TRAIL EN DICHO PROCESO.**

#### **4.3.1.- Introducción.**

En 1957 Isaacs y Lindenmann descubrieron una sustancia secretada por ciertos tipos celulares capaz de proteger a las células frente a las infecciones víricas a la que llamaron interferón (IFN) (Isaacs and Lindenmann, 1957). Desde entonces, los interferones se han empleado en el tratamiento de diversas enfermedades gracias a su acción anti-viral, citostática y potenciadora del sistema inmune, aunque a menudo su administración continuada suele ir acompañada de considerable toxicidad (Pestka et al., 1987).

Los interferones se pueden clasificar en dos grupos en función del receptor al que se unen:

- Tipo I: IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\delta$ , IFN $\omega$ , IFN $\tau$ . Se unen a un receptor de Tipo I, que consta de las subunidades IFNAR-1 y IFNAR-2, que se asocian a las kinasas Tyk2 y Jak1.
- Tipo II: IFN $\gamma$ . Es el único que se une a un receptor de Tipo II, que consta de las subunidades IFNGR1 y IFNGR2, que se asocian a las kinasas Jak1 y Jak2.

(Jonasch and Haluska, 2001). Todos ellos presentan efectos anti-proliferativos, pero se diferencian en las células que los sintetizan y también, en las células diana sobre las que actúan.

El interferón alfa (IFN $\alpha$ ) es sintetizado normalmente por macrófagos y células dendríticas y fue el primero en obtenerse de forma recombinante. Desde hace años, se ha venido empleando en el tratamiento de diferentes neoplasias hematológicas tales como la leucemia de células pilosas (Ahmed and Rai, 2003) y la leucemia mielogéna crónica (Baccarani et al., 2002). También ha sido empleado como terapia de mantenimiento en el mieloma múltiple (MM) durante más de 20 años. Sin embargo, los datos clínicos sugieren que tan sólo una pequeña fracción de los pacientes de mieloma se benefician realmente de la terapia con IFN $\alpha$  (Bladé and Esteve, 2000). Un mejor conocimiento y caracterización de su mecanismo de acción permitiría establecer parámetros predictivos de respuesta y emplear la terapia con IFN $\alpha$  sólo en aquellos pacientes candidatos a beneficiarse de ella.

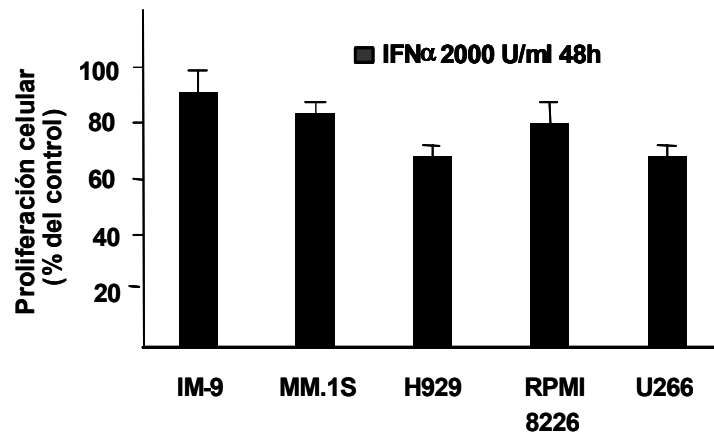


Por un lado, se desconoce el mecanismo por el cual  $\text{IFN}\alpha$  inhibe el crecimiento celular. Estudios realizados sobre células U266 dependientes de modo autocrino de IL-6, han propuesto que la inhibición del crecimiento puede ser debida a que el  $\text{IFN}\alpha$  disminuye la expresión en membrana del receptor de IL-6 (IL-6R) (Schwabe et al., 1994; Anthes et al., 1995). Sin embargo, otros autores han propuesto que es la propia IL-6 producida por las células, quien potencia la parada de ciclo inducida por  $\text{IFN}\alpha$  (Matsui et al., 2003) y existe, incluso, quien ha planteado que el  $\text{IFN}\alpha$  estimula la supervivencia de las células de mieloma al aumentar los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (Puthier et al., 2001). Por otro lado, y pese a que el  $\text{IFN}\alpha$  es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares y en células de pacientes de mieloma (Otsuki et al., 1998; Chen, Q. et al., 2001), también se desconoce el mecanismo por el cual induce apoptosis. Se sabe que esta apoptosis es independiente del bloqueo del ciclo celular y del estado mutacional de p53 (Thyrell et al., 2002), pero son muchas las hipótesis planteadas a cerca de él. Así, unos trabajos proponen que  $\text{IFN}\alpha$  induce apoptosis en células de mieloma de modo autocrino, a través de la síntesis y secreción de Apo2L/TRAIL (Chen, Q. et al., 2001; Crowder et al., 2005), otros que  $\text{IFN}\alpha$  sensibiliza las células a la apoptosis inducida por Fas mediante un mecanismo todavía desconocido (Spets et al., 1998; Roth et al., 1998), los hay que sugieren que la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR es necesaria para la inducción de apoptosis por  $\text{IFN}\alpha$  en células U266 (Thyrell et al., 2004), lo cual no deja de ser un resultado chocante teniendo en cuenta que la vía Akt ha sido siempre considerada como la principal mediadora de señales anti-apoptóticas y de supervivencia (Vivanco and Sawyers, 2002), y finalmente, hay trabajos que plantean que  $\text{IFN}\alpha$  podría inducir apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial (Panaretakis et al., 2003; Thyrell et al., 2002), acompañada de la activación de caspasas, la pérdida del potencial mitocondrial y la salida del citocromo c (Thyrell et al., 2002), pero no se conoce nada acerca de la fase de inducción del proceso apoptótico.

Dado nuestro interés en establecer criterios moleculares para diseñar una terapia más racional de  $\text{IFN}\alpha$ , y a la vez evaluar la implicación de Apo2L/TRAIL en su mecanismo apoptótico y el posible efecto sinérgico entre ambos, hemos analizado la sensibilidad de diferentes líneas de mieloma a  $\text{IFN}\alpha$  y caracterizado el mecanismo apoptótico inducido en dos líneas sensibles, H929 y U266. También se ha evaluado la posible implicación de Apo2L/TRAIL en esta apoptosis.

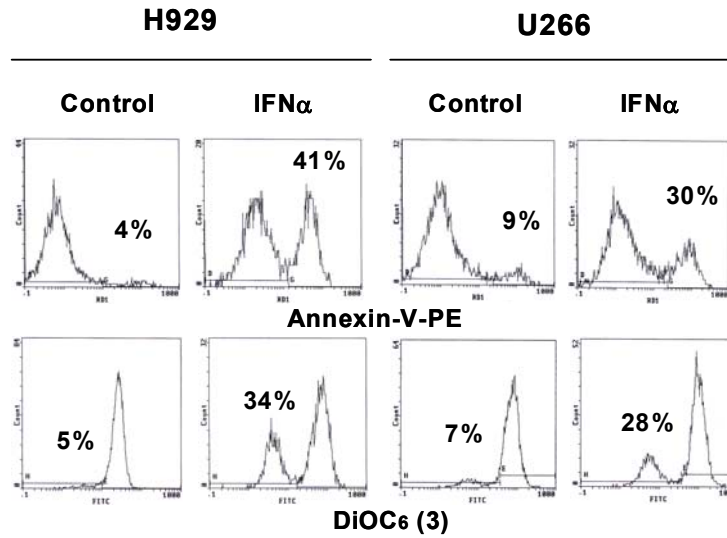
#### 4.3.2.- Efecto del interferón alfa en la proliferación, viabilidad y morfología celular.

El estudio se realizó sobre las líneas IM-9, NCI-H929, MM.1S, RPMI 8226 y U266. Se analizó la inhibición del crecimiento inducida por IFN $\alpha$  mediante el método de reducción del MTT (Alley et al., 1988). La mayor inhibición de crecimiento se observó en las células H929 y U266 (30-35%), seguidas de las células RPMI 8226 (15%). Las células IM-9 y MM.1S apenas si vieron afectada su proliferación celular (figura 4.37.).

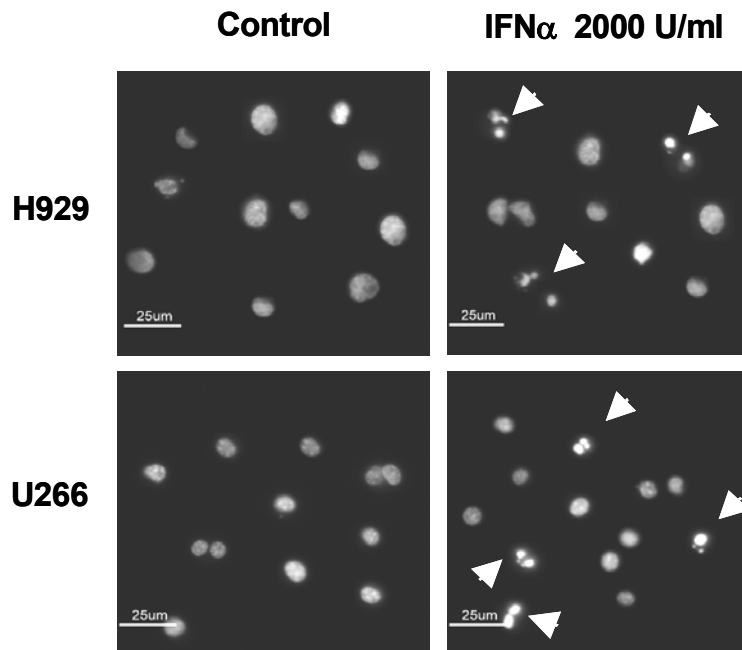


**Figura 4.37.– Efecto del IFN $\alpha$  sobre la proliferación de las células de mieloma.** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48h en medio completo. Pasado este tiempo, la proliferación celular se estimó por el método del MTT. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones individuales en 2 experimentos diferentes, y están expresados como porcentajes de crecimiento relativo a las células control sin IFN $\alpha$ .

En las células más sensibles, H929 y U266, se evaluó la translocación de PS y la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  inducidas por IFN $\alpha$  (figura 4.38.) y se analizó la morfología celular, por microscopía óptica de campo claro, y la condensación y fragmentación de cromatina, por microscopía de fluorescencia (figura 4.39.). En ambas líneas se observaron las típicas características apoptóticas: encogimiento celular, exposición de PS, caída del  $\Delta\Psi_m$  y fragmentación del ADN (figuras 4.38. y 4.39.).



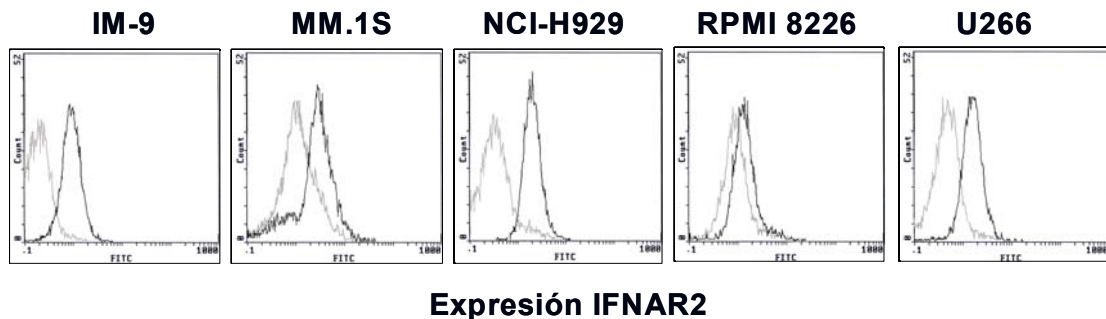
**Figura 4.38.**—Pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y traslocación de PS inducidas por IFN $\alpha$ . Las células NCI-H929 y U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h y se analizó por citometría de flujo, la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  (mediante la sonda DiOC<sub>6</sub>(3)) y la traslocación de PS (por unión a anexina-V-PE). Los números en los diagramas se refieren al porcentaje de células de cada región. El eje de abcisas representa el log de la intensidad de fluorescencia.



**Figura 4.39.**—Condensación y fragmentación de cromatina inducida por IFN $\alpha$ . Las células NCI-H929 y U266 ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se trataron durante 48 h con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  en medio completo. Posteriormente, se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33342 y se examinaron y fotografiaron por microscopía de fluorescencia. En ambos casos se observó la típica condensación de cromatina y fragmentación nuclear. Aumento original x400.

#### 4.3.3.- Análisis de la expresión en membrana del receptor de interferón alfa/beta en líneas de mieloma.

Se analizó la expresión de la cadena 2 del receptor de IFN $\alpha/\beta$  (IFNAR2) en la superficie de las células IM-9, MM.1S, NCI-H929, RPMI 8226 y U266 mediante citometría de flujo. El análisis mostró una baja o casi nula expresión del receptor en las células MM.1S y RPMI 8226, respectivamente (figura 4.40.), que podría explicar la reducida sensibilidad de estas células a IFN $\alpha$ . Sin embargo, las células IM-9, aunque resistentes al tratamiento con IFN $\alpha$ , sí expresaron niveles significativos del receptor (Figura 4.40.).

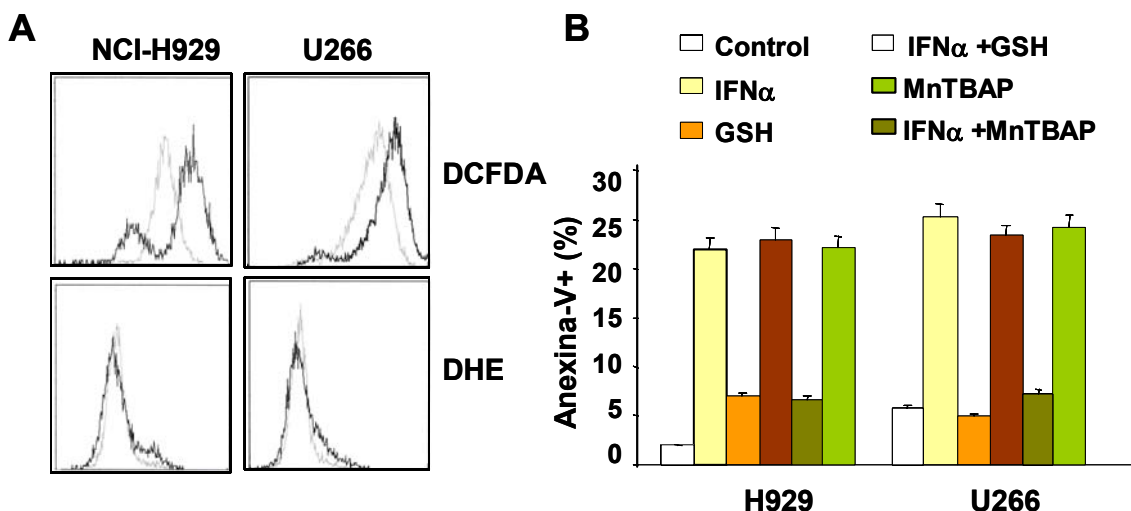


**Figura 4.40.– Expresión del receptor de IFN- $\alpha/\beta$  en la superficie de células de mieloma.** Las células ( $2 \times 10^5$  cel/ml) se incubaron secuencialmente con los anticuerpos anti-IFNAR2 y anti-IgG1-FITC (gris oscuro) o con anti-IgG-FITC sólo (gris claro) y se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.3.4.- Implicación de especies reactivas de oxígeno en la apoptosis inducida por interferón alfa.

El tratamiento de células con algunas drogas citotóxicas, puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que si se generan en cantidad elevada, pueden contribuir a actuar como mensajeros en el proceso de muerte celular (Nakazato et al., 2005). Se ha descrito que ROS podrían estar implicadas en la toxicidad generada por IFN $\alpha$  (Gamero and Lerner, 2001) por lo que analizamos la generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en células sensibles a IFN $\alpha$  tras el tratamiento. Para el análisis de la generación de anión superóxido empleamos la sonda 2-hidroxi-etidio (DHE) y para el análisis de la generación de peróxido de hidrógeno, la sonda 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetatoacetil éster (DCFDA).

El tratamiento con IFN $\alpha$  indujo un pequeño aumento en la generación de peróxido de hidrógeno en comparación con los niveles basales, pero no incrementó la producción de anión superóxido (figura 4.41.A). Por otro lado, se evaluó el efecto del glutatión (GSH), un compuesto reductor que impide el aumento de los niveles de ROS, y de MnTBAP, una porfirina que mimetiza la acción de la superóxido dismutasa y reduce los niveles de anión superóxido. Ninguno de estos agentes fue capaz de prevenir o reducir la muerte celular inducida por IFN $\alpha$  (figura 4.41.B).



**Figura 4.41.- Generación de especies ROS inducida por el tratamiento con IFN $\alpha$ .** (A) Las células ( $3 \times 10^5$  células/ml) se incubaron durante 48 h con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  en medio completo. Tras esto, se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se centrifugaron y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio completo que contenía DHE (2  $\mu$ M) o 200  $\mu$ l de medio completo que contenía DCFDA (10  $\mu$ M) y se incubaron 15 min a 37°C. Tras la incubación, las células se diluyeron hasta 1 ml con PBS pH 7,4 y se analizaron en el citómetro de flujo. (B) Las células ( $3 \times 10^5$  células/ml) se incubaron con GSH (5 mM), MnTBAP (100  $\mu$ M), IFN $\alpha$  (2000 U/ml) o combinaciones de ellos, según se indica, durante 48h. Transcurrido este tiempo la apoptosis se determinó por unión de anexina-V-PE y citometría de flujo.

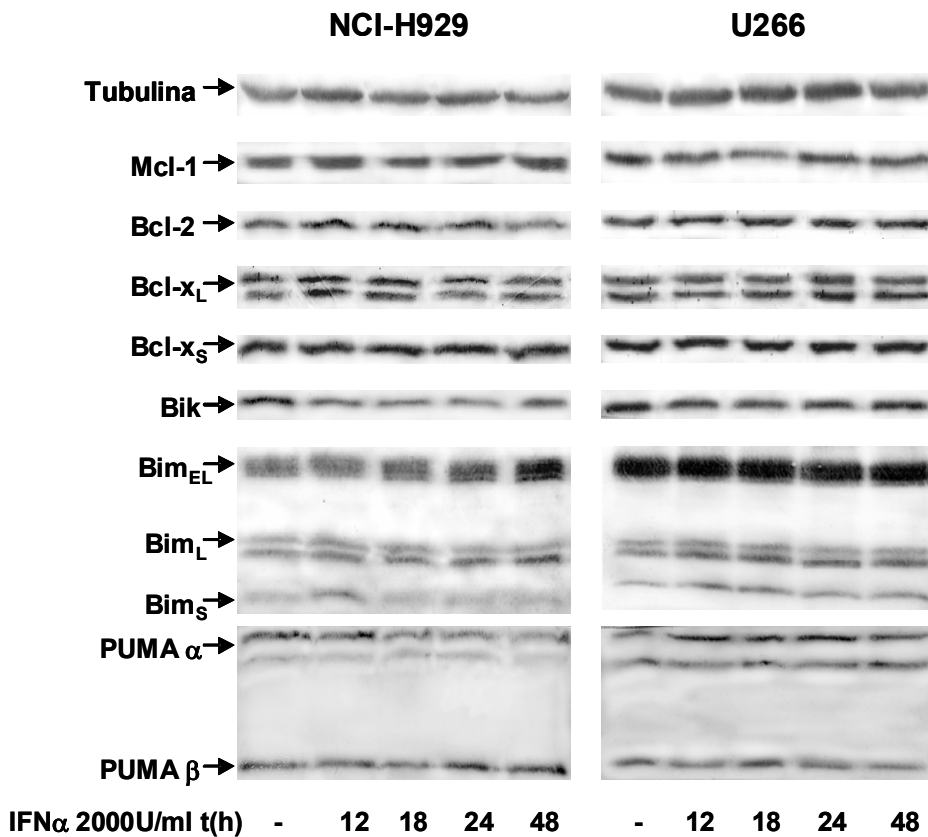
#### 4.3.5.- Implicación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 en la apoptosis inducida por interferón alfa.

##### 4.3.5.1.- Efecto del interferón alfa sobre los niveles de expresión de las proteínas de la superfamilia Bcl-2.

Se estudió el efecto del tratamiento con IFN $\alpha$  sobre los niveles de expresión de proteínas anti-apoptóticas (Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-x<sub>L/S</sub>) y proteínas pro-apoptóticas (Bik, Bim y PUMA) (figura 4.42.).

Los niveles de las proteínas anti-apoptóticas no variaron significativamente tras el tratamiento (figura 4.42.). Sin embargo, en ambas líneas los niveles de Bik disminuyeron ligeramente al principio (18-24 h), pero se recuperaron posteriormente (48 h) (figura 4.42.). También se observaron aumentos de los niveles de Bim<sub>EL</sub> (H929) y Bim<sub>L</sub> (H929 y U266) a lo largo del tratamiento y un aumento de los niveles de Bim<sub>S</sub> (12-18h) (H929 y U266), que después volvieron a disminuir (figura 4.42.), y pequeñas variaciones de los niveles de PUMA a diferentes tiempos en cada una de las líneas celulares (figura 4.42.).

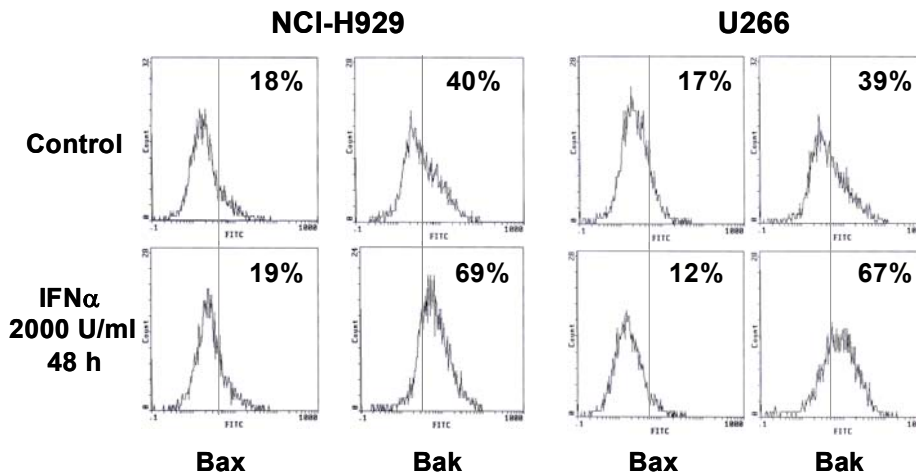
Por otro lado, aunque se ha descrito que la proteína anti-apoptótica Noxa está implicada en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  en algunos modelos celulares (Sun and Leaman, 2005), fuimos incapaces de detectarla en condiciones basales y sus niveles tampoco se incrementaron tras el tratamiento con IFN $\alpha$ .



**Figura 4.42. – Efecto del IFN $\alpha$  en los niveles de proteínas de la superfamilia de Bcl-2.** Las células se incubaron en medio completo con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante los tiempos indicados. Transcurrido cada tiempo de incubación, se realizaron extractos totales de proteínas que se analizaron por electroforesis e inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la cantidad de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -actina.

#### 4.3.5.2.- Efecto del interferón alfa en la conformación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak.

De acuerdo con publicaciones previas (Thyrell et al., 2002), el tratamiento con IFN $\alpha$  indujo el cambio conformacional pro-apoptótico de Bak en las células U266 y NCI-H929. Sin embargo, no se detectó cambio conformacional de la proteína Bax en ninguna de las dos líneas (figura 4.43.).



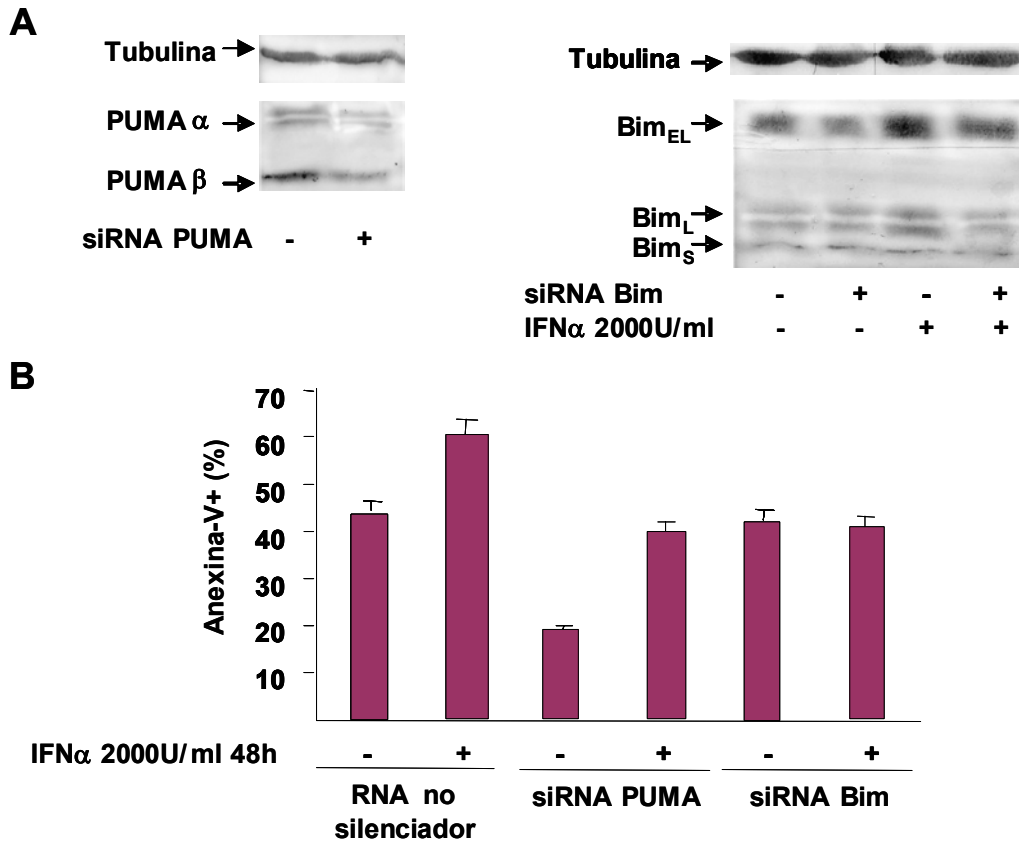
**Figura 4.43. – El tratamiento con IFN $\alpha$  induce cambio conformacional de Bak pero no de Bax.** Las células ( $5 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación,  $1 \times 10^6$  células se fijaron con paraformaldehído al 0,5% en PBS, se incubaron con los anticuerpos que reconocen específicamente la conformación pro-apoptótica (Bax:mAb clon 6A7,  $5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  cel; Bak:mAb clon TC100,  $2,5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$  cel) y se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.3.5.3.- Efecto del silenciamiento de PUMA y Bim en la apoptosis inducida por interferón alfa.

Para evaluar la relevancia del incremento de los niveles de PUMA y Bim durante la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ , se transfectaron células H929 con siRNAs específicamente diseñados para silenciar los genes codificantes de estas proteínas. El nivel de expresión de PUMA se redujo significativamente como consecuencia del silenciamiento y se observó un efecto protector frente a la muerte inducida por el proceso de transfección. Sin embargo, estas células continuaron experimentando apoptosis inducida por IFN $\alpha$ . El silenciamiento de Bim, con su correspondiente siRNA, se detectó en células sin tratar, y en mayor medida en células tratadas con IFN $\alpha$  (figura

4.44.A). Este silenciamiento si acarrió una disminución de la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  (figura 4.44.B), confirmando de este modo la implicación de esta proteína en la fase de inducción del proceso apoptótico del interferón.

En las células U266, pese a ensayar diferentes protocolos y métodos de transfección, así como diferentes secuencias de siRNAs, fuimos incapaces de silenciar tanto PUMA como Bim.



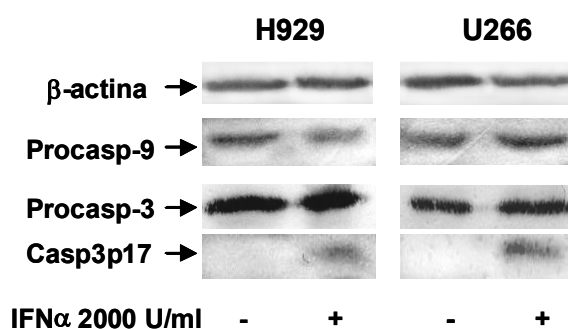
**Figura 4.44.– Efecto del silenciamiento de las proteínas pro-apoptóticas PUMA y Bim en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ .** Las células H929 se electroporaron empleando un nucleofector (Amaxa). Las células ( $2,5 \times 10^6$ ) se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de transfección R más suplemento, que contenían 75 pmoles de siRNA no silenciador, siRNA PUMA o siRNA Bim, según se indica, y se electroporaron con el programa T-01. Una vez transfectadas se sembraron a densidades de  $5 \times 10^5$  cél/ml en medio completo y se incubaron en ausencia (controles) o en presencia de 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h. Pasado este tiempo se realizaron extractos celulares (**A**) o se evaluó la apoptosis por unión a anexina-V-PE y citometría de flujo (**B**).



#### 4.3.6.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por interferón alfa.

##### 4.3.6.1.- Análisis de la activación de caspasas.

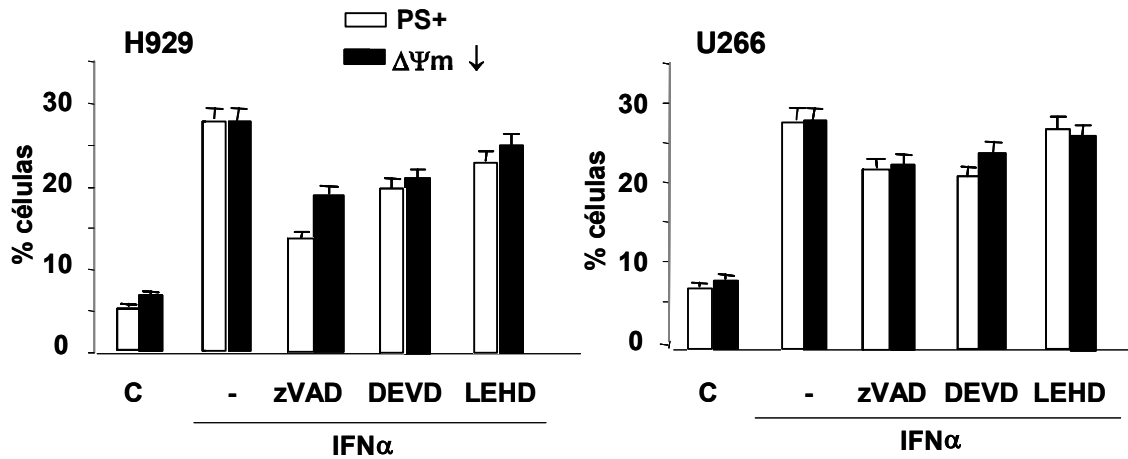
Como consecuencia del tratamiento con IFN $\alpha$  se produjo una discreta activación de caspasas en las células NCI-H929 y U266. No se observó disminución significativa de los niveles de pro-enzima de las caspasas -9 y -3, aunque en ambas líneas se detectó una pequeña cantidad de caspasa-3 activa (figura 4.45.). No obstante, hay que recordar que la pro-caspasa-9 se activa por dimerización, y no necesita ser proteolizada para activarse *in vivo* (Boatright and Salvesen, 2003).



**Figura 4.45.- Activación de caspasas inducida por IFN $\alpha$ .** Las células se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h en medio completo. Transcurrido este tiempo, se hicieron extractos totales de proteínas y se analizó la activación de las caspasas-3, -8 y -9 mediante electroforesis e inmunotransferencia. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.

##### 4.3.6.2.- Efecto de los inhibidores de caspasas.

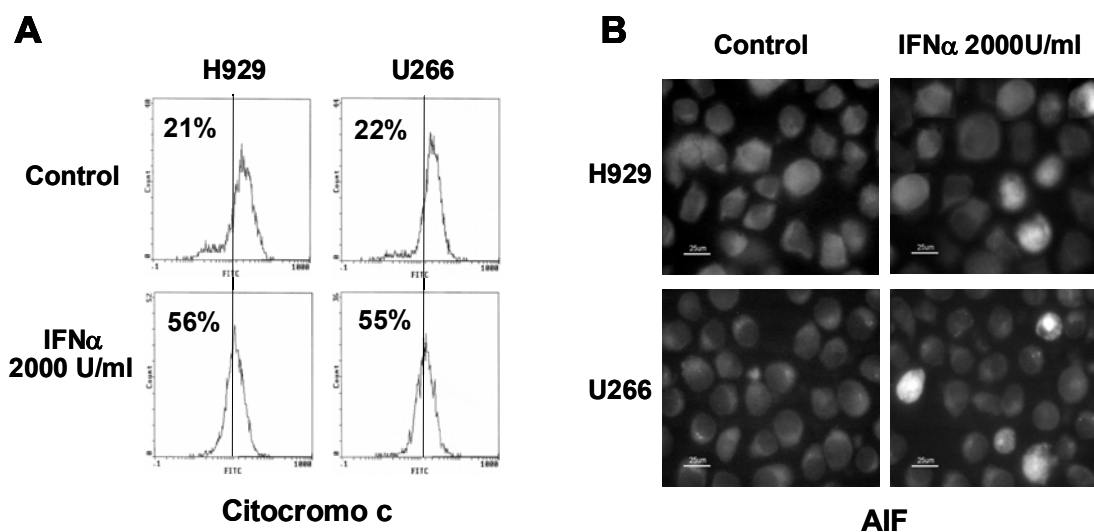
Se analizó el efecto de los inhibidores selectivos de caspasas Z-DEVD-fmk (inhibidor de las caspasas -3 y -7 ) y Z-LEHD-fmk (inhibidor de la caspasa -9) y del inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk en la traslocación de PS y en la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ . En las células H929, Z-VAD-fmk fue quien mostró el mayor efecto protector sobre la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la traslocación de PS, seguido de Z-DEVD-fmk (figura 4.46.). En las células U266 los inhibidores proporcionaron menor protección, obteniéndose resultados similares con Z-VAD-fmk y Z-DEVD-fmk (figura 4.46.). En cualquier caso el efecto protector, cuando se observó con cualquiera de estos inhibidores, sólo fue parcial (figura 4.46.).



**Figura 4.46.- Efecto de los inhibidores de caspasas en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ .**(A) Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se incubaron durante 1h con Z-VAD-fmk, Z-DEVD-fmk o Z-LEHD-fmk (todos a 100  $\mu$ M) en medio completo. Posteriormente se añadieron 2000 U/ml de IFN $\alpha$  y se incubaron 48 h más. La viabilidad se estimó por translocación de PS mediante la unión de anexina-V y por pérdida del  $\Delta\Psi_m$  mediante la sonda DiOC $_6(3)$ . Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

#### 4.3.7.- Liberación de citocromo c y translocación de AIF al núcleo inducida por interferón alfa.

Se analizó también el papel de los mediadores apoptóticos mitocondriales: la salida de citocromo c y la translocación nuclear de AIF, durante la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ . La liberación de citocromo c se observó tanto en las células NCI-H929 como en las U266 (figura 4.47.A). En las células viables, AIF se localizó solamente en el citoplasma, con un patrón punteado y principalmente perinuclear (figura 4.47.B), pero tras el tratamiento con IFN $\alpha$ , las células que empezaban a mostrar morfología apoptótica mostraron también un marcaje de AIF difuso, localizado entre el núcleo y el citoplasma (figura 4.47.B).



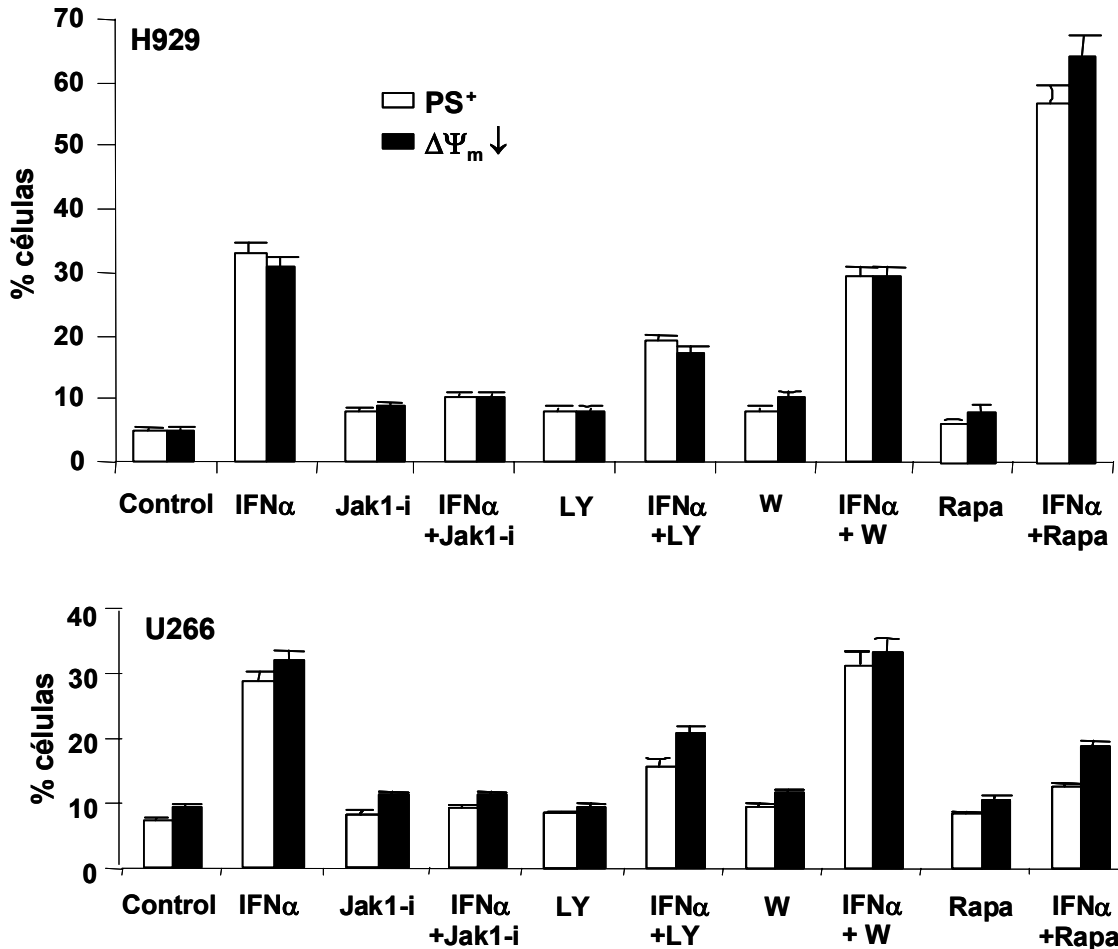
**Figura 4.47.- Análisis de la salida de citocromo c y de la translocación de AIF tras el tratamiento con IFN $\alpha$ .** (A) Las células ( $5 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h. Tras esto, se permeabilizaron, se fijaron, se marcaron con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo c nativo (6H2.B4) y se analizaron por citometría de flujo. (B) Las células ( $5 \times 10^5$  cel/ml) se trataron con 2000 U/ml de IFN $\alpha$  durante 48 h. Después,  $1 \times 10^6$  células, control o tratadas, se fijaron con paraformaldehído sobre cubres de poli-L-Lys, se marcaron con un anticuerpo anti-AIF y se observaron por microscopía de fluorescencia.

#### 4.3.8.- Evaluación de la implicación de la vía Jak/STAT y de la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por interferón alfa.

Se evaluó la implicación de la vía Jak/STAT en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ , por ser la vía principal que media la transducción de la señal de esta citoquina (Platanias, 2005). Para ello, las células se pre-incubaron con un inhibidor selectivo de Jak1 (Thompson et al., 2002) y después se añadió IFN $\alpha$ . El inhibidor fue capaz de eliminar completamente la toxicidad inducida por el interferón (figura 4.48), indicando la implicación positiva de Jak1 en la señalización apoptótica de IFN $\alpha$ .

Por otro lado, se ha propuesto que la vía PI3K/Akt también está implicada en la transducción de la señal apoptótica de IFN $\alpha$  (Platanias, 2005) y que la inhibición de la PI3K y de mTOR previenen la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  en las células U266 (Thyrell et al., 2004), sugiriendo así un papel pro-apoptótico para la vía de la PI3K/Akt. Para esclarecer estos resultados, se analizó el efecto de diferentes inhibidores de esta ruta: LY294002 y wortmanina (inhibidores de la PI3K) y rapamicina (inhibidor de mTOR). Mientras que LY294002 fue capaz de prevenir parcialmente la apoptosis inducida por IFN- $\alpha$  en ambas líneas celulares, la wortmanina, un inhibidor más

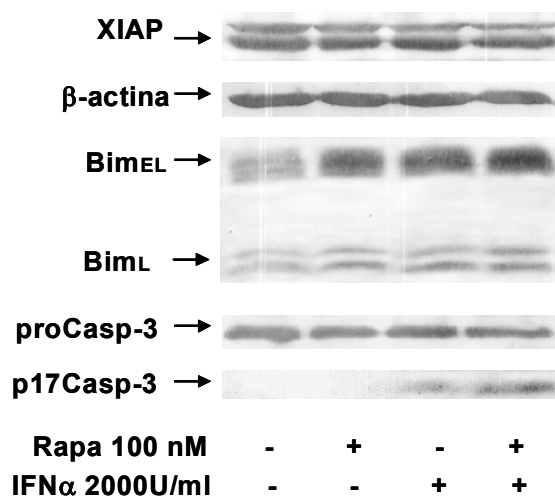
específico de la PI3K (Davies et al., 2000), no mostró ningún efecto protector (figura 4.48.). Respecto a la rapamicina, aunque redujo la muerte celular inducida por IFN $\alpha$  en las células U266, no fue así en las células NCI-H929, donde incluso potenció su toxicidad (figura 4.48.).



**Figura 4.48. – Efecto de los inhibidores de kinasas en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ .** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se preincubaron durante 1 h con el inhibidor selectivo de Jak1 (1 $\mu$ M), LY294002 (10  $\mu$ M), Wortmanina (100 nM) o Rapamicina (100 nM) en medio completo. Después, se añadieron 2000 U/ml de IFN $\alpha$  y se incubaron 48 h más. Transcurrido este tiempo, la apoptosis se estimó por la translocación de PS y la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ .

Por otro lado, se analizó si el efecto protector de LY294002 en ambas líneas celulares y el efecto de rapamicina, protector en U266 y potenciador en H929, podían explicarse por variaciones en la expresión del receptor de IFN $\alpha/\beta$ . Para ello, las células se incubaron sólo en presencia de LY294002 (10  $\mu$ M) o de rapamicina (100 nM) durante 48 h, se analizó la expresión de receptor de IFN $\alpha/\beta$  en membrana y se comparó con la de células sin tratar (controles), no observándose en ningún caso cambios significativos en los niveles de expresión del receptor en la membrana celular.

También se evaluó si el efecto potenciador de rapamicina sobre la toxicidad de IFN $\alpha$  en las células H929 iba acompañado de algún cambio significativo en los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 y en los niveles de activación de caspasas. Se encontró que los niveles de Bim<sub>EL</sub> y Bim<sub>L</sub> aumentaban tras el tratamiento con rapamicina (100 nM) durante 48 h, y que al combinar rapamicina con IFN $\alpha$ , el incremento en los niveles de ambas proteínas era todavía superior al observado con sólo uno de estos agentes (figura 4.49). Por otro lado, se detectó una ligera disminución de la banda de mayor movilidad de XIAP durante el tratamiento combinado rapamicina-IFN $\alpha$  (figura 4.49) y que se correspondió con una mayor activación de caspasa-3 que la observada en el tratamiento con sólo IFN $\alpha$  (figura 4.49).

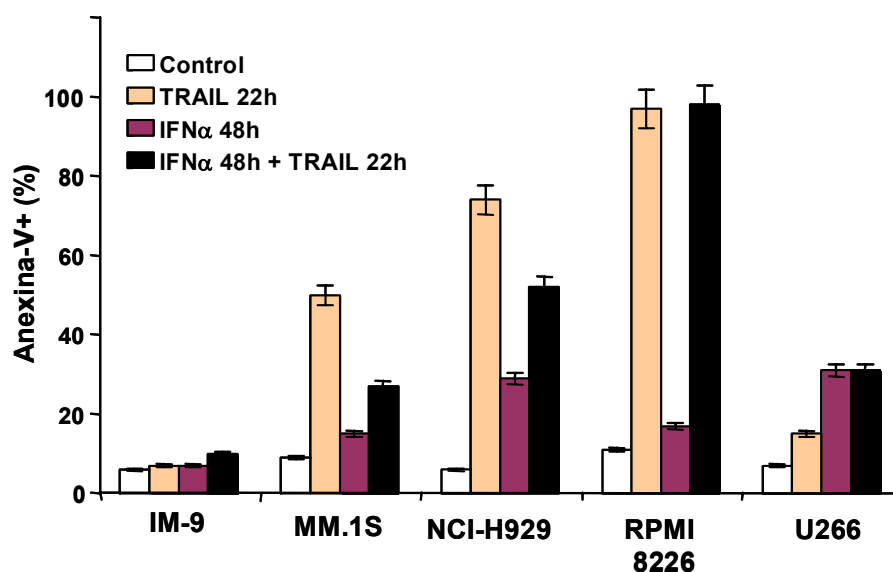


**Figura 4.49.- Efecto potenciador de la rapamicina sobre la toxicidad de IFN $\alpha$ .** Las células se trataron con rapamicina (100 nM), IFN $\alpha$  (2000 U/ml) o ambos durante 48 h en medio completo. Transcurrido este tiempo, se hicieron extractos totales de proteínas que se analizaron por electroforesis e inmunotransferencia usando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.

#### 4.3.9.- Efecto combinado de Apo2L/TRAIL.0 e interferón alfa sobre células de mieloma.

Dado nuestro interés en mejorar la terapia con IFN $\alpha$ , los estudios que estábamos realizando en relación a los parámetros determinantes de la sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 (apartado 4.2.) y las numerosas publicaciones que implicaban a este ligando en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  (Chen,Q. et al., 2001; Crowder et al., 2005), decidimos estudiar el posible efecto sinérgico entre ambos agentes.

Se estudió si el tratamiento con  $\text{IFN}\alpha$  sensibilizaba o no a las células de MM al ligando mortal Apo2L/TRAIL mediante un tratamiento secuencial:  $\text{IFN}\alpha$  durante 48h, y después, tras retirarlo del medio, incubación durante 22 h con Apo2L/TRAIL.0. El pretratamiento con  $\text{IFN}\alpha$  no potenció en ningún caso la toxicidad de Apo2L/TRAIL.0 e incluso redujo la sensibilidad al ligando en las células MM.1S y NCI-H929 (Fig.4.50). En estas células, se evaluó si la pérdida de sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 podía deberse a una disminución en la expresión de receptores DR4 y DR5 en membrana, inducida por el tratamiento con  $\text{IFN}\alpha$ , pero no se detectó ningún cambio apreciable.

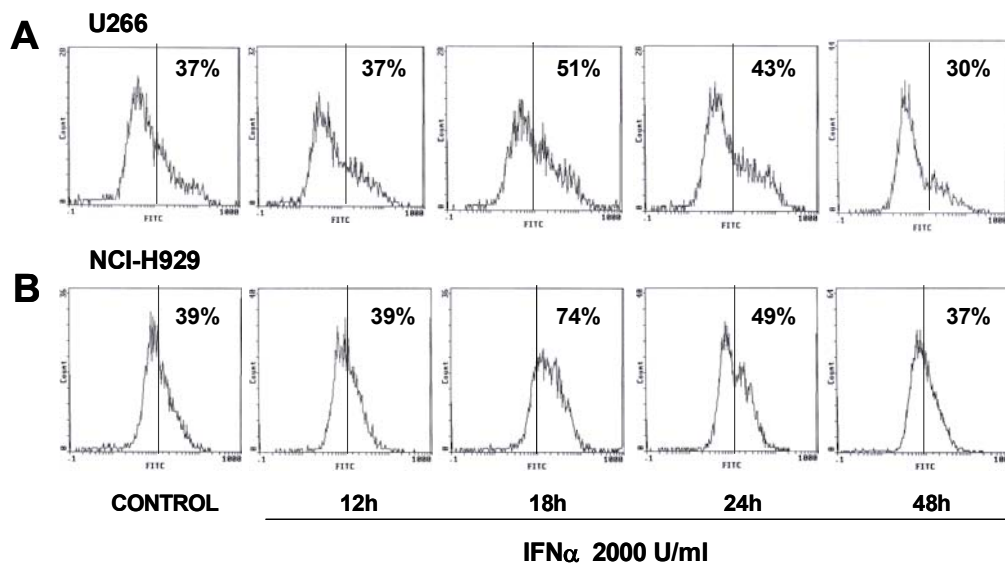


**Figura 4.50. – Inducción de apoptosis en células de MM por un tratamiento secuencial con  $\text{IFN}\alpha$  y Apo2L/TRAIL.0** (A) Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) fueron incubadas en medio completo durante 48 h en placas de 24 pocillos en presencia o ausencia de 2000 U/ml de  $\text{IFN}\alpha$ . Transcurrido este tiempo, se eliminó el  $\text{IFN}\alpha$ , se añadieron 100 ng/ml de Apo2L/TRAIL.0 en los pocillos correspondientes y se incubaron durante 22 h más. La apoptosis se determinó mediante por unión de anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. Los resultados que se muestran son la media  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes.

#### 4.3.10.- Cambios en los niveles de Apo2L/TRAIL en células de mieloma tras el tratamiento con interferón alfa.

Se ha descrito que Apo2L/TRAIL es el mediador de la acción citotóxica del  $\text{IFN}\alpha$  sobre las células de mieloma (Chen,Q. et al., 2001). Por ello, para valorar si el tratamiento de nuestras células con  $\text{IFN}\alpha$  inducía o no la síntesis *de novo* de Apo2L/TRAIL, se sembraron células de MM (IM-9, MM.1S, NCI-H929, RPMI8226 y U266) a densidades de  $1 \times 10^6$  cél/ml y se trataron con 2000 U/ml de  $\text{IFN}\alpha$  durante 48 h.

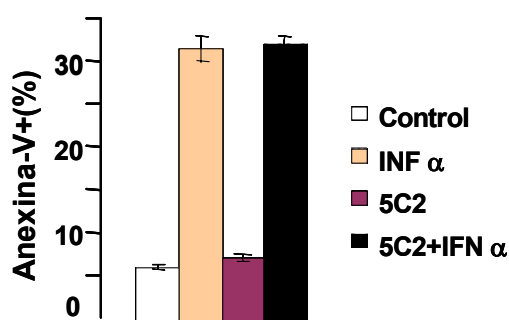
Tras el tratamiento, por un lado, se realizaron co-cultivos de las células tratadas con células RPMI 8226 ( $IC_{50}$  para TRAIL 2 ng/ml), para valorar si se producía citotoxicidad celular debida a la expresión de TRAIL en la membrana de las células tratadas, y por otro lado, se añadieron los sobrenadantes de las células tratadas sobre células RPMI 8226, para valorar si existía secreción de Apo2L/TRAIL al medio de cultivo. En ningún caso se observó toxicidad sobre las células RPMI 8226, evaluada por citometría de flujo. Tampoco se detectó expresión de Apo2L/TRAIL en la membrana plasmática de ninguna de las líneas, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento con  $IFN\alpha$ . En las células U266 y NCI-H929 (sensibles a  $IFN\alpha$ ), los niveles de Apo2L/TRAIL intracelular aumentaron primero (18h) y luego disminuyeron (24-48h), durante el tratamiento con  $IFN\alpha$  (figura 4.51). Sin embargo, y pese a que sí se inducía, al menos en estas líneas, una ligera síntesis y aparente secreción de Apo2L/TRAIL al medio de cultivo, las cantidades secretadas fueron indetectables y no resultaron suficientes para inducir apoptosis en las células RPMI 8226. Alternativamente, Apo2L/TRAIL podría ser degradado intracelularmente y no secretado.



**Figura 4.51.- Efecto del tratamiento con  $IFN\alpha$  sobre los niveles intracelulares de Apo2L/TRAIL.** Las células ( $1,5 \times 10^6$  cel/ml) U266 (A) y NCI-H929 (B) se trataron con 2000U/ml de  $IFN\alpha$  en medio completo durante los tiempos indicados. Tras esto, se permeabilizaron y se marcaron con un anticuerpo anti-Apo2L/TRAIL (5C2). Posteriormente, los niveles intracelulares de Apo2L/TRAIL se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.3.11.- Efecto del anticuerpo bloqueante de TRAIL en la apoptosis inducida por interferón alfa.

Para descartar la posibilidad de que el efecto anti-apoptótico del  $\text{IFN}\alpha$  en las células NCI-H929 (las únicas de nuestro estudio sensibles tanto a  $\text{IFN}\alpha$  como a Apo2L/TRAIL.0) pudiera ser mediado indirectamente por Apo2L/TRAIL, las células se incubaron con  $\text{IFN}\alpha$ , el anticuerpo bloqueante anti-Apo2L/TRAIL (5C2), o ambos. El bloqueante 5C2 no resultó tóxico por sí sólo (figura 4.52.), pero tampoco tuvo efecto significativo sobre la toxicidad de  $\text{IFN}\alpha$  cuando se administró conjuntamente (figura 4.52.).



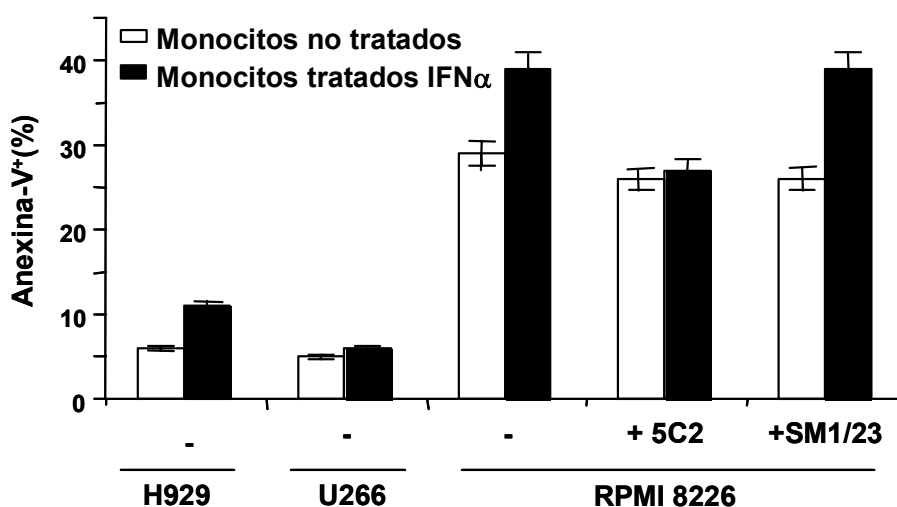
**Figura 4.52.- Efecto del anticuerpo neutralizante anti-TRAIL (5C2) en la toxicidad de  $\text{IFN}\alpha$ .** Se analizó la toxicidad de  $\text{IFN}\alpha$  (2000 U/ml) en células NCI-H929 en ausencia o presencia del anticuerpo bloqueante anti-Apo2L/TRAIL (5C2). Tras 48 h de tratamiento, la apoptosis se evaluó por unión de anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. En ningún caso se observó reducción en la toxicidad del  $\text{IFN}\alpha$ . Los resultados mostrados son la media  $\pm$  SD de tres determinaciones diferentes.

#### 4.3.12.- Liberación al medio de Apo2L/TRAIL inducida por interferón alfa en monocitos de sangre periférica. Efecto de anticuerpos bloqueantes.

Se ha descrito que células T (CD4+), células NK, neutrófilos y sobretodo monocitos pueden incrementar la expresión génica y/o la liberación de Apo2L/TRAIL tras el tratamiento con  $\text{IFN}\alpha/\beta$  (Dorothee et al., 2002; Ehrlich et al., 2003; Kayagaki et al., 1999; Tecchio et al., 2004). Para evaluar la validez de esta propuesta en nuestro modelo, se tomaron monocitos obtenidos a partir de sangre periférica de donantes sanos y se incubaron durante 48 h en medio completo, con o sin  $\text{IFN}\alpha$ , en las mismas condiciones que las células de mieloma. Los sobrenadantes obtenidos de los monocitos, se ensayaron sobre las células RPMI 8226 (muy sensibles a TRAIL, resistentes a  $\text{IFN}\alpha$ ), NCI-H929 (sensibles a TRAIL e  $\text{IFN}\alpha$ ) y U266 (resistentes a TRAIL, sensibles a  $\text{IFN}\alpha$ ).



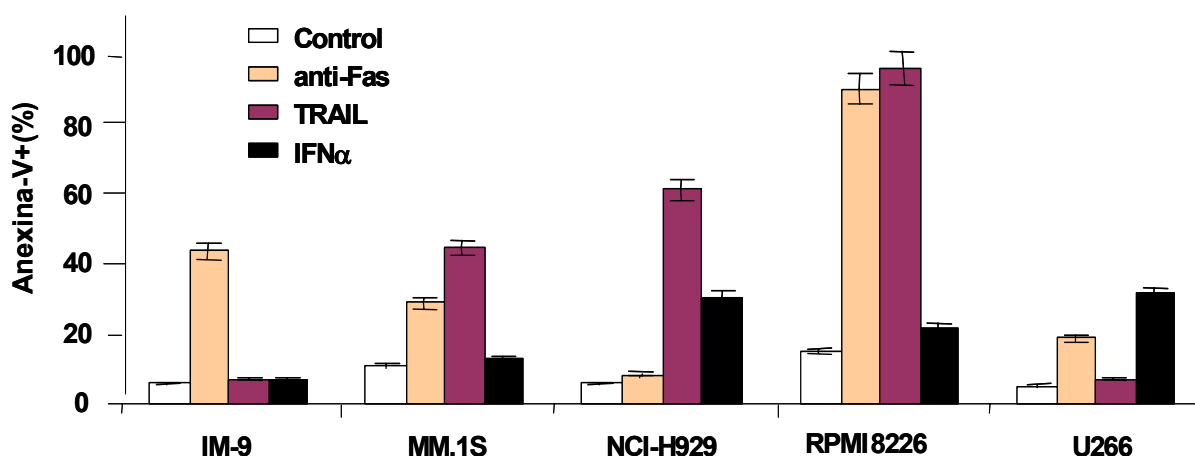
Los sobrenadantes de monocitos control no mostraron toxicidad sobre las células U266 ni NCI-H929, aunque si resultaron tóxicos para las células RPMI 8226 (figura 4.53.). Se desconoce la causa de esta toxicidad, ya que no se redujo en presencia del anticuerpo bloqueante de Apo2L/TRAIL (5C2), ni del anticuerpo bloqueante de Fas (SM1/23). Los sobrenadantes de monocitos tratados con  $IFN\alpha$ , que tampoco resultaron tóxicos sobre las células U266, si fueron ligeramente tóxicos sobre H929 y considerablemente tóxicos sobre RPMI 8226 (figura 4.53.). Cuando estos sobrenadantes se pre-incubaron con el anticuerpo bloqueante de Apo2L/TRAIL (5C2), su toxicidad sobre las células RPMI 8226 se igualó a la toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de monocitos control. No se observó, sin embargo, reducción de toxicidad con el anticuerpo bloqueante de Fas (SM1/23) (figura 4.53.) ni con el anticuerpo bloqueante de Apo3L/TWEAK (Fn14/Fc) (no mostrado). Estos resultados señalan que el tratamiento con  $IFN\alpha$  induce la síntesis y posterior secreción al medio de Apo2L/TRAIL en monocitos de sangre periférica en niveles superiores a los detectados en células de mieloma, y que si son capaces de inducir apoptosis sobre células diana.



**Figura 4.53.– Liberación de Apo2L/TRAIL por monocitos humanos pre-tratados con  $IFN\alpha$ .** Monocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica ( $1 \times 10^6$  cel/ml) se pre-trataron con  $IFN\alpha$  2000 U/ml durante 48 h y posteriormente sus sobrenadantes se ensayaron sobre las células NCI-H929, U266 y RPMI 8226. En algunos casos, los sobrenadantes se pre-incubaron con el anticuerpo bloqueante anti-Apo2L/TRAIL (5C2) durante 1 hora a 4°C y después se añadieron sobre las células RPMI 8226 o las células RPMI 8226 se pre-incubaron durante 20 min a 4°C con el anticuerpo bloqueante anti-Fas (SM1/23) y posteriormente se lavaron, se resuspendieron en los sobrenadantes obtenidos de los monocitos y se reañadió el bloqueante anti-Fas. La apoptosis se evaluó por unión de anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo.

#### 4.3.13.- Sensibilidad comparada de las células de mieloma a interferón alfa y a Apo2L/TRAIL.0

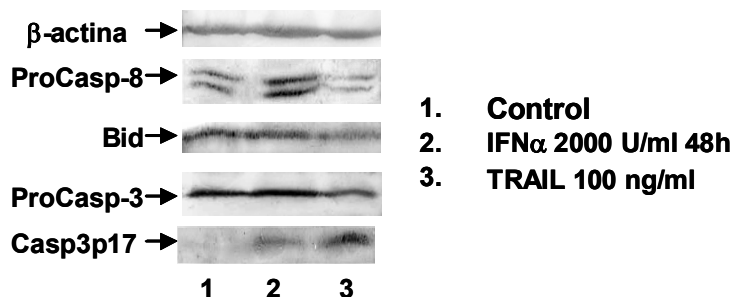
Cuando se compararon las toxicidades inducidas por  $\text{IFN}\alpha$  sobre diferentes líneas de mieloma, con las inducidas por Apo2L/TRAIL.0 y el anticuerpo citotóxico anti-Fas sobre las mismas líneas, no se encontró correlación. Las células RPMI 8226, que fueron las más sensibles a los efectos apoptóticos de TRAIL.0 y del anticuerpo anti-Fas, apenas mostraron sensibilidad a  $\text{IFN}\alpha$  (figura 4.54.), mientras que las células U266, resistentes a Apo2L/TRAIL.0, pero parcialmente sensibles a anti-Fas (en torno a un 15% y un 40% de muerte celular, respectivamente) y las células NCI-H929, sensibles a Apo2L/TRAIL.0 y resistentes a anti-Fas (en torno a un 50% y un 10% de muerte celular, respectivamente), fueron las más sensibles a  $\text{IFN}\alpha$  (Fig.4.54.).



**Figura 4.54.-Citotoxicidad de anti-Fas, Apo2L/TRAIL e  $\text{IFN}\alpha$  sobre células de mieloma.** Las células ( $3 \times 10^5$  cel/ml) se incubaron en medio completo con anti-Fas (100 ng/ml), Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml) durante 22h o con  $\text{IFN}\alpha$  (2000U/ml) durante 48h. La apoptosis se determinó por unión de anexina-V-PE y citometría de flujo.

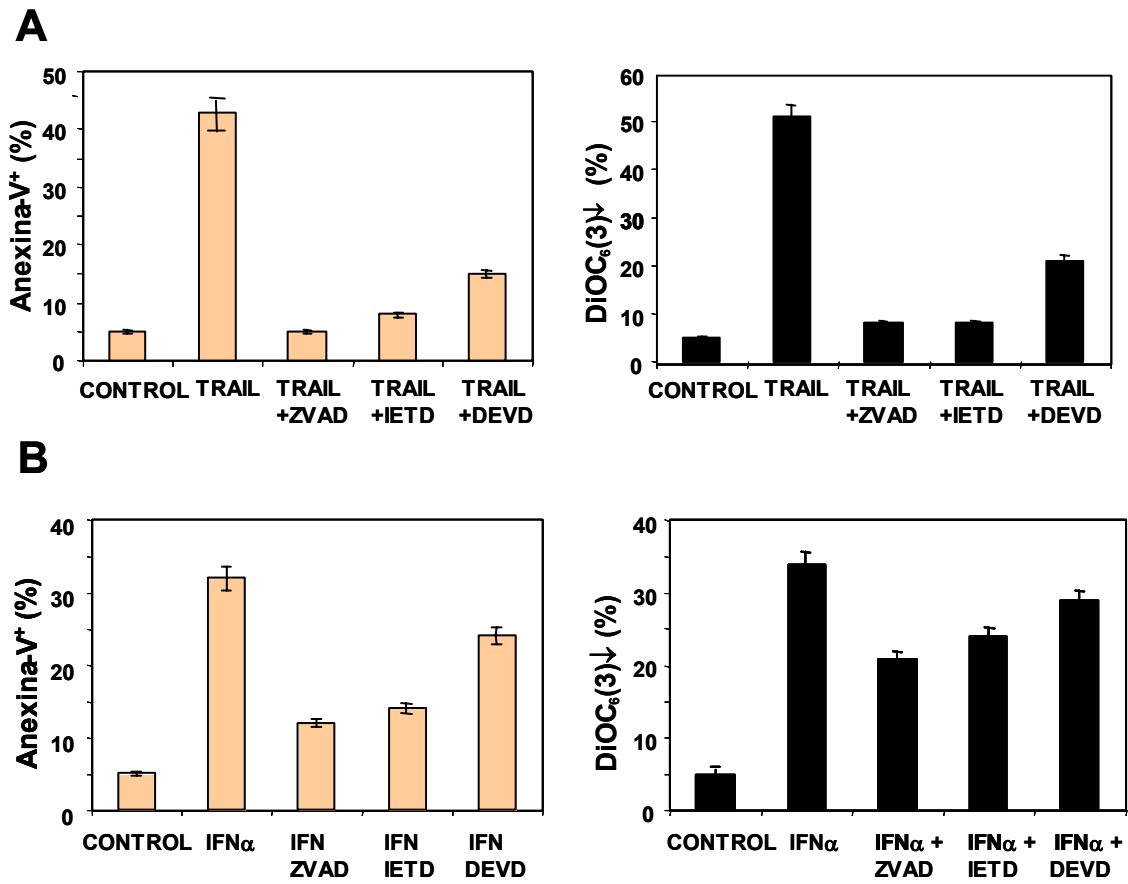
Por otro lado, se realizaron estudios comparativos de análisis de la activación de caspasas y de la inhibición de su actividad en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 e  $\text{IFN}\alpha$  en la línea celular NCI-H929, por ser la única sensible a ambos. Cuando las células se trataron con  $\text{IFN}\alpha$ , no se observó una reducción significativa de los niveles de caspasa-8, caspasa-3 ni de Bid. Sólo en el caso de la caspasa-3 se observó una débil activación caracterizada por la presencia de la banda correspondiente a la forma activa de 17 kDa (figura 4.55.).

Al tratar las células con Apo2L/TRAIL.0, se observó una fuerte activación tanto de caspasa-8 como de caspasa-3 y una disminución en los niveles de Bid, sustrato específico de la caspasa-8 (figura 4.55.).



**Figura 4.55.– Activación de caspasas tras el tratamiento con IFN $\alpha$  o con Apo2L/TRAIL.** Las células NCI-H929 se trataron con IFN $\alpha$  (2000 U/ml durante 48h) o con Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml durante 22h), se realizaron extractos celulares y se analizó la activación de caspasas y los niveles de Bid mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\beta$ -actina.

Los inhibidores de las caspasas-8 y -3 (Z-IETD-mk y Z-DEVD-fmk, respectivamente) o el inhibidor general de caspasas (Z-VAD-fmk), protegieron completamente de la caída del  $\Delta\Psi_m$ , la exposición de PS y la morfología apoptótica inducida por Apo2L/TRAIL.0 en las células NCI-H929 (figura 4.56.A), concordante con el papel desempeñado por la caspasas en la vía extrínseca de apoptosis. Sin embargo, estos inhibidores sólo tuvieron un efecto parcial o mínimo sobre la caída del  $\Delta\Psi_m$ , la exposición de PS y la morfología apoptótica inducida por IFN $\alpha$  en las mismas células (figura 4.56.B).



**Figura 4.56.- Efecto de los inhibidores de caspasas en la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0 e IFN $\alpha$  en células H929.** Se evaluó la toxicidad de Apo2L/TRAIL.0 y de IFN $\alpha$  sobre las células NCI-H929 en presencia de Z-VAD-fmk, Z-IETD-fmk o Z-DEVD-fmk (todos a 100  $\mu$ M). Los inhibidores se añadieron 1 h antes del tratamiento con IFN $\alpha$  (48 h) o con Apo2L/TRAIL.0 (22 h) y la muerte celular se estimó por la exposición de PS y pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , determinados ambos parámetros por citometría de flujo. Los resultados que se muestran son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes.

#### 4.3.14.- Discusión.

Aunque el IFN $\alpha$  se sigue empleando como terapia de mantenimiento en pacientes de mieloma múltiple, los beneficios de este tratamiento continúan siendo materia de controversia (Kyle and Rajkumar, 2004). Estudios *in vitro* muestran que el IFN $\alpha$  puede tanto estimular como inhibir la proliferación de las células de mieloma (Jelinek et al., 1997), lo cual podría explicar la variabilidad de respuesta observada entre unos y otros pacientes (Kyle and Rajkumar, 2004). Por un lado, IFN $\alpha$  estimula la supervivencia de ciertas células de mieloma, impidiendo la apoptosis inducida por la eliminación de IL-6 o por la adición de dexametasona (Ferlin-Bezombes et al., 1998).

Se ha propuesto que esta estimulación de la supervivencia celular podría deberse a un aumento de los niveles de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 (Puthier et al., 2001). Por otro lado, IFN $\alpha$  induce apoptosis en otras líneas de mieloma (Chen,Q. et al., 2001), aunque hasta ahora todos los estudios se han centrado en la apoptosis inducida sobre las células U266. Esta apoptosis es independiente de la parada del ciclo celular y del estado mutacional de p53 (Thyrrell et al., 2002), pero respecto a su mecanismo, todavía hoy, no se ha caracterizado y son muchas las hipótesis planteadas. Varios trabajos proponen que IFN $\alpha$  podría inducir apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial (Panaretakis et al., 2003; Thyrell et al., 2002), acompañada de la activación de caspasas, pérdida del potencial mitocondrial y salida del citocromo c (Thyrell et al., 2002), pero no concluyen nada a cerca de la fase de inducción del proceso apoptótico. Nosotros hemos evaluado los cambios en proteínas de la superfamilia Bcl-2 inducidos tras el tratamiento con IFN $\alpha$ . Se ha detectado cambio conformacional de Bak, pero no de Bax, ligeras variaciones en los niveles de PUMA y un considerable incremento de los niveles de las diferentes isoformas de Bim en ambas líneas celulares. El silenciamiento de Bim, pero no de PUMA, con técnicas de siRNA, redujo la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ , implicando de forma positiva a esta proteína en el proceso apoptótico inducido por la citoquina. Pudiera ser que el aumento de Bim favoreciera el cambio conformacional de Bak, permitiendo su oligomerización y la salida de citocromo c, lo que contribuiría a la formación del apoptosoma, activación de caspasas y finalmente a la muerte celular. En el caso de PUMA, su silenciamiento proporcionó un considerable efecto protector frente a la apoptosis debida al estrés de transfección, lo cual podría explicarse por la presencia de un estatus p53 silvestre en las células H929 (Bolick et al., 2003) en que se realizó el experimento. No ofreció, sin embargo, protección a la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ .

La inhibición de la vía Jak/STAT, la principal vía asociada con la señalización de los interferones, mediante el empleo de un inhibidor selectivo de Jak1 (Thompson et al., 2002), eliminó por completo la toxicidad del IFN $\alpha$ , demostrando que esta vía es también la principal implicada en la transmisión de la señal apoptótica. Por otro lado, se ha descrito que LY294002, un inhibidor de la PI3K, y la rapamicina, un inhibidor de mTOR, previenen la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  en las células U266, implicando positivamente a la vía PI3K/Akt/mTOR en esta apoptosis (Thyrrell, 2004). Sin embargo, nuestros resultados indican que aunque LY294002 sí previene en parte de la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  tanto en las células U266 como H929, la wortmanina, un inhibidor más específico de la PI3K (Davies et al., 2000), no muestra efecto protector.

Además, aunque la rapamicina si protegió ligeramente de la apoptosis en las células U266, en las células H929, por el contrario, potenció la toxicidad del IFN $\alpha$ . En conjunto, estos resultados hacen dudar de la implicación de la vía PI3K/Akt/mTOR en la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ . Algo que viene apoyado por el hecho de que el IFN $\alpha$  no induce la activación de Akt en las células U266 (Uddin et al., 2000; Thyrell et al., 2004).

Se analizó en más detalle el efecto potenciador de rapamicina en H929, observándose que rapamicina induce un incremento de los niveles de Bim y una muy ligera reducción de niveles de XIAP, que permite una mayor activación de caspasas y mayor susceptibilización de las células a la apoptosis inducida por IFN $\alpha$ . Estos resultados refuerzan la implicación positiva de Bim en el mecanismo apoptótico del IFN $\alpha$ , y sugieren que su ausencia podría ser un factor condicionante de resistencia a interferón. Apoyando esta hipótesis, la línea celular IM-9, que pese a expresar altos niveles de la cadena 2 del receptor de IFN $\alpha/\beta$ , es totalmente insensible a los efectos de esta citoquina, no expresa la proteína pro-apoptótica Bim (Gómez-Benito et al., 2005a), pudiendo ser este uno de los factores que condicionan su resistencia.

También se había propuesto que el IFN $\alpha$  inducía apoptosis en las células de mieloma de modo autocrino, aumentando la síntesis y la liberación de Apo2L/TRAIL (Chen,Q. et al., 2001). Sin embargo, ni la localización subcelular concreta de Apo2L/TRAIL, ni su posible secreción se habían analizado con detalle. En un trabajo reciente, y utilizando diferentes líneas celulares de MM, se ha descrito que el tratamiento con IFN $\alpha$  induce un aumento de la expresión del gen PML y que esto correlaciona con la inducción de la síntesis y la secreción al medio de cultivo de Apo2L/TRAIL (Crowder et al., 2005), pero el estudio no cuantifica la apoptosis directamente inducida por IFN $\alpha$ , ni la cantidad de Apo2L/TRAIL secretado por las células de mieloma. Nuestros resultados muestran que IFN $\alpha$  y Apo2L/TRAIL causan diferentes efectos sobre las células de mieloma e inducen apoptosis a través de mecanismos esencialmente diferentes. Así, las células U266, sensibles a los efectos apoptóticos del interferón alfa, se mostraron resistentes a los efectos citotóxicos tanto de Apo2L/TRAIL.0 como del anticuerpo citotóxico anti-Fas. Además, células U266 pre-tratadas durante 48 h con IFN $\alpha$ , no se sensibilizaron a Apo2L/TRAIL.0, y en las células H929 y MM.1S, el mismo pre-tratamiento con IFN $\alpha$ , redujo la sensibilidad al ligando. Por otro lado, los sobrenadantes de células U266 y H929 tratadas con IFN $\alpha$ , no fueron citotóxicos sobre células RPMI 8226 (muy sensibles a los efectos apoptóticos de

Apo2L/TRAIL), mientras que si lo fueron los sobrenadantes obtenidos a partir de monocitos tratados con IFN $\alpha$  en las mismas condiciones que las células de mieloma. Además, las vías apoptóticas ejecutadas por IFN $\alpha$  y Apo2L/TRAIL.0 fueron diferentes ya que Z-IETD-fmk (inhibidor de la caspasa-8), Z-DEVD-fmk (inhibidor de la caspasa-3) y el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk, bloquearon eficientemente la apoptosis inducida por Apo2L/TRAIL.0, pero no la inducida por IFN $\alpha$ .

De acuerdo con todo lo que se ha expuesto, IFN $\alpha$  podría ser empleado como terapia mantenimiento en pacientes cuyas células de mieloma expresen Bim. En aquellos pacientes en los que la expresión de Bim en las células mielomatosas sea baja, pero se incremente en ensayos *in vitro* tras en tratamiento con rapamicina sin inducir citotoxicidad, podría proporcionarse una terapia combinada con IFN $\alpha$  y rapamicina. Por otro lado, y aunque se ha demostrado que Apo2L/TRAIL no es mediador directo de los efectos del IFN $\alpha$  *in vitro*, los resultados obtenidos con los sobrenadantes de monocitos no han de excluir a Apo2L/TRAIL como un posible mediador importante de los efectos anti-tumorales de IFN $\alpha$  *in vivo*. Si este fuera el caso, entonces Apo2L/TRAIL podría ser un buen candidato a reemplazar a IFN $\alpha$  en la terapia de mantenimiento en aquellos pacientes de mieloma que no respondan al interferón .

## **4.4.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MCL-1 EN MIELOMA EN LA SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS.**

### **4.4.1.- Introducción.**

Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) es una proteína anti-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2. Fue descrita por primera vez en 1993 por su participación en el proceso de diferenciación de las células mieloides humanas (Kozopas et al., 1993). En seguida se relacionó con la proteína Bcl-2 dada la elevada similitud de sus secuencias y se determinó que su papel, al igual que en el caso de Bcl-2, era más bien el de promover la diferenciación y viabilidad celular, que el de inducir proliferación (Kozopas et al., 2003). Al igual que la mayor parte de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, Mcl-1 contiene un dominio hidrofóbico C-terminal que permite su asociación con diferentes membranas intracelulares, especialmente con la membrana externa mitocondrial (Yang et al., 1995). Esta última localización permite que actúe como molécula clave en el control de la apoptosis vía mitocondrial, interfiriendo en la liberación de citocromo c y promocionando la supervivencia celular (Michels et al., 2005). A diferencia de otras proteínas de supervivencia, Mcl-1 es una proteína de vida media corta y alto recambio celular, debido a la presencia de secuencias PEST (P=prolina, E=glutámico, S=serina, T=treonina), secuencias específicas de ubiquitinación, que determinan su degradación vía proteasoma ( Le Gouill et al., 2004).

Numerosos estudios han demostrado que la expresión de Mcl-1 es crítica en la supervivencia del mieloma (Derenne et al.,2002; Zhang et al., 2002) y que es necesario que se mantenga un nivel umbral mínimo de proteína para el mantenimiento de la viabilidad celular (Zhang et al., 2002). El silenciamiento del gen mcl-1 con estrategias anti-sentido induce apoptosis en células de mieloma, mientras que el silenciamiento de bcl-2 o bcl-x<sub>L</sub> tiene pocos o ningún efecto (Derenne et al.,2002; van de Dock et al.,2003; Liu and Gazitt, 2003). Por otro lado, se ha observado que Mcl-1 es la única proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2 cuyos niveles se modifican tras el tratamiento de células de mieloma con diferentes citoquinas (Puthier et al., 1999 y 2001; Jourdan et al., 2000 y 2003) y disminuyen tras el tratamiento con drogas quimioterapéuticas (Le Gouill et al., 2004; Gómez-Benito et al., 2005a). Además, en las células de mieloma, la eliminación de Mcl-1 conlleva la ruptura de los complejos



Mcl-1/Bim, liberándose Bim y facilitando la oligomerización de proteínas pro-apoptóticas multidominio de la familia Bcl-2, como Bax y/o Bak, promocionando la inestabilidad mitocondrial y la salida de citocromo c (Gomez-Bougie et al., 2004). Todos estos datos sugieren que los niveles elevados de Mcl-1 en células de mieloma podrían actuar como un mecanismo de resistencia a la apoptosis. De hecho, estudios con pacientes de mieloma han mostrado que aquellos cuyas células mielomatosas sobreexpresan Mcl-1 muestran peor respuesta a la quimioterapia, más recaídas y una menor supervivencia libre de enfermedad (Wuillème-Toumi et al., 2005).

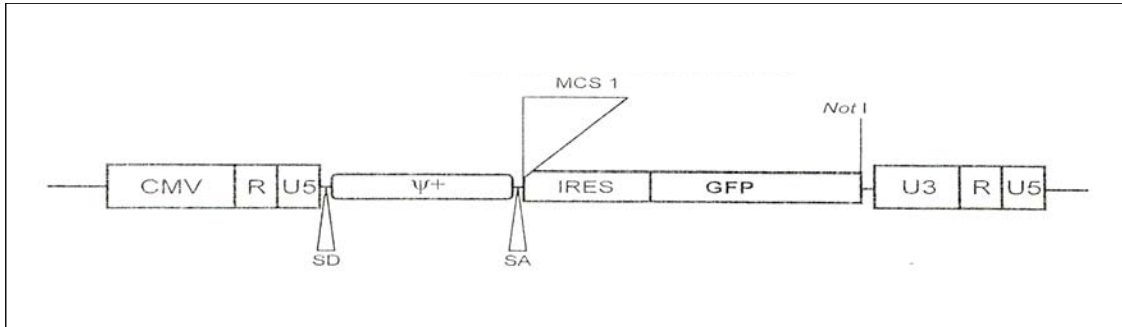
En este trabajo hemos obtenido, mediante infección viral, células de mieloma que sobreexpresan la proteína Mcl-1 de forma estable y hemos estudiado como esta sobreexpresión afecta a la sensibilidad a la apoptosis inducida por diferentes tratamientos anti-mieloma.

#### **4.4.2.-Análisis de la sobreexpresión de Mcl-1.**

Para estudiar la implicación de la proteína Mcl-1 en la sensibilidad a la apoptosis de las células de mieloma, se obtuvieron líneas celulares, derivadas de la línea de mieloma U266, que sobreexpresan la proteína anti-apoptótica de forma estable empleando una técnica de transfección retroviral (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Carvajal-Vergara et al., 2005; apartado 3.2.8.). Esta técnica permite la integración a nivel cromosómico del gen celular de interés. Posteriormente y sirviendonos de un clonaje por dilución límite, obtuvimos líneas clonales a partir de las células que habían insertado el gen.

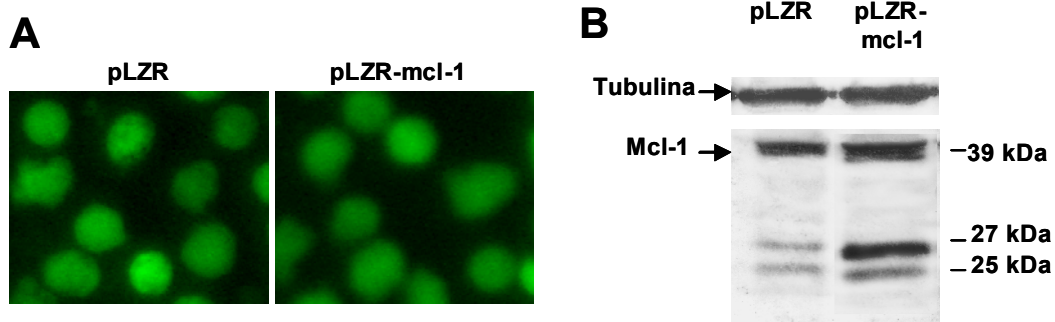
La mayor parte los vectores empleados en transfecciones retrovíticas contienen unidades de transcripción independientes para el gen usado como marcador y para el gen de interés. Esto hace que la eficiente expresión del gen marcador no tenga porqué correlacionar con una también eficiente expresión del gen de interés. En este caso, se han empleado vectores retrovirales bicistrónicos (Abad et al., 2002) que contienen un sitio de unión interna al ribosoma (IRES; *internal ribosome entry site*) que permite que el gen marcador y el gen de interés se expresen independientemente pero a partir de una misma unidad de transcripción, por lo que en este caso, una eficiente expresión de uno si correlaciona con una eficiente expresión del otro. El vector bicistrónico que hemos empleado (pLZR-IRES-GFP) contiene como marcador el gen

de la proteína fluorescente verde (GFP) y se ha construido a partir del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) (figura 4.57.). Por técnicas de ingeniería genética y biología molecular, obtuvimos a partir de él, otro vector bicistrónico con el gen de interés (mcl-1) clonado en su polilinker (pLZR-IRES-GFP-mcl-1), y a partir de ambos vectores y de células U266, las sublíneas U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 de ahora en adelante, que contienen el vector vacío y el vector con el gen de interés, respectivamente.



**Figura 4.57.- Estructura del vector bicistrónico pLZR-IRES-GFP.** CMV = cytomegalovirus promoter, R = MoMLV R, U5 = MoMLV U5, MCS = multiple cloning site (BamHI-EcoRI-XhoI-BstBI-EcoRI), IRES = internal ribosome entry site, GFP = green fluorescent protein (Abad et al., 2002)

Las dos sublíneas, U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1, expresaron eficientemente la proteína empleada como marcador (GFP) (figura 4.58.A). Sin embargo, y como se esperaba, sólo las células U266-pLZR-mcl-1 sobreexpresaron la proteína Mcl-1 (figura 4.58.B). Se observaron bandas de peso molecular inferior al de Mcl-1, resultado del procesamiento alternativo de la proteína en exceso (Zhang et al., 2002) (figura 4.58.B).



**Figura 4.58.- Expresión de las proteínas GFP y Mcl-1 en las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1.** (A) Las células, U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1, se observaron y fotografiaron al microscopio de fluorescencia para evaluar la expresión de la GFP. Aumento original x400. (B) Se realizaron extractos celulares totales de  $1 \times 10^6$  células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1. Las proteínas se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS, se inmunotransfirieron y se analizó la expresión de Mcl-1 usando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de  $\alpha$ -tubulina.

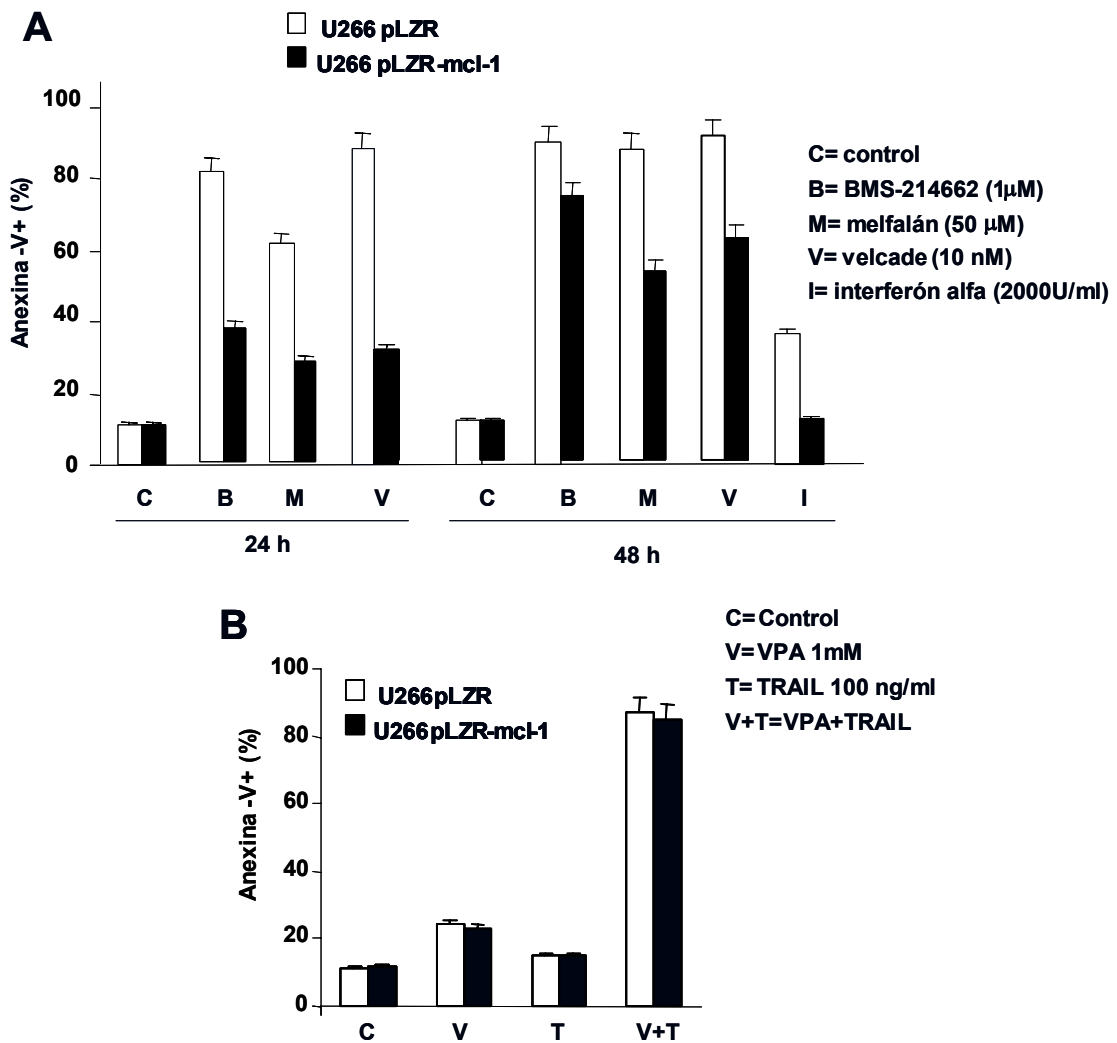
#### 4.4.3.- Efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 en la sensibilidad a la apoptosis.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de Mcl-1 en la sensibilidad celular a la apoptosis, las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 se trataron con diferentes agentes terapéuticos que inducen apoptosis vía mitocondrial:

- BMS-214662, un inhibidor de farnesil-transferasas perteneciente a los fármacos de nueva generación, que actualmente se está evaluando en ensayos clínicos de fase I (apartado 4.1.).
- Melfalán, perteneciente a los denominados fármacos clásicos, y que ha sido empleado en quimioterapia del mieloma, solo o en combinación con otros agentes, desde 1962.
- Velcade® (Bortezomib, PS-341), un potente inhibidor del proteasoma, también fármaco de nueva generación, pero cuyo empleo en el tratamiento de mieloma refractario ha sido recientemente aprobado por la FDA.
- Interferón-alfa (IFN $\alpha$ ), una citoquina que se ha empleado como terapia de mantenimiento en el mieloma durante más de 20 años (apartado 4.3).

Las células U266-pLZR fueron sensibles a todos los tratamientos, mientras que la sobreexpresión de Mcl-1 en las células U266-pLZR-mcl-1, redujo considerablemente la toxicidad de los diferentes agentes a las 24 h de tratamiento (BMS-214662, melfalán, Velcade) (figura 4.59.A) y a las 48 h (IFN $\alpha$ ) (figura 4.59.A). Este efecto protector de Mcl-1 no se mantuvo, sin embargo, más allá de las 30-48 h, momento a partir del cual, la toxicidad inducida por los diferentes agentes sobre las células U266-pLZR-mcl-1 empezó a ser muy significativa (figura 4.59.A). La protección temporal proporcionada por Mcl-1 contrasta con la aparente protección permanente observada en leucemias que sobreexpresan Bcl-2 (Gamen et al., 2000).

Por otro lado, también se evaluó el efecto de la sobre-expresión de Mcl-1 en la sensibilidad al tratamiento combinado VPA+TRAIL, que induce apoptosis a través de la vía extrínseca. En este caso, ambas líneas celulares, U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1, resultaron igualmente sensibles (figura 4.59.B).

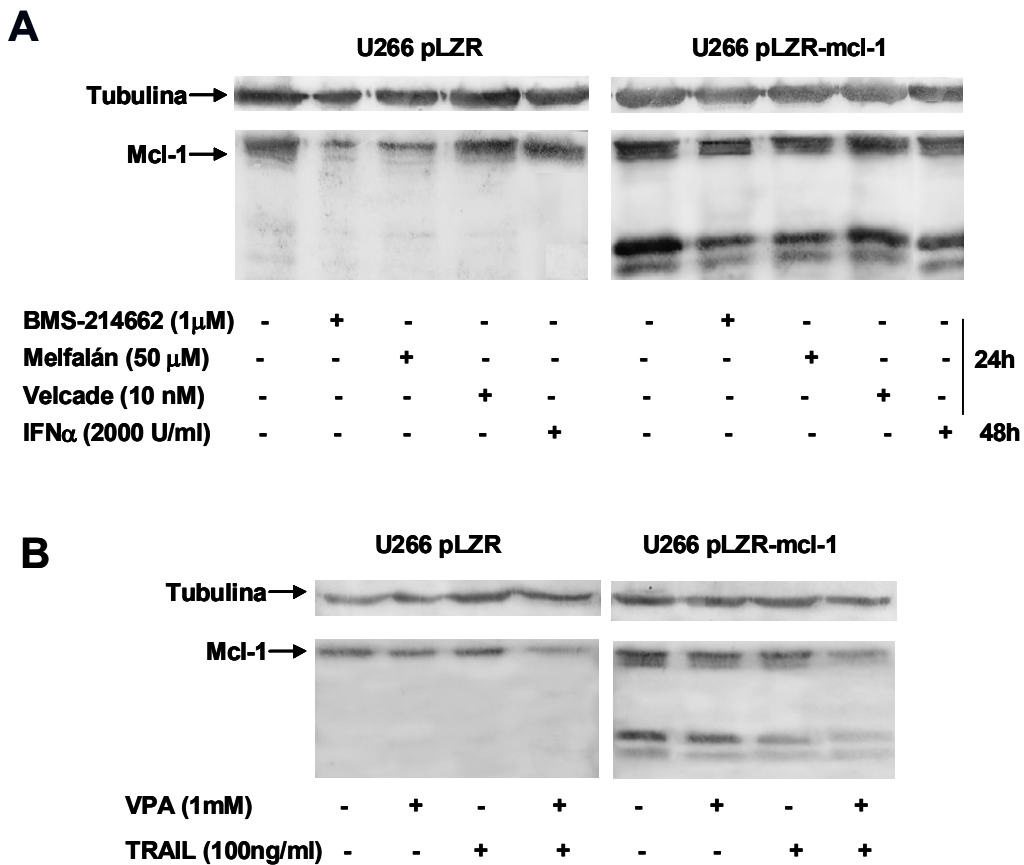


**Figura 4.59.- Efecto de la sobre-expresión de Mcl-1 en la sensibilidad a la apoptosis. (A)** Las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 ( $3 \times 10^5$  cél/ml) se incubaron en medio completo en presencia de BMS (1  $\mu$ M), melfalán (50  $\mu$ M), Velcade (10 nM) o IFN $\alpha$  (2000 U/ml) durante 24 o 48 h, según se indica. Pasado este tiempo la apoptosis se evaluó por unión a anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo. **(B)** Las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 ( $3 \times 10^5$  cél/ml) se pre-incubaron en medio completo con VPA (1mM) durante 6 h, posteriormente se añadió o no Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml), según se indica, y las células se incubaron durante 18 h más. Pasado este tiempo la apoptosis se evaluó por unión a anexina-V-PE y posterior análisis por citometría de flujo.

Se determinó el efecto que estos tratamientos tenían sobre los niveles de expresión de Mcl-1 en ambas líneas. En las células U266-pLZR, el tratamiento durante 24 h con BMS-214662 y melfalán indujo disminución de los niveles de Mcl-1 (figura 4.60.A), comprometiendo de este modo la viabilidad celular. El tratamiento durante 24 h con Velcade no produjo disminución de los niveles de Mcl-1 (figura 4.60.A), aunque sí apoptosis. Esto se debió a la inhibición de la actividad del proteasoma, que impide la

degradación de Mcl-1, pero no la muerte celular. Tampoco el tratamiento con IFN $\alpha$  durante 48h modificó los niveles de Mcl-1 (figura 4.60.A.), pero sí indujo apoptosis, algo que ya se había observado previamente (apartado 4.3.). En la inducción de apoptosis a través de la vía extrínseca con VPA+TRAIL, sólo se detectó una ligera disminución de los niveles de Mcl-1, y sólo en el tratamiento combinado. Esta fue debida probablemente a la proteólisis vía caspasa-3 activa.

En las células U266-pLZR-mcl-1, a los mismos tiempos y condiciones de tratamiento, no se observó disminución significativa de los niveles de Mcl-1 cuando las células se trataron con agentes que inducen apoptosis vía mitocondrial (figura 4.60.A), pudiendo ser esta la causa de que se preservara la viabilidad celular durante más tiempo, al menos en el caso de BMS-214662 y melfalán. A partir de las 30 h de tratamiento, los niveles de Mcl-1 empezaron a disminuir en algunos casos (BMS-214662, melfalán) o no (Velcade) (no mostrado), correspondiéndose esta disminución con un importante incremento de la citotoxicidad inducida por el fármaco. Sin embargo, cuando las células U266-pLZR-mcl-1 se trataron con VPA + TRAIL, si se detectó una ligera disminución de los niveles de Mcl-1, comparable a la observada en las células U266-pLZR y posiblemente debida a la proteólisis mediada por la caspasa-3 activa (figura 4.60.B). Estos resultados concuerdan con la ausencia de efecto protector de la sobreexpresión de Mcl-1 en la apoptosis vía extrínseca.



**Figura 4.60.- Cambios en los niveles de Mcl-1 inducidos por los diferentes agentes terapéuticos. (A)** Las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 se incubaron en medio completo en presencia de BMS (1 μM), melfalán (50 μM) o Velcade (10 nM) durante 24 h o IFNα (2000 U/ml) durante 48 h. Pasado este tiempo, se realizaron extractos celulares y se analizaron los niveles de Mcl-1 mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de α-tubulina. **(B)** Las células U266-pLZR y U266-pLZR-mcl-1 se se pre-incubaron en medio completo con VPA (1mM) durante 6 h, posteriormente se añadió o no Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml), según se indica, y las células se incubaron durante 18 h más. Pasado este tiempo, se realizaron extractos celulares y se analizaron los niveles de Mcl-1 mediante electroforesis e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos específicos. La cantidad de proteína cargada se normalizó mediante la detección de α-tubulina.

#### 4.4.4.- Discusión.

Las proteínas de la superfamilia Bcl-2 desempeñan un papel clave en la regulación del proceso apoptótico. Las proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” y proteínas tipo-Bax son iniciadores esenciales de la apoptosis, mientras que las proteínas similares a Bcl-2 actúan como factores de supervivencia que contribuyen a frenar el inicio del proceso apoptótico celular (Adams and Cory, 2001). Mcl-1 es una proteína anti-apoptótica que ha demostrado ser crítica para la supervivencia del mieloma (Derenne et al.,2002;

Zhang et al., 2002). Su sobre-expresión es suficiente para que células de mieloma dependientes de IL-6 puedan proliferar en ausencia de esta citoquina (Gomez-Bougie et al., 2004).

A diferencia de otras proteínas de supervivencia, Mcl-1 es una proteína de vida media corta y alto recambio celular debido a la presencia de secuencias PEST, secuencias específicas de ubiquitinación, que determinan su degradación vía proteasoma (Le Gouill et al., 2004). Tras el tratamiento de las células tumorales con drogas quimioterapéuticas se estimula la degradación de Mcl-1 en el proteasoma, y la ruptura de los heterodímeros formados entre ésta y las proteínas pro-apoptóticas (Willis et al., 2005; Gomez-Bougie et al., 2004), favoreciendo la desestabilización mitocondrial y la inducción de apoptosis. Se ha descrito que en células sanas, Bak se encuentra asociado con Mcl-1 y Bcl-x<sub>L</sub> (Willis et al., 2005; Minet et al., 2006) y también la formación de complejos entre Mcl-1 y la proteína “sólo BH<sub>3</sub>” Bim (Gomez-Bougie et al., 2004). Las señales citotóxicas, que promoverían la degradación de Mcl-1 vía proteasoma, permitirían la liberación de las proteínas pro-apoptóticas de estos complejos, favoreciendo la formación de poros en la membrana mitocondrial, la salida de citocromo c y la ejecución del proceso apoptótico.

De acuerdo con todo lo que se ha expuesto, mcl-1 es un gen clave en la supervivencia de células de mieloma capaz de preservar su viabilidad durante más tiempo tras el tratamiento con fármacos anti-tumorales que inducen apoptosis vía mitocondrial. Sin embargo, la sobre-expresión de de la proteína Mcl-1 no es suficiente *per se* para evitar la muerte celular. La dilatación de la fase de inducción, que produce su sobreexpresión podría ser debida a que los mayores niveles de proteína entorpecen el cambio conformacional de Bax/Bak y retrasan la desestabilización mitocondrial. Cuando los niveles de proteína comienzan a disminuir, o cuando pese a mantenerse los niveles (Velcade) se contrarrestan con el aumento de niveles de proteínas pro-apoptóticas, como Noxa (Perez-Galán et al., 2006), los complejos de Mcl-1 con Bak y/o Bim se hacen más inestables y se rompen, comprometiendo la viabilidad celular. En el caso de fármacos que inducen apoptosis vía extrínseca, la sobreexpresión de Mcl-1 no es capaz de evitar ni retrasar la muerte celular. Esto implicaría que en células tumorales que sobre-expresen Mcl-1, la inducción de apoptosis debería abordarse más bien desde el empleo de ligandos mortales, que desde el uso de drogas citotóxicas que induzcan apoptosis a través de la vía mitocondrial.

## **4.5.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS MIELOMATOSAS EXTRAÍDAS DE PACIENTES DE MIELOMA.**

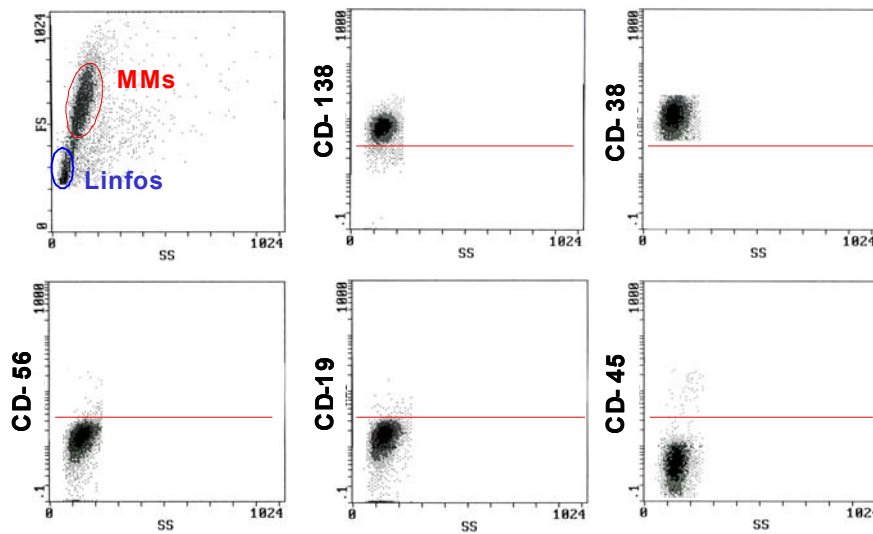
### **4.5.1.- Introducción.**

Con el objetivo de completar los estudios realizados sobre líneas de mieloma múltiple con los principales agentes inductores de apoptosis que se han expuesto hasta ahora, se llevaron a cabo estudios de sensibilidad *in vitro* en células mielomatosas (MMs) y en linfocitos normales, extraídos ambos a partir de aspirados de médula ósea de pacientes de mieloma (apartado 3.2.2.1.). La muestra de partida, que consistió en 1-2 ml de médula ósea extraída por punción en la cresta ilíaca, se sometió a centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (apartado 3.2.2.1.) obteniéndose una población celular heterogénea (linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células plasmáticas y mielomatosas, células del estroma medular...), a partir de la cual se caracterizaron las células mielomatosas (MMs) y se determinó su sensibilidad a los diferentes tratamientos mediante citometría de flujo, usando un protocolo de tres colores específicamente diseñado para este fin.

### **4.5.2.- Inmunofenotipado de las células mielomatosas.**

Dada la gran heterogeneidad en el patrón de marcadores de membrana de las células mielomatosas (MMs) (apartado 2.3.3.2.), se realizó, previamente a los ensayos de citotoxicidad, un inmunofenotipado de cada paciente (figura 4.61.; apartado 3.2.2.2.). Este permitió conocer el patrón característico de MMs de cada uno (figuras 4.61. y 4.62.), haciendo posible de este modo evaluar selectivamente el efecto de las drogas sobre dichas células e incluso hacer pronósticos sobre el grado de avance de la enfermedad y la respuesta a los fármacos. Los marcadores analizados fueron CD138/Sindecin-1, CD38, CD56/N-CAM, CD19 y CD45 (apartado 2.3.3.2.). En general las células mielomatosas se caracterizan por un inmunofenotipo CD138 (+), CD38(+), CD56(+), CD19(-), CD45(+/-) y los linfocitos normales por un inmunofenotipo CD138(-), CD38(-), CD56(-), CD19(-) y CD45(+).





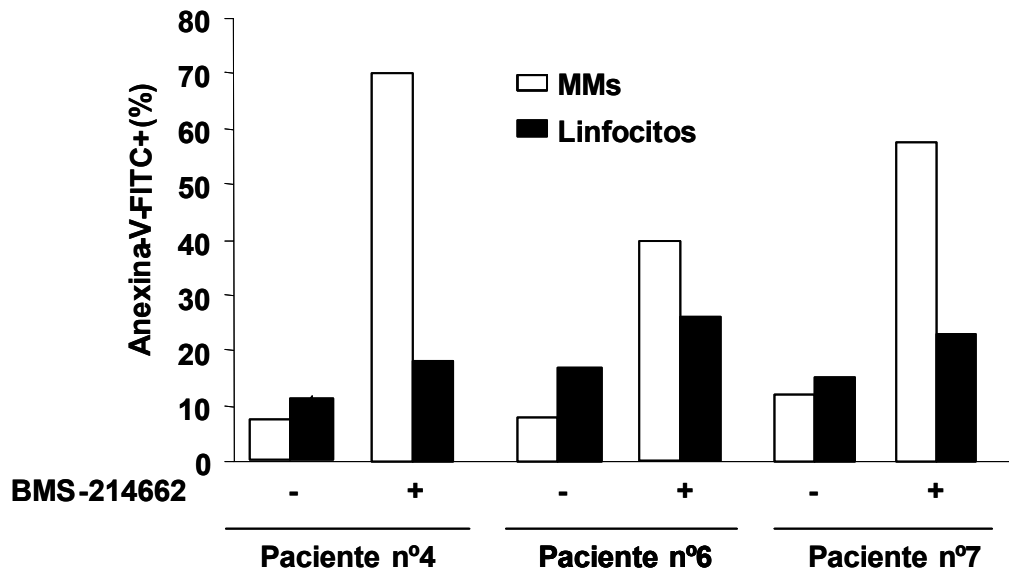
**Figura 4.61.- Inmunofenotipado (Paciente n°2).** El FS/SS (*forward scatter versus side scatter*) permite realizar una primera distinción entre células mielomatosas y linfocitos normales. Haciendo un *gating* sobre las células mielomatosas puede analizarse la expresión de cada uno de los marcadores de membrana. En este caso el paciente es CD138(+),CD38(+),CD56(-), CD19(-),CD45(-). La ausencia de expresión de CD56 y CD45 en membrana es señal de un mayor grado de avance de la enfermedad y de un peor pronóstico al tratamiento, algo que corroboraron los ensayos *in vitro*.

n° paciente	CD138	CD38	CD56	CD19	CD45
1	+	+	+	-	+
2	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-
4	+	+	-	-	+/-
5	+	+	-	+	+/-
6	+	+	+	-	+/-
7	+	+	+	-	-
8	+	+	+	-	-

**Figura 4.62.- Inmunofenotipos de los pacientes analizados.**

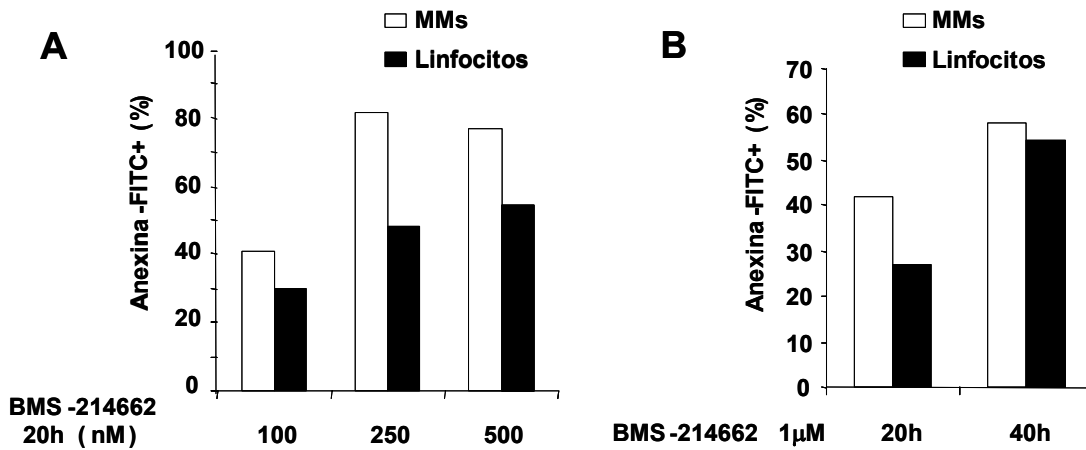
#### 4.5.3.- Análisis de sensibilidad a BMS-214662. Efecto umbral.

Se analizó la sensibilidad *in vitro* a BMS-214662 en MMs y en linfocitos normales. Aunque las MMs de todos los pacientes analizados fueron sensibles a BMS-214662, la sensibilidad varió de unos pacientes a otros (figura 4.63.) y se observaron también importantes diferencias de sensibilidad en linfocitos normales. En algunos pacientes BMS-214662 fue selectivo sobre MMs, mientras que en otros indujo una elevada toxicidad en linfocitos (figura 4.63.). La selectividad de BMS-214662 podría estar relacionada con su mayor o menor afinidad por las MMs en función de la presencia o ausencia en dichas células de sus dianas terapéuticas.



**Figura 4.63.- Sensibilidad a BMS-214662 de MMs y de linfocitos normales.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml, y se incubó en medio completo con 1000 U/ml de IL-6 y BMS-214662 (1  $\mu$ M) durante 20h. Transcurrido este tiempo, se marcaron con anexina-V-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5, y se analizó la translocación de PS en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD38-/CD-45+).

En algunos pacientes se observó un efecto umbral de BMS-214662, por el cual dosis más elevadas o tiempos de incubación más prolongados del inhibidor, sólo consiguieron aumentar la toxicidad sobre linfocitos, sin detectarse un incremento significativo de apoptosis en MMs (figura 4.64.).

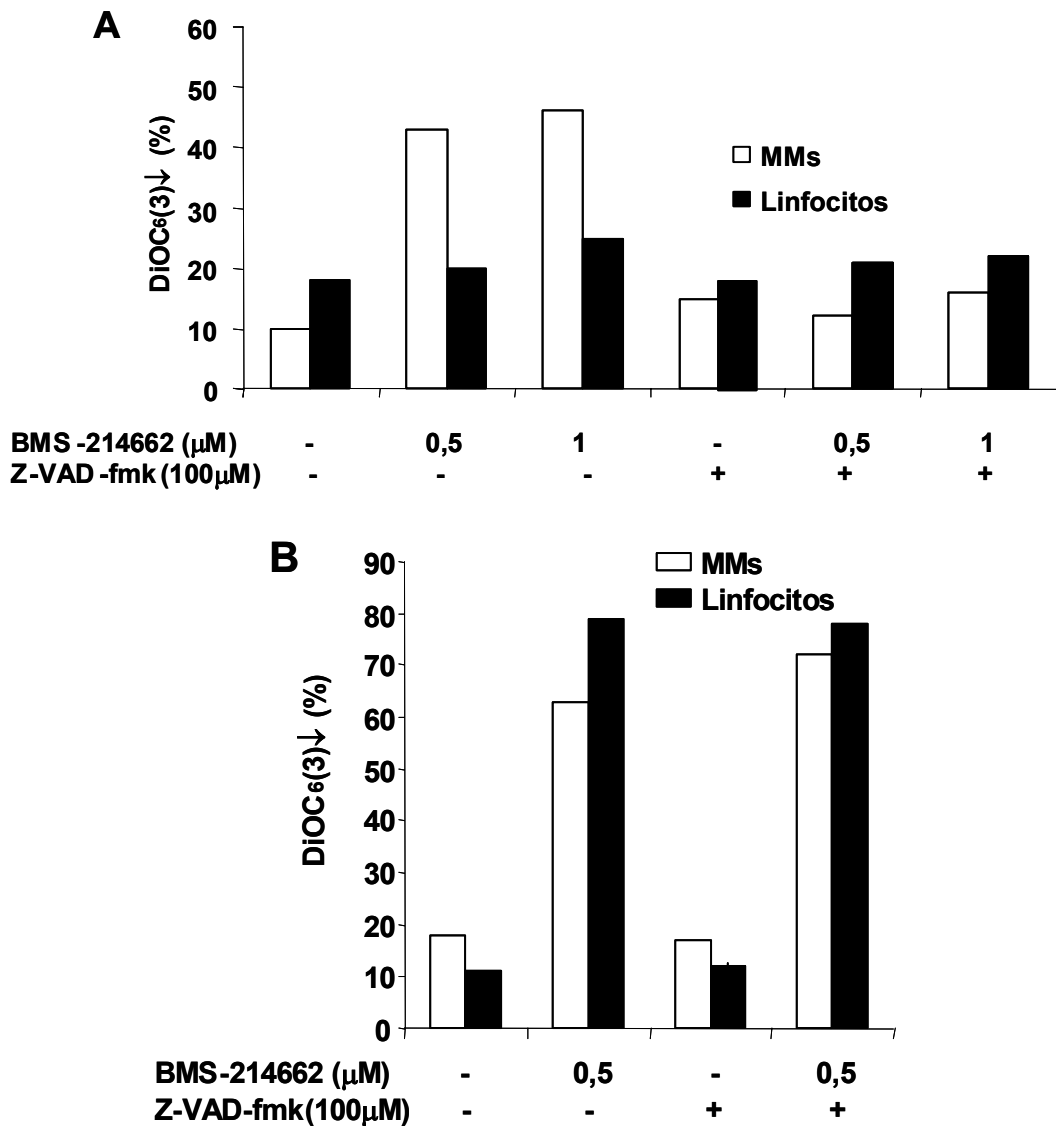


**Figura 4.64.- Efecto umbral de BMS-214662. (A) Paciente n°8.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml, y se incubó en medio completo con 1000 U/ml de IL-6 y diferentes dosis de BMS-214662 (100, 250 y 500 nM) durante 20h. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se marcaron con anexina-V-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5, y se analizó la translocación de PS en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD-38-/CD-45+). Como puede observarse 250 nM es la dosis más adecuada. **(B) Paciente n°6.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml, y se incubó en medio completo con 1000 U/ml de IL-6 y BMS-214662 (1µM) durante 20 y 40 h. Transcurridos los tiempos de incubación, las células se marcaron con anexina-V-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5, y se analizó la translocación de PS en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD-38-/CD-45+). La administración continuada de BMS-214662 durante más tiempo incrementa la toxicidad sobre linfocitos en mayor proporción que sobre MMs.

#### 4.5.4.- Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por BMS-214662. Efecto Z-VAD-fmk.

Para analizar la implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por BMS-214662 en MMs y linfocitos, se pre-incubaron las células durante 1 h con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-fmk y después se añadió BMS-214662. Tras el tiempo de incubación (20 h), la apoptosis se evaluó por determinación del potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) mediante la sonda fluorescente DiOC<sub>6</sub>(3).

Z-VAD-fmk previno la pérdida del potencial mitocondrial en MMs de unos pacientes (figura 4.65.A), pero no de otros (figura 4.65.B.), de modo semejante a como ocurre con las líneas celulares (previene la pérdida del potencial en U266 y RPMI 8226/hp, pero no en NCI-H929 (apartado 4.1.5.2.)). No se observó ningún efecto protector de Z-VAD-fmk sobre la toxicidad de BMS-214662 en linfocitos (figura 4.65.)



**Figura 4.65.- Efecto del inhibidor Z-VAD-fmk sobre la toxicidad de BMS-214662 en MMs y en linfocitos normales. (A) Paciente n°3.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml y 1000 U/ml de IL-6 en medio completo. Las células se pre-incubaron con Z-VAD-fmk (100 μM) durante 1 h, se añadieron las dosis indicadas de BMS-214662 y se incubaron durante 20h más. Transcurrido este tiempo, las células se marcaron con anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5 y posteriormente se incubaron con la sonda fluorescente DiOC<sub>6</sub>(3). La apoptosis se evaluó por determinación del potencial mitocondrial en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD-38-/CD-45+). **(B) Paciente n°2.** Se procedió análogamente a (A).

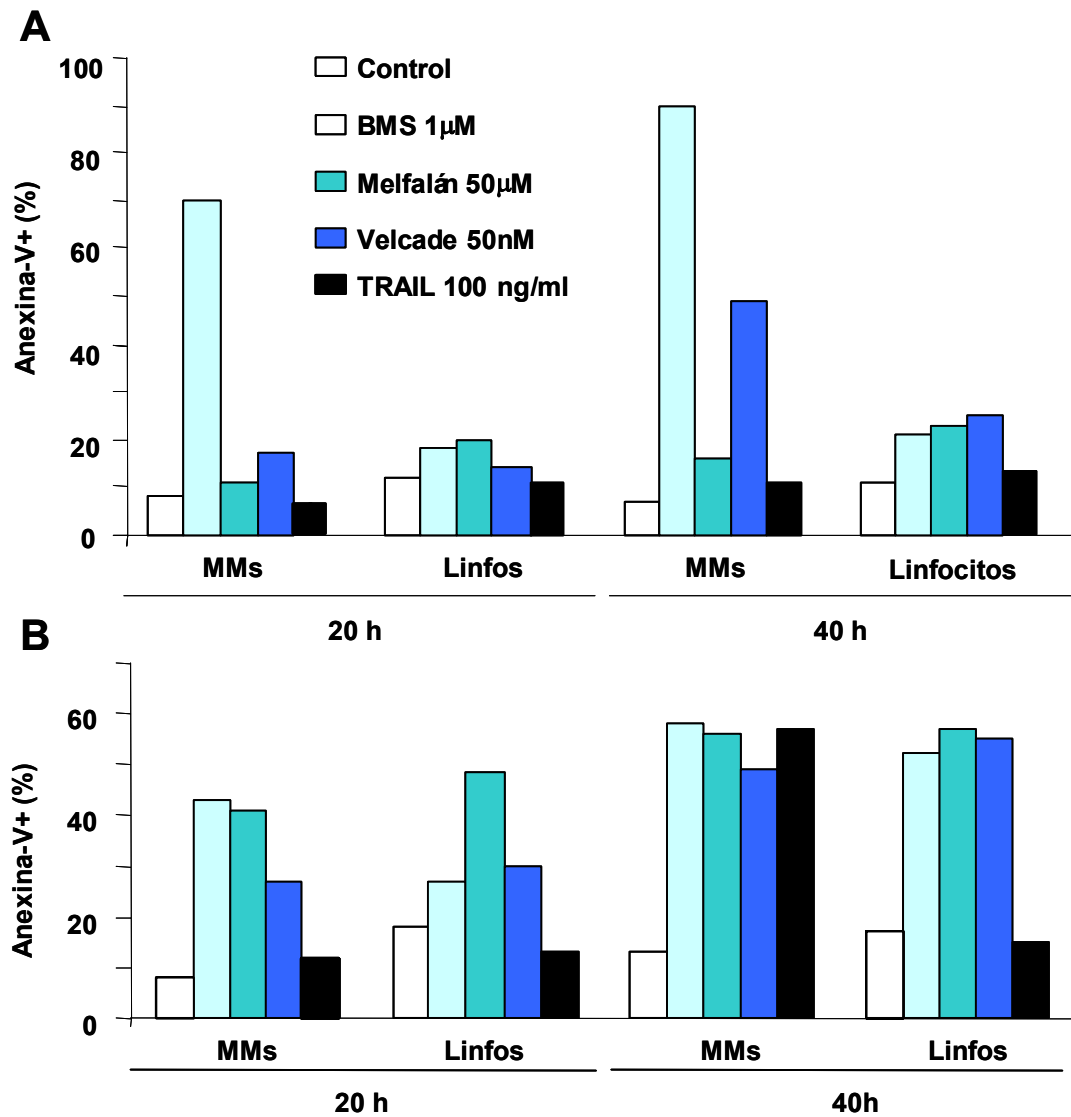
#### **4.5.5.- Estudio comparativo del efecto de BMS-214662 con el de otros agentes terapéuticos.**

En algunos pacientes se realizaron estudios comparativos de sensibilidad a diferentes agentes (BMS-214662, melfalán, Velcade® y Apo2L/TRAIL.0) sobre MMs y linfocitos normales a tiempos de 20 y 40 h. Las respuestas difirieron mucho entre unos y otros pacientes, lo cual no es sino un mero reflejo de la heterogeneidad del mieloma y uno de los principales inconvenientes que existen para el diseño de una terapia racional (Gomez-Bougie et al., 2004). Se muestran los resultados obtenidos de dos pacientes, n°2 (figura 4.66.A), muestra en recidiva, CD56(-) y CD45(-) indicadores de una forma más avanzada de la enfermedad y probablemente peor pronóstico. Este paciente sólo ha respondido a BMS-214662 pero con una extraordinaria selectividad por las células MMs, y se ha mostrado resistente a la quimioterapia clásica de melfalán. Por otro lado, el paciente n°6 (figura 4.66.B), muestra correspondiente a un nuevo diagnóstico, CD56(+) y CD45(+). Este paciente ha respondido a todos los agentes empleados, siendo Apo2L/TRAIL.0 el más selectivo y a la vez efectivo sobre las células MMs a tiempos prolongados de tratamiento (48h).

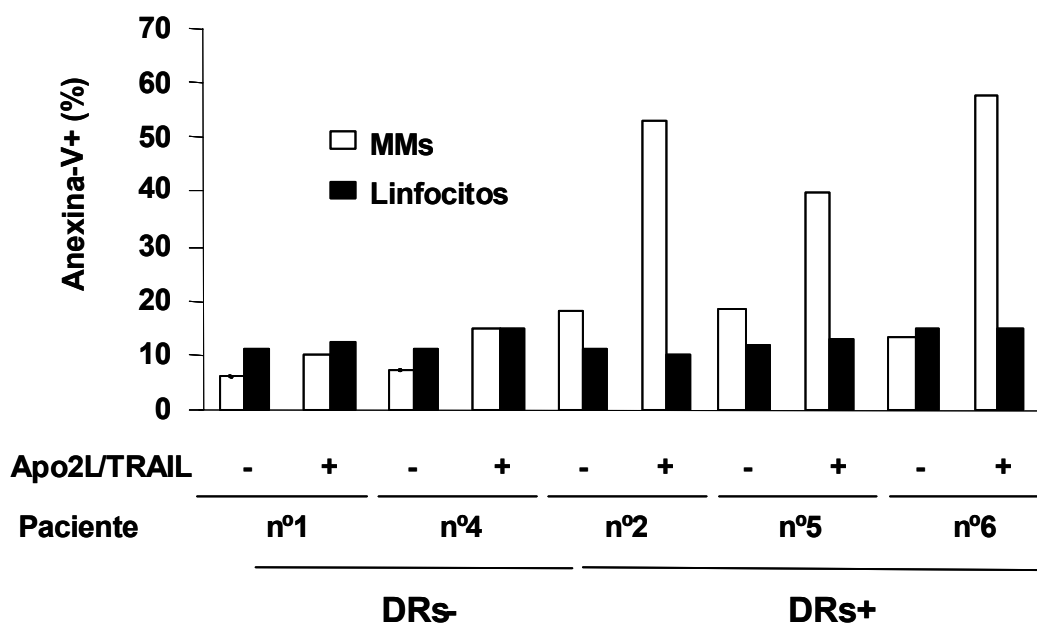
#### **4.5.6.- Análisis de sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0. Correlación con la expresión de DRs en membrana.**

Se analizó la sensibilidad *in vitro* al ligando mortal recombinante Apo2L/TRAIL (Apo2L/TRAIL.0) en MMs y en linfocitos normales extraídos a partir de pacientes de mieloma. Paralelamente, se analizó la expresión en membrana de receptores funcionales DR4 y DR5 en las células MMs de dichos pacientes, y se correlacionó con la sensibilidad al ligando.

En todos los casos en que las células MMs resultaron sensibles al ligando, este fue muy selectivo y no se observó toxicidad sobre los linfocitos normales. La sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 correlacionó siempre con la expresión de al menos uno de los dos receptores funcionales (figura 4.67.). Sin embargo, una mayor expresión de receptores no siempre estuvo asociada con una mayor sensibilidad. El pequeño número de muestras analizadas ha impedido extraer conclusiones a cerca de la contribución relativa de DR4 y DR5 a la transducción de la señal citotóxica.



**Figura 4.66.- Análisis comparativo de la citotoxicidad de diferentes drogas. (A) Paciente n°2. (B) Paciente n°6.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml y 1000 U/ml de IL-6 en medio completo y se trató con BMS-214662 (1μM), melfalán (50 μM), Velcade (50 nM) o Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml) durante los tiempos indicados. Tras esto, las células se marcaron con anexina-V-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5 y se analizó la translocación de PS en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD-38-/CD-45+).



**Figura 4.67.- Sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0 y su correlación con la expresión de DRs en la membrana de células MMs.** La población celular heterogénea obtenida a partir del Ficoll-Paque se sembró a densidades de  $5 \times 10^6$  cél/ml y 1000 U/ml de IL-6 en medio completo y se incubó con Apo2L/TRAIL.0 (100 ng/ml) durante 40 h. Transcurrido este tiempo, las células se marcaron con anexina-V-FITC, anti-CD45-PE y anti-CD38-Pc5 y se analizó la translocación dePS en MMs (CD38+/CD-45+ y/o -) y linfocitos (CD-38-/CD-45+). Por otro lado,  $1 \times 10^6$  células se incubaron con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-DR4-PE (IgG1, clon DJR1), anti-DR5-PE (IgG1, clon DJR2-4) o IgG1-PE como control y se analizó la expresión de DRs por citometría de flujo.

#### 4.5.7.-Discusión.

Dado que el número de pacientes analizados ha sido muy pequeño, no se pueden extraer conclusiones fidedignas de esta parte del estudio. El pequeño tamaño ha sido debido a las múltiples dificultades a que hemos tenido que enfrentarnos para llevarlo a cabo: escasez de muestras y pequeño volumen de las mismas, presencia de contaminación con restos de tejido y grasa en alguna de las muestras, dificultad para poner a punto un protocolo de citometría de tres colores y para caracterizar inequívocamente las células mielomatosas (que llevó a desechar los datos de los primeros pacientes analizados), heterogeneidad entre pacientes, baja supervivencia de MMs *in vitro*, lo que hace aconsejable realizar los experimentos durante las primeras 48 h en cultivo, alta tasa de mortalidad celular en la muestra tras la criopreservación, etc.

Sin embargo, y pese al pequeño tamaño, este estudio pone de manifiesto una de las características más relevantes del mieloma: su heterogeneidad. La heterogeneidad existente entre unos y otros pacientes se observa en sus características clínicas, inmunofenotipado, evolución y respuesta a los tratamientos, pudiendo variar la supervivencia tras el diagnóstico desde tan sólo unos pocos días hasta más de 15 años. La causa de la heterogeneidad del mieloma es principalmente de tipo genético y puede ser debida a las diferentes anomalías cromosómicas presentes en las células mielomatosas y/o a las diferentes inmunoglobulinas (Igs) o cadenas ligeras que son secretadas por ellas (Gomez-Bougie et al., 2004). Considerando esta gran heterogeneidad, cada paciente de mieloma debería ser tratado de modo individualizado, siendo de gran ayuda el inmunofenotipado y los ensayos de sensibilidad *in vitro* a diferentes agentes terapéuticos en el momento del diagnóstico para el diseño de una terapia más racional e individualizada.

Con todas las cautelas mencionadas, creemos, no obstante, que los resultados obtenidos con BMS-214662 y Apo2L/TRAIL son prometedores. El inhibidor de farnesil-transferasas mostró una elevada citotoxicidad en las células de MM, incluido un paciente resistente a melfalán *in vitro*. Por otro lado, la eficacia de Apo2L/TRAIL parece depender inicialmente de la expresión de al menos uno de sus dos receptores mortales (DR4 ó DR5). En estos casos, Apo2L/TRAIL mostró una excelente selectividad, ya que fue citotóxico para las células de MM, pero no para las células normales de la médula ósea.



## **5.- DISCUSIÓN GENERAL.**



La apoptosis se ha definido como un “evento crítico” en el desarrollo del cáncer. La oncogénesis requiere un mayor grado de proliferación celular, pero también, en la mayoría de los casos, una elevada resistencia a la apoptosis. De este modo, el mal funcionamiento de los agentes participantes en la cascada de señalización apoptótica es una causa potencial de tumorigénesis (Johnstone et al., 2002), y el empleo de drogas citotóxicas que actúan re-induciendo apoptosis, es actualmente, la estrategia de la quimioterapia moderna frente a gran parte de las patologías tumorales.

A lo largo de un tratamiento quimioterapéutico es frecuente que aparezcan células tumorales resistentes, o que ya lo sean incluso antes de iniciarse este. Esto hace necesario la caracterización de los mecanismos de resistencia, el diseño de terapias combinadas y la búsqueda de nuevas dianas moleculares, de cara a diseñar nuevas terapias contra las cuales sea más difícil desarrollar resistencia. Además, un conocimiento exhaustivo de las moléculas implicadas en la apoptosis inducida por cada agente citotóxico en los distintos tipos celulares, ayudaría a diseñar terapias más racionales e incluso a personalizarlas para cada paciente. Terapias que se hacen especialmente necesarias en aquellas patologías tumorales en que la tasa de respuesta a la quimioterapia es muy baja y existe gran heterogeneidad de respuesta, como es el caso del mieloma múltiple (MM) (Gomez-Bougie et al., 2004).

En los mamíferos existen dos vías principales de inducción de apoptosis:

1. La ruta apoptótica mitocondrial, también denominada *vía intrínseca*.
2. La apoptosis inducida por receptores mortales, también denominada *vía extrínseca*.

La mayor parte de los agentes anti-tumorales inducen apoptosis a través de la ruta mitocondrial. Tal es el caso del inhibidor de farnesil-transferasas BMS-214662 y del interferón-alfa. Sin embargo, algunas células tumorales pueden acumular mutaciones y desarrollar resistencia a esta vía apoptótica (Johnstone et al., 2000). El empleo de ligandos mortales, como Apo2L/TRAIL, selectivo de células tumorales y que no induce apoptosis en ninguna de las células normales sobre las que se ha ensayado (Kelley and Ahnkenazi, 2004), se plantearía como una alternativa interesante.

Los eventos moleculares que tienen lugar en la *vía intrínseca* de apoptosis son conocidos en parte. La participación de las proteínas de la superfamilia Bcl-2 es esencial en la denominada fase de inducción (Cory and Adams, 2002). Las proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” funcionarían como sensores del daño celular y su activación constituiría la primera etapa de la apoptosis mitocondrial. Dependiendo de las características peculiares de sus respectivos dominios BH<sub>3</sub>, interaccionarían e inactivarían a las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1, Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> y/o también se unirían a Bax y Bak induciendo su oligomerización y la formación de poros en la membrana externa mitocondrial, causando la subsiguiente caída del potencial mitocondrial y la liberación de citocromo c y de otras proteínas apoptogénicas. En la fase de ejecución, el citocromo c liberado al citosol, induce el ensamblaje del apoptosoma, la activación de la caspasa-9 y la subsiguiente activación de una cascada de caspasas responsables del desmantelamiento de las estructuras celulares, de la condensación y fragmentación del ADN y de la exhibición de señales en la membrana plasmática que hacen apetitosa a la célula moribunda para los macrófagos. Así como la fase de ejecución se produce siempre de modo similar en todas las células, e independientemente del agente citotóxico empleado, la fase de inducción, no sólo varía de unas células a otras en función de la expresión relativa de proteínas de la superfamilia Bcl-2, sino que dos agentes citotóxicos diferentes, pueden inducir apoptosis en un mismo tipo celular de forma distinta, implicando a diferentes proteínas. Por ejemplo, en la fase de inducción de apoptosis de BMS-214662 en células de mieloma (apartado 4.1), PUMA parece ser la principal mediadora, al menos en células con un p53 silvestre (NCI-H929) o que carecen de otras proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” (RPMI 8226/hp). Bim y Bik pueden sustituir su acción en células con p53 mutado (U266) o reforzarla en células con p53 silvestre (H929). La mayor o menor contribución de proteínas “sólo BH<sub>3</sub>”, condicionaría la mayor o menor contribución de las caspasas en la fase de inducción. Así, en condiciones de inhibición de la actividad de las caspasas, las células H929, y en menor medida IM-9, siguen muriendo, mientras que la muerte celular está totalmente bloqueada en las células U266 y RPMI 8226/hp. Esto se explicaría porque la baja eficiencia en la perturbación mitocondrial y en la salida de citocromo c de las proteínas “sólo BH<sub>3</sub>” en estas células, haría necesario un ciclo de amplificación mitocondrial mediado por caspasas, que induciría una salida masiva de citocromo c y una mayor activación de la maquinaria apoptótica. En todas las líneas el mantenimiento de unos niveles altos de Mcl-1 parece ser importante para prolongar la supervivencia celular, y su disminución marca el inicio del proceso apoptótico. Por otro lado, en la fase de inducción de IFN $\alpha$ , Bim es la proteína clave, pasando PUMA a

desempeñar un papel secundario (apartado 4.3). Además, sólo se observa el cambio conformacional de Bak, pero no el de Bax y las caspasas participan modestamente en la apoptosis. En este caso, no parece necesaria una disminución de los niveles de la proteína Mcl-1 para comprometer la supervivencia celular, aunque al igual que con BMS-214662, niveles altos de Mcl-1 mantienen la viabilidad celular durante más tiempo (apartado 4.4.).

La vía extrínseca de apoptosis puede jugar un papel importante, sobre todo en aquellos casos en que las células tumorales han incorporado mutaciones que les hacen resistentes a la vía apoptótica mitocondrial (Johnstone et al., 2000). En esta vía, la apoptosis se induce tras la unión de una proteína extracelular (mensajero mortal) a su receptor (receptor mortal). Los receptores mortales poseen en su región intracelular el denominado dominio mortal (DD), necesario para la transmisión de la señal de muerte. Tras la unión del ligando, el receptor interacciona a través de su dominio DD con la proteína adaptadora FADD, la cual, a través de sus dominio DED, se une a la caspasa-8. La unión de varias moléculas de caspasa-8 a este complejo de proteínas asociado al receptor (DISC) permite su activación. Una vez activa, la caspasa-8 activa a la caspasa-3, que ejecuta la apoptosis cortando diversas proteínas celulares. La fase de ejecución de esta vía está bien caracterizada, pero nuevamente existe un cierto grado de desconocimiento de la fase de inducción, y en concreto de los condicionantes de sensibilidad al ligando. El empleo de ligandos mortales en forma recombinante, como Apo2L/TRAIL.0, en la terapia de algunas patologías tumorales (apartado 4.2), exigiría en primer lugar que las células tumorales expresaran al menos uno de sus receptores mortales y niveles significativos de caspasa-8, pero además, conocer que parámetros condicionan la sensibilidad al ligando, que receptor, DR4 ó DR5, está mayormente implicado en la transducción de la señal, necesario si la forma recombinante del ligando se sustituye por anticuerpos dirigidos contra los receptores mortales (DR4/TRAILR1 y DR5/TRAILR2) (MacFarlane and Williams, 2004), y si los receptores señuelo y/o los inhibidores tipo FLIP o tipo XIAP contribuyen a la resistencia a TRAIL. El empleo de estos ligandos podría ser una buena terapia en pacientes que sobreexpresan Mcl-1 y son resistentes a las drogas quimioterapéuticas convencionales.

En ocasiones un fármaco por si sólo no es capaz de inducir apoptosis en células tumorales. Si su mecanismo apoptótico está bien caracterizado y se conocen sus dianas terapéuticas, se pueden diseñar terapias combinadas con otras drogas, de

modo que el segundo agente, incrementando los niveles de la diana molecular, la accesibilidad del fármaco a dicha diana o restaurando los defectos en la transducción de la señal apoptótica, vuelva más susceptibles las células al fármaco inicial. Así, el ácido valproico (VPA), un inhibidor de histona deacetilasas (HDACi), puede revertir la resistencia a Apo2L/TRAIL.0 en células que expresan al menos uno de sus dos receptores funcionales y tienen niveles significativos de caspasa-8, pero que han desarrollado resistencia intrínseca al ligando (apartado 4.2). En el caso de las células U266, la explicación a esta sinergia parece estar en la translocación de receptores DR4 a las balsas lipídicas de membrana, inducida por VPA, facilitando su agregación, inducida por el ligando. Además, el VPA también induce un ligero aumento de los niveles de FADD, proteína implicada en la señalización de la vía extrínseca y una pequeña disminución de los niveles de Bcl-x<sub>L</sub> y XIAP. Otro ejemplo de sinergia es la combinación de rapamicina e interferón-alfa en algunas células de mieloma (H929) (apartado 4.3). La rapamicina, aunque no resulta tóxica por sí sola, aumenta en algunas células los niveles de Bim, proteína clave en la fase de inducción de apoptosis de IFN $\alpha$ , incrementando de este modo la sensibilidad de las células a la citoquina.

La elucidación precisa del mecanismo apoptótico, y la identificación de las moléculas implicadas en la fase de inducción de diferentes agentes terapéuticos, en cada uno de los diferentes tipos de neoplasias, permitirá: a) refinar los criterios de pronóstico, b) sentar las bases para el diseño racional de tratamientos quimioterapéuticos individualizados, basados en datos moleculares precisos de cada tumor y de cada paciente en particular. Para avanzar realmente en el tratamiento del cáncer se hace necesaria la investigación traslacional, la colaboración de investigadores básicos, que desentrañen los mecanismos apoptóticos, y de investigadores clínicos, que pongan en manos de los primeros muestras biológicas sobre las que realizar sus estudios. Un análisis individualizado de las células tumorales de cada paciente en el momento del diagnóstico, o tras sufrir una recaída, evaluando su sensibilidad a diferentes fármacos y su respuesta *in vitro* (apartado 4.5), podría ayudar a elegir de modo más racional la terapia adecuada para ese individuo en concreto, aquella que le proporcione los mejores resultados anti-tumorales, con la menor toxicidad sobre sus células normales.

## **6.- CONCLUSIONES.**





Los resultados expuestos en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones principales:

1.- BMS-214662 indujo apoptosis en todas las líneas de mieloma analizadas a dosis inhibitorias de la actividad farnesil-transferasa. El tratamiento con BMS-214662 indujo un aumento de los niveles de expresión de PUMA a tiempos cortos (6 h) en algunas líneas de MM, mientras que a tiempos largos (24 h) se produjo una bajada de los niveles de expresión de PUMA y Mcl-1 en todas las líneas. Asimismo, BMS-214662 indujo el cambio conformacional pro-apoptótico de Bax (todas las líneas) y Bak (NCI-H929 y U266).

2.- BMS-214662 indujo la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la exposición de PS, la activación de las caspasas -2, -3, -8 y -9, la salida del citocromo c al citoplasma, la translocación de AIF al núcleo y la condensación y fragmentación de la cromatina en todas las líneas analizadas. El co-tratamiento con el inhibidor general de caspasas, Z-VAD-fmk, bloqueó las características morfológicas de la apoptosis, la salida de citocromo c, la translocación de AIF y la fragmentación del ADN en las células U266 y RPMI 8226/hp, pero no en NCI-H929. Este efecto protector se mantuvo unas 30 h en las células U266 y 48 h en RPMI 8226/hp, y se consiguió reproducir con la triple mezcla de inhibidores selectivos de caspasas, Z-DEVD-fmk, Z-VEID-fmk y Z-LEHD-fmk.

3.-La inhibición de las kinasas ERK, p38MAPK, JNK o PI3K no comprometió la supervivencia celular ni tuvo efecto significativo sobre la toxicidad de BMS-214662.

4.-La presencia de mutación en Ras no fue necesaria para que BMS-214662 ejerciera su efecto citotóxico. La inhibición de la farnesilación de RhoB podría contribuir a los efectos tóxicos de BMS-214662 en las células U266 y la inhibición de la farnesilación de la enzima RabGGT podría ser determinante en la sensibilidad a BMS-214662 en RPMI 8226/hp y U266, pero no en H929.

5.- Apo2L/TRAIL.0 indujo apoptosis en aquellas células de mieloma que expresaban al menos uno de sus receptores funcionales (DR4 ó DR5) y tenían niveles significativos de caspasa-8. Las células U266 fueron resistentes a Apo2L/TRAIL.0 pese a cumplir los requisitos anteriores. En estas células se pudo revertir la resistencia a Apo2L/TRAIL.0 mediante un co-tratamiento con ácido valproico (VPA), que indujo la translocación de receptores DR4 a las balsas lipídicas de la membrana plasmática y su agregación.

6.- La expresión de receptores señuelo y los niveles de Flip, XIAP o FADD, no condicionaron la sensibilidad a Apo2L/TRAIL.0

7.- IFN $\alpha$  indujo apoptosis sólo en algunas líneas de mieloma (H929 y U266) que expresaban su receptor en la membrana plasmática, concordante con la heterogeneidad de respuesta a esta citoquina observada en los pacientes de mieloma.

8.- El tratamiento con IFN $\alpha$ , aumentó significativamente los niveles de las diferentes isoformas de Bim en ambas líneas. De acuerdo con esto, el silenciamiento de la expresión de Bim en H929 redujo la toxicidad inducida por IFN $\alpha$ .

9.- El tratamiento con IFN $\alpha$  indujo la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  y la translocación de PS, una débil activación de caspasas -3 y -9, la salida del citocromo c al citosol, la translocación de AIF al núcleo y la condensación y fragmentación de la cromatina. El co-tratamiento con inhibidores de caspasas, redujo sólo en algunos casos y sólo de modo parcial la toxicidad de IFN $\alpha$ .

10.- La inhibición de la kinasa Jak1 anuló completamente el efecto tóxico del IFN $\alpha$ . La inhibición de la PI3K no protegió de la apoptosis inducida por IFN $\alpha$  o lo hizo sólo de modo parcial, dependiendo del inhibidor empleado. La inhibición de mTOR protegió parcialmente en U266 pero sin embargo, potenció la toxicidad de IFN $\alpha$  en las células H929.

11.- El tratamiento con IFN $\alpha$  de monocitos de sangre periférica indujo síntesis y secreción de Apo2L/TRAIL, que fue suficiente para inducir apoptosis en células de mieloma sensibles (RPMI 8226 IC<sub>50</sub> 2 ng/ml).

12.- La sobreexpresión de Mcl-1 en las células U266 se correlacionó con una cinética más lenta en la inducción de apoptosis vía mitocondrial por BMS-214662, melfalán, Velcade o IFN $\alpha$ , aunque no fue capaz de proteger indefinidamente de la muerte celular. Esta sobreexpresión no mostró, sin embargo, efecto protector en la apoptosis inducida a través de la vía extrínseca por el tratamiento combinado VPA+ TRAIL.

13.- BMS-214662 indujo apoptosis en las células mielomatosas de todos los pacientes analizados, con importantes diferencias de sensibilidad entre células de unos y otros individuos, y resultó, en algunos casos, tóxico sobre las células normales de la médula ósea. Se detectó un efecto umbral, tanto para dosis como para tiempos de incubación.

14.- Apo2L/TRAIL.0 indujo apoptosis sólo en aquellas células mielomatosas de pacientes que expresaron al menos uno de sus dos receptores funcionales (DR4 o DR5). En ningún caso resultó tóxico sobre linfocitos normales.



## **7.- BIBLIOGRAFÍA.**



**Abad,J.L., Serrano,F., San Román,A.L., Delgado,R., Bernad,A. and González,M.A.** (2002). "Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells". *J Gene Med* 4: 27-37.

**Adams,J.M., Harris,A.W., Strasser,A., Ogilvy,S. and Cory,S.** (1999). "Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector". *Oncogene* 18: 5268-5277.

**Adams,J.M. and Cory,S.** (2001). "Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family". *Trends Biochem Sci* 26(1):61-66.

**Adjei,A.A., Davis,J.N., Bruzek,L.M., Erlichman,C. and Kaufman,S.A.** (2001). "Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cis platin in human cancer cell lines". *Clin Cancer Res* 7:1438-1445.

**Adrain,C. and Martin,S.J.** (2006). "Double Knockout Blow for caspases". *Cell Biol* 311:785-6.

**Ahmed,S. and Rai, K.R.** (2003). "Interferon in the treatment of hairy cell leukaemia". *Best Pract Res Clin Haematol* 16: 69-81.

**Alley,M.C., Scudiero,D.A., Monks,A., Hursey,M.L., Czerwinski,M.J., Fine,D.L., Abbott,B.J., Mayo,J.G., Shoemaker,R.H. and Boyd,M.R.** (1988). "Feasibility of drug screening with panel of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay". *Cancer Res* 48(3):589-601.

**Almasan,A. and Ahskenzi,A.** (2003). "Apo2L/TRAIL:apoptosis signalling, biology, and potential for cancer therapy". *Cytokine & Growth Factor Rev* 14:337-48.

**Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D., Salvensen,G.S., Thornberry,N., Wong,W. and Yuan,J.** (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". *Cell* 87:171.

**Anel,A., Gamen,S., Alava,M.A., Schmitt-Verhulst,A.M., Piñeiro,A. and Naval,J.** (1996). "Role of oxidative damage and IL-1 $\beta$ -converting enzyme-like proteases in Fas-based cytotoxicity exerted by effector T cells". *Int Immunol* 8:1173-1183.

**Anthes,J.C., Zhan,Z., Gilcrest,H., Egan,R.W., Siegel,M.I. and Billah,M.M.** (1995) "Interferon-alpha down-regulates the interleukin-6 receptor in a human multiple myeloma cell line U266". *Biochem J* 309(Pt 1):175-80.

**Ashar,H.R., James,L., Gray,K., Carr,D., Black,S., Armstrong,R., Bishop,W.R. and Kirschmeier,P.** (2000). "Farnesyl-transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules". *J Biol Chem* 275(39): 30451-7

**Ashkenazi,A. and Dixit,V.M.** (1998). "Death receptors: signaling and modulation". *Science* 281:1305-08.

**Attardi,L.D. and Jacks,T.** (1999). "The role of p53 in tumor suppression: lessons from mouse models". *Cell Mol Life Sci* 55: 48-63.

**Baccarani,M., Rosti,G., de Vivo,A., Bonifazi,F., Russo,D., Martinelli,G., Testoni,N., Amabile,M., Fiacchini,M., Montefusco,E., Saglio,G., Tura,S.; Italian Cooperative Study Group on Myeloid Leukemia.** (2002). "A randomized study of interferon-alpha versus interferon-alpha and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukaemia". *Blood* 99(5): 1527-1535.

**Badros,A.Z., Golouveba,O., Rapoport,A.P., Ratterree,B., Gahres,N., Meisenberg,B., Takebe,N., Heyman,M., Zwiebel,J., Streicher,H., Gocke,C.D., Tomic,D., Flaws,J.A., Zhang,B. and Fenton,R.G.** (2005). "Phase II study of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with dexamethasone and thalidomide in relapsed multiple myeloma patients". *J Clin Oncol* 23(18):4089-99.

**Baldwin,A.S.** (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-k $\beta$ ". *J Clin Invest* 107: 241-246.

**Basso,A.D., Kirschmeier,P. and Bishop,W.R.** (2006). "Lipid posttranslational modifications: Farnesyl Transferase Inhibitors". *J Lipid Res* 47(1): 15-31

**Beaupre,D.M., McCafferty-Grad,J., Bahlis,N.J., Boise,L.H. and Lichtenheld,M.G.** (2003). "Farnesyltransferase inhibitors enhance death receptors signals and induce apoptosis in multiple myeloma cells". *Leuk Lymph* 44: 2123-2134.



**Beaupre,D.M., Cepero,E., Obeng,E.A., Boise,L.H. and Linchtenheld,M.G.** (2004). "R115777 induces Ras-independent apoptosis of myeloma cells via multiple intrinsic pathways". *Mol Cancer Ther* 3: 179-186.

**Beere,H.M. and Green,D.R.** (2001). "Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis". *Trends Cell Biol* 11:6-10.

**Bertazzi,P., Pesatori,A., Bernucci,I., Landi,M.T. and Consonni,D.** (1999). "Dioxin exposure and human leukemias and lymphomas. Lessons from the Seveso accident and studies on industrials workers". *Leukemia* 13(1):S72-S74.

**Bin,L., Li,X., Xu,L.G. and Shu,H.B.** (2002). "The short splice form of Casper/c-FLIP is a major cellular inhibitor of TRAIL-induced apoptosis". *FEBS Lett* 510:37-40.

**Blade,J. and Esteve,J.** (2000) "Viewpoint on the impact of interferon in the treatment of multiple myeloma: benefit for a small proportion of patients?" *Med Oncol* 17:77-84.

**Boatright,K.M. and Salvesen,G.S.** (2003). "Mechanisms of caspase activation". *Curr Opin Cell Biol* 15:725-31.

**Bolick,S.C., Landowski,T.H., Boulware,D., Boulware,O., Ohkanda,J., Hamilton,A.D., Sebti,S.M. and Dalton,W.S.** (2003). "The farnesyl transferase inhibitor, FTI-277, inhibits growth and induces apoptosis in drug-resistant myeloma tumor cells". *Leukemia* 17:451-7.

**Bos,J.L.** (1989) "ras oncogenes in human cancer: a review". *Cancer Res* 49:4682-89.

**Brenner,S.** (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*". *Genetics* 77(1):71-94.

**Brian,G.M. and Durie,M.D.** (2006). "Concise Review of the Disease and Treatment Options". *International Myeloma Foundation Publications*.

**Brodie,M.J. and Dichter,M.A.** (1996). "Antiepileptic drugs". *N Engl J Med* 334: 168-75.

**Bröker,L.E., Kruyt,F.A.E. and Ciaccone,G.** (2005). "Cell Death Independent of Caspases: A Review". *Clin Cancer Res* 11(9): 3155-62.

**Brown,J.E., Neville-Webbe,H. and Coleman,R.E.** (2004).“The role of biphosphonates in breast and prostate cancers”. *Endocrine Related Cancer* 11:207-224.

**Bruno,B., Giaccone,L., Rotta,M., Anderson,K. and Boccadoro,M.** (2005). “Novel targeted drugs for the treatment of multiple myeloma: from bench to bedside”. *Leukemia* 19:1729-1738.

**Carvajal-Vergara,X., Tabera,S., Montero,J.C., Esparis-Ogando,A., López-Pérez,R., Mateo,G., Gutierrez,N., Parmo-Cabañas,M., Teixidó,J., San Miguel,J.F. and Pandiella,A.** (2005). “Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma”. *Blood* 105(11):4492-99.

**Chai,J., Du,C., Wu,J., Kyin,S., Wang,X. and Shi,Y.**(2000).”Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO”. *Nature* 406:855-862.

**Chanan-Khan, A.A.** (2004). “Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma”. *Oncology* 18 (13 Suppl 10): 21-4.

**Chang,D.W., Xing,Z., Pan,Y., Algeciras-Schimmich,A., Barnhart,B.C., Yaish-Ohad,S., Peter,M.E., and Yang,X.** (2002). “c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95 mediated apoptosis”. *Embo J* 21:3704-3714.

**Chen,Q., Gong,B., Mahmoud-Ahmed,A.S., Zhou,A., Hsi,E.D., Hussein,M. and Almasan,A.** (2001). “Apo2L/TRAIL and Bcl-2 related proteins regulate type-I interferon induced apoptosis in multiple myeloma”. *Blood* 98:2183-92.

**Chen,Q., Ray,S., Hussein,M.A., Srkalovic,G. and Almasan,A.** (2003). “Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2 family proteins in apoptosis of multiple myeloma”. *Leuk Lymphoma* 44: 1209-14.

**Chen,X., Thakkar,H., Tyan,F., Gim,S., Robinson,H., Lee,C., Pandey,S.K., Nwokorie,C., Onwudiwe,N. and Srivastava,R.K.** (2001). “Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensivity in prostate cancer”. *Oncogene* 20: 6073-83.

**Chen,Z., Sun,J., Pradines,A., Favre,G., Adnane,J. and Sebti,S.M.** (2000). "Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice". *J Biol Chem* 275:17974-78.

**Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M., and Dixit,V.M.** (1995). "FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis". *Cell* 81: 505-12.

**Clarke,S.** (1992). "Protein isoprenylation and methylation at carboxy-terminal cysteine residues". *Annu Rev Biochem* 61, 355-86.

**Clerk,A. and Sugden,P.H.** (1998). "The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs)". *FEBS Lett* 426:93-96.

**Coffey,J.C., Wang,J.H., Smith,M.J., Laing,A., Bouchier-Hayes,D., Cotter,T.G. and Redmond,H.P.** (2005). "Phosphoinositide 3-kinase accelerates postoperative tumor growth by inhibiting apoptosis and enhancing resistance to chemotherapy-induced apoptosis". *J Biol Chem* 280: 20968-77.

**Cory,S. and Adams,J.M.** (2002). "The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch". *Nat Rev Cancer* 2 (9):647-56.

**Cote,J. and Ruiz-Carrillo,A.** (1993)."Primers from mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G". *Science* 261:765-69.

**Crowder,C., Dahle,O., Davis,R.E., Gabrielsen,O.S. and Rudikoff,S.** (2005). "PML mediates IFN-alpha induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction". *Blood* 105:1280-87.

**Daugas,E., Susin,S.A., Zamzami,M., Ferri,K.F., Irinopoulou,T., Larochette,N., Prévost,M.C., Leber,B., Andrews,D., Penninger,J. and Kroemer,G.** (2000). "Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis". *FASEB J* 14:729-39.

**Davies,S.P., Reddy,H., Caivano,M. and Cohen,P.** (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors". *Biochem J* 351:95-105.

**Delmas,D., Rebe,C., Micheau,O., Athias,A., Gambert,P., Grazide,S., Laurent,G., Latruffe,N. and Solary,E.** (2004). "Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells". *Oncogene* 23:8979-86.

**Derenne,S., Monia,B., Dean,N.M., Taylor,D., Rapp,M.J., Harousseau,J.L., Bataille,R. and Amiot,M.** (2002). "Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells". *Blood* 100:194-199.

**Deveraux,Q.L. and Reed,J.C.** (1999). "IAP family proteins-suppressors of apoptosis". *Genes Dev* 13,239-52.

**Diaz-Rodriguez,E., Montero,J.C., Esparis-Ogando,A., Yuste,L. and Pandiella,A.** (2002). "Extracellular signal regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding". *Mol Biol Cell* 13:2031-44.

**Dohrman,A., Russell,J.Q., Cuenin,S., Fortner,K., Tschopp,J. and Budd,R.C.** (2005). "Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8". *J Immunol* 175:311-8.

**Dorothee,G., Vergnon,I., Menez,J., Echchakir,H., Grunenwald,D., Kubin,M., Chouaib,S. and Mami-Chouai,F.** (2002). "Tumor infiltrating CD4+T lymphocytes express APO2 ligand (Apo2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN-alpha on Apo2L/TRAIL expression and mediated cytotoxicity". *J Immunol* 169(2):809-17.

**Dorr,J., Bechmann,I., Waiczies,S., Aktas,O., Walczac,H., Krammer,P.H., Nitsch,R. and Zipp,F.** (2002). "Lack of tumor necrosis apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain". *J Neurosciences* 22:RC209.

**Dredge,K., Marriot,J.B., Macdonald,C.D., Man,H.W., Chen,R., Muller,G.W., Stirling,D. and Dalgleish,A.G.** (2002). "Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects". *Br J Cancer* 87(10):1166-72.

**Du,C., Fang,M., Li,Y., Li,L. and Wang,X.** (2000). "Smac a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by elimination IAP inhibition". *Cell* 102:33-42.

**Du,W., Lebowitz,P.F. and Prendergast,G.C.** (1999). "Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB". *Mol Cell Biol* 19:1831-40.

**Earnshaw,W.C., Martins,L.M. and Kauffmann,S.H.** (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis". *Annu Rev Biochem* 68:383-424.

**Eckelman,B.P. and Salvesen,G.S.** (2006). "The human antiapoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases". *J Biol Chem* 281:3254-60.

**Eckhart,L., Ballaun,C., Uthman,A., Kittel,C., Stichanwirth,M., Buchberger,M., Fisher,H., Sipos,W. and Tschachler,E.** (2005). "Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity". *J Biol Chem* 280 (42): 35077-80.

**Eder,J.P., Ryan,D.P., Appleman,L., Zhu,A.X., Puchalski,T., He,X., Sonnichsen,D.S., Cooper,M., Wright,J., Clark,J.W. and Supko,J.G.** (2006). "Phase I clinical trial of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 administered as a weekly 24h continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors". *Cancer Chemother Pharmacol* 58(1):107-16.

**Ehrlich,S., Infante-Duarte,C., Seeger,B. and Zipp,F.** (2003). "Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells and monocytes". *Cytokine* 24, 244-53.

**Ellis,H.M. and Horvitz,H.R.** (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*". *Cell* 44:817-29.

**Ellis,R.E., Yuan,J.Y. and Horvitz,H.R.** (1991). "Mechanisms and functions of cell death". *Annu Rev Cell Biol* 7:663-98.

**Ely,S.A. and Knowles,D.M.** (2002). "Expression of CD56/Neural Cell Adhesion Molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from MGUS and lymphomas". *American Journal of Pathology* 160:1293-99.

**Emery,J.G.,McDonnell,P., Burke,M.B., Deen,K.C., Lyn,S., Silverman,C., dul,E., Appelbaum,E.R.,Eichman,C., DiPrinzio,R., Dodds,R.A., James,I.E., Rosenberg,M., Lee,J.C. and Young,P.R.** (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL". *J Biol Chem* 273:14363-67.

**Erenpreisa,J., Kalejs,M. and Craggs,M.S.** (2005). "Mitotic catastrophe and endomitosis in tumor cells: an evolutionary key to a molecular solution". *Cell Biol Int* 29 (12):1012-18.

**Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell,P.A., Cohen,J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M.** (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages". *J. Immunol* 148(7): 2207-16.

**Feldkamp,M.M., Lau,N., Roncari,L. and Guha,A.** (2001). "Isotype specific Ras GTP-levels predicts the efficacy of farnesyltransferase inhibitors against human astrocytomas regardless of Ras mutational status". *Cancer Res* 61:4425-31.

**Ferlin-Bezombes,M., Jourdan,M., Liutard,J., Brochier,J., Rossi,J-F. and Klein,B.** (1998). "Interferon- $\alpha$  is a Survival Factor for Human Myeloma Cells and Reduces Dexamethasone-Induced Apoptosis". *J Immunol* 161:2692-99.

**Fernandes-Alnemri,T., Litwack,G. and Alnemri,E.S.** (1994). "CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme". *J Biol Chem* 269(49): 30761-64.

**Fidler,I.J.** (1999). "Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy". *Cancer Chemothe. Pharmacol* 43:S3-10.

**Gamen,S., Anel,A., Pérez-Galán,P., Lasierra,P., Jonson,D., Piñeiro,A. and Naval,J.** (2000). "Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes  $\Delta\Psi_m$  loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells". *Exp Cell Res* 258:223-35.

**Gamero, A.M. and Lerner,A.C.** (2001). "Vanadate facilitates Interferon alpha-mediated apoptosis that is dependent on the Jak/Stat pathway". *J Biol Chem* 276(17): 13547-53.

**Garcia-Calvo,M., Peterson,E.P., Leitig,B., Ruel,R., Nicholson,D.W. and Thornberry, N.A.** (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors". *J Biol Chem* 273(49): 32608-13.

**Garcia-Sanz, R.** (2006) "Thalidomide in multiple myeloma". *Expert Opin Pharmacother* 7(2):195-213

**Gazitt,Y., Shaughnessy,P. and Montgomery,W.** (1999). "Apoptosis-induced by TRAIL and TNF-alpha in human multiple myeloma cells is not blocked by Bcl-2". *Cytokine* 11(12):1010-19.

**Georgakis,G.V., Li,Y., Humphreys,R., Andreeff,M., O'Brien,S., Younes,M., Carbone,A., Albert,V. and Younes,A.** (2005). "Activity of selected human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death". *Br J Haematol* 130:501-10.

**Gómez-Benito,M., Marzo,I., Anel,A. and Naval, J.** (2005a). "Farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 induces apoptosis in myeloma cells through PUMA upregulation, Bax and Bak activation and Mcl-1 elimination". *Mol Pharmacol* 67(6): 1991-8.

**Gómez-Benito,M., Balsas,P., Bosque,A., Anel,A., Marzo,I. and Naval,J.** (2005b). "Apo2L/TRAIL is an indirect mediator of apoptosis induced by interferon-alpha in human myeloma cells". *FEBS Lett* 579: 6217-22.

**Gomez-Bougie,P., Bataille,R. and Amiot,M.** (2004). "The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells". *Eur J Immunol* 34:3156-64.

**Göttlicher,M., Minucci,S., Zhu,P., Krämer,O.H., Schimpf,A., Giavara,S., Sleeman,J.P., Lo Coco,F., Nervi,C., Pelicci,P.G. and Heinzl,T.** (2001). "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells". *EMBO J* 20(24):6969-78

**Green,D.R. and Reed,J.C.** (1998). "Mitochondria and apoptosis". *Science* 281:1309-12.

**Greenhalf,W., Stephan,C. and Chaudhuri,B.** (1996). " Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEBS Lett* 380(1-2):169-75.

**Gross,A., Yin,X.M., Wang,K., Wei,M.C., Jockel,J., Milliman,C., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P. and Korsmeyer,S.J.** (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death". *J Biol Chem* 274(2):1156-63.

**Grzasko, N.** (2004). "Involvement of apoptosis and proinflammatory cytokines in the pathogenesis of anemia in multiple myeloma". *Postepy Hig Med Dosw* 7(58):364-71.

**Gurvich,N., Tsygankova,O.M., Meinkoth,J.L. and Klein,P.S.** (2004). "Histone deacetylase is a target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation". *Cancer Res* 64:1079-86.

**Haluska,P., Dy,G.K. and Adjei,A.A.** (2002). "Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents". *Eur J Cancer* 38:1685-1700.

**Hanahan,D. and Weinberg,R.A.** (2000). "The hallmarks of cancer". *Cell* 100:57-70.

**Hengartner,M.O. and Horvitz,H.R.** (1994). "The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345 (1313): 243-6.



**Hideshima,T., Chauhan,D., Podar,K., Schlossman,R.L, Richardson,P. and Anderson,K.C.** (2001). "Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment". *Semin Oncol* 28:607-12.

**Hitomi,J., Katayama,T., Eguchi,Y., Kudo,T., Taniguchi,M., Koyama,Y., Manabe,T., Yamagishi,S., Bando,Y., Imaizumi,K., Tsujimoto,Y. and Tohyama,M.** (2004). "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death". *J Cell Biol* 165:347-56.

**Hou,J., Xiong,H., Gao,W. and Jiang,H.** (2005). "2-Methoxyestradiol at low dose induces differentiation of myeloma cells". *Leuk Res* 29 (9): 1059-67.

**Hsu,H., Xiong,J. and Goeddel,D.V.** (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation". *Cell* 81, 495-504.

**Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G. and Goeddel,D.V.** (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways". *Cell* 84:299-308.

**Hu,L., Shi,Y., Hsu,J.H., Gera,J., Van Ness,B. and Lichtenstein,A.** (2003). "Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells". *Blood* 101:3126-35.

**Hu,S., Vincenz,C., Buller,M. and Dixit,V.M.** (1997). "A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD95 and tumor necrosis factor receptor-1 induced apoptosis". *J Biol Chem* 272:9621-24.

**Hussein,M.A.** (2002). "Nontraditional cytotoxic therapies for relapsed/refractory multiple myeloma". *The Oncologist*. 7(1): 20-29.

**Iglesias-Serret,D., Pique,M., Gil,J., Pons,G. and López,J.M.** (2003). "Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis". *Arch Biochem Biophys* 417:141-52.

**Inogés,S., Rodríguez-Calvillo,M., López Díaz de Cerio,A., Zabalegui,N., Melero,I., Sánchez-Ibarrola,A., Rocha,E. and Bendandi,M.** (2004). "Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas". *An Sist Sanit Navar* Vol 27 N°1 enero-abril.

**Irmiler,M., Thome,M., Habne,M., Schneider,P., Hofmann,K., Steiner,V., Bodmer,J.L., Schroter,M., Burns,K., Mattmann,C., Rimoldi,D., French,L.E. and Tschopp,J.** (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP". *Nature* 388 (6638):190-5.

**Isaacs,A. and Lindenmann,J.** (1957). "Virus interference I. The interferon". *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 147:258-67.

**Jelinek,D.F., Aagaard-Tillery,K.M., Arendt,B.K., Arora,T., Tsuchumper,R.C. and Westendorf,J.J.** (1997). "Differential Human Multiple Myeloma Cell Line Responsiveness to Interferon- $\alpha$ ". *J Clin Invest* 99:447-456.

**Jiang,K., Copola,D., Crespo,N.C., Nicosia,S.V., Hamilton,A.D., Sebti,S.M. and Cheng,J.Q.** (2000). "The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis". *Mol Cell Biol* 20(1): 139-48.

**Jo,M., Kim,T.H., Seol,D.W., Esplen,J.E., Dorko,K., Billiar,T.R. and Strom,S.C.** (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand". *Nat Med* 6: 564-7.

**Johnstone,R.W., Ruefli,A.A. and Smyth,M.J.** (2000). "Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?". *Trends Biochem Sci* 25: 1-6.

**Johnstone,R.W., Ruefli,A.A. and Lowe,S.W.** (2002). "Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy". *Cell* 108: 153-64.

**Jonasch,E. and Haluska,F.G.** (2001). "Interferon in Oncological Practise: Review of Interferon Biology, Clinical Applications and Toxicities". *The Oncologist* 6:34-55.

**Jourdan,M., Ferlin,M., Legouffe,E., Horvathova,M., Liautard,J., Rossi,JF., Wijdenes,J., Brochier,J. and Klein,B.** (1998). "The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells". *Br J Haematol* 100(4):637-46.

**Jourdan,M., De Vos,J., Metchi,N. and Klein,B.** (2000). "Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1". *Cell Death Differ* 7; 1244-52.

**Jourdan,M., Veyrune,J.L., Vos,J.D., Redal,N., Coudere,G. and Klein,B.** (2003). "A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6 induced survival of human myeloma cells". *Oncogene* 22:2950-59.

**Kang,J., Kisenge,R.R., Toyoda,H., Tanka,S., Bu,J., Azuma,E. and Komada,Y.** (2003). "Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines". *Br J Haematol* 123: 921-32.

**Karp,J.E.** (2001). "Farnesyl protein transferase inhibitors as targeted therapies for hematologic malignancies". *Semin Hematol* 38 (Suppl 7):16-23

**Kayagaki,N., Yamaguchi,N., Nakayama,M., Eto,H., Okumura,K. and Yagita,H.** (1999). "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 189(9):1451-1460.

**Kelekar,A.** (2006). "Autophagy". *Ann N Y Acad Sci* 1066: 259-71.

**Kelley,R.F., Totpal,K., Lindstrom,S.H., Mathieu,M., Billeci,K., Deforge,L., Pai,R., Hymowitz,S.G. and Ashkenazi,A.** (2005). "Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor DR5 than DR4 to apoptosis signaling". *J Biol Chem* 280(3):2205-12.

**Kelley,S.K. and Ashkenazi,A.** (2004). "Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL". *Curr Opin Pharmacol* 4(4):333-9.

**Kerr,J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer* 26: 239-57.

**Kerr,J.F.R., Winterford,C.M. and Harmon,B.V.** (1993). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy". *Cancer* 73:2013-26.

**Kim,K.M. and Lee,Y.J.** (2005). "Amiloride augments TRAIL-induced apoptotic death by inhibiting phosphorylation of kinases and phosphatases associated with the PI3K-Akt pathway". *Oncogene* 24: 355-66.

**Kimberley,F.C. and Screaton,G.R.** (2004). "Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors". *Cell research* 14(5):359-72.

**Kirchhoff,S., Muller,W.W., Krueger,A., Schmitz,I. and Krammer,P.H.** (2000). "TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity". *J Immunol* 165:6293-300.

**Komarova,E.A. and Gudkov,A.V.** (2000). "Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy". *Biochem* 65: 41-48.

**Kozopas,K.M., Yang,T., Buchan,H.L., Zhou,P. and Graig,R.W.** (1993). "MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2". *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 3516-20.

**Krueger,A., Schmitz,I., Baumann,S., Krammer,P.H. and Kirchhoff,S.** (2001). "FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex". *J Biol Chem* 276: 20633-40.

**Kuehl,W.M. and Bergsagel,P.L.** (2002). "Multiple Myeloma: Evolving genetic events and host interactions". *Nature Reviews* Vol 2; 175-187.

**Kumar,S., Rajkumar,SV., Kimlinger,T., Greipp,PR. and Witzig,TE.** (2005). "CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations". *Leukemia* 19(8):1466-70.

**Kyle,R.A. and Rajkumar,S.V.** (2004) "Multiple Myeloma". *N Engl J Med* 351:1860-1873.

**Lackner,M.R., Kindt,R.M., Carroll,P.M., Brown,K., Cancilla,M.R., Chen,C., de Silva,H., Franke,Y., Guan,B., Heuer,T., Hung,T., Keegan,K., Lee,J.M., Manne,V., O'Brien,C., Parry,D., Perez-Villar,J.J., Reddy,R.K., Xiao,H., Zhan,H., Cockett,M., Plowman,G., Fitzgerald,K., Costa,M. and Ross-Macdonald,P.** (2005). "Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors". *Cancer Cell* 7(4): 325-336.

**Lakhani,S.A., Masud,A., Kuida,K., Porte,G.A.Jr, Booth,C.J., Mehal,W.Z., Inayat,I. and Flavell,R.A.** (2006). "Caspases 3 and 7:key mediators of mitochondrial events of apoptosis". *Science* 311(5762):785-6.

**Lawrence,D., Shahrokh,Z., Marsters,S., Achilles,K., Shih,D., Mounho,B., Hillan,K., Totpal,K., DeForge,L., Schow,P., Hooley,J., Sherwood,S., Pai,R., Leung,S., Khan,L., Gliniak,B., Bussiere,J., Smith,C.A., Strom,S.S., Kelley,S., Fox,J.A., Thomas,D. and Ashkenazi,A.** (2001). "A differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions". *Nat Med* 7(4): 383-5.

**Le Gouill,S., Pellat-Deceunynck,C., Harousseau,J.L., Rapp,M.J., Robillard,N., Bataille,R. and Amiot,M.** (2002). "Farnesyltransferase inhibitor R115777 induces apoptosis of human myeloma cells". *Leukemia* 16, 1664-67.

**Le Gouill,S., Podar,K., Harousseau,J.L. and Anderson,K.C.** (2004). "Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma". *Cell Cycle* 3 (10): 1259-62.

**Lebowitz,P., Davide,J.P. and Prendergast, G.C.** (1995). "Evidence that farnesyl transferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity". *Mol Cell Biol* 15:6613-22.

**Ley,R., Balmanno,K., Hadfield,K., Weston,C. and Cook, S.J.** (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim". *J Biol Chem* 278(21): 18811-6.

**Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S. and Wong,X.** (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". *Cell* 91(4): 479-89.

**Lily,Y., Luo,X. and Wang,X.** (2001). "Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria". *Nature* 412:95-9.

**Lin,P., Owens,R., Tricot,G. and Wilson,C.S.** (2004). " Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma". *Am J Clin Pathol* 121(4):482-8.

**Lincz,L.F., Yeh,T.X. and Spencer,A.** (2001). "TRAIL-induced eradication of primary tumor cells from multiple myeloma patient bone marrow is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy". *Leukemia* 15(10):1650-7.

**Lindemann,R.K., Gabrielli,B. and Johnstone,R.W.** (2004). "Histone-Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Cancer". *Cell Cycle* 3(6):779-88.

**Liu,A., Du,W., Liu,J-P., Jessell,T.M. and Prendergast,G.C.** (2000). "RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors". *Mol Cel Biol* 20(16):6105-13.

**Liu,M.,Bryant,M.S., Chen,J., Lee,S., Yaremko,B., Lipari,P., Malkowski,M., Ferrari,E., Nielsen,L., Prioli,N., Del,J., Sinha,D., Syed,J., Korfmacher,W.A., Nomeir,A.A., Lin,C.C., Wang,L., Taveras,A.G., Doll,R.J., Njoroge,F.G., Mallams,A.K., Remiszewski,S., Catino,J.J., Girijavallabhan,V.M., Bishop,W.R. et al.** (1998). "Antitumor effect of SCH66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl transferase protein in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice". *Cancer Res* 58:49-57.

**Liu,Q. and Gazzitt,Y.** (2003). "Potentiation of dexamethasone-, placitaxel-, and Ad-p53-induced apoptosis by Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides in drug-resistant multiple myeloma cells". *Blood* 101; 4105-14.

**Liu,R., Page,C.,Beidler,D.R., Wicha,M.S. and Nunez,G.** (1999). "Overexpression of Bcl-xL promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngenic mouse model. *Am J Pathol.* 155: 1861-67.

**Long,S.B., Casey,P.I. and Beese,L.S.** (2002). "Reaction path of protein farnesiltransferase at atomic resolution". *Nature* 419, 645-50.

**MacFarlane,M. and Williams,A.C.** (2004). "Apoptosis and disease: a life or death decision". *EMBO reports* 5(7):674-78.

**MacFarlane,M., Inoue,S., Kohlhaas,S.L., Majid,A., Harper,N., Kennedy,D.B., Dyer,M.J. and Cohen,G.M.** (2005). "Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1". *Cell Death Differ* 12: 773-82.

**Mackay,H.J., Hoekstra,R., Eskens,F.A., Loos,W.J., Crawford,D., Voi,M., Van Vreckem,A., Evans,T.R. and Verweij,J.** (2004). "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the farnesyl transferase inhibitor BMS-214662 in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors". *Clin Cancer Res* 10(8): 2636-44.

**Mahmoud,M.S., Fujii,R., Ishikawa,H. and Kawano,M.M.** (1999). "Enforced CD19 Expression Leads to Growth Inhibition and Reduced Tumorigenicity". *Blood* 94(10):3551-8.

**Maier,S.K. and Hammond,J.M.** (2006). "Role of Lenalidomide in the Treatment of Multiple Myeloma and Myelodysplastic Syndrome". *Ann Pharmacother* 40(2):286-9.

**Martin,S.J., Finucane,D.M., Amarante-Mendes,G.P., O'Brien,G.A. and Green,D.R.** (1996). "Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity". *J Biol Chem* 271:28753-6.

**Marzo,I., Brenner,C., Zamzami,N., Jurgensmeier,J.M., Susin,S.A., Vieira,H.L., Prevost,M.C., Xie,Z., Matsuyama,S., Reed,J.C. and Kroemer,G.** (1998a). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis". *Science* 281(5385):2027-31.

**Marzo,I., Brenner,C., Zamzami,N., Susin,S.A., Beutner,G., Brdiczka,D., Remy,R., Xie,Z.H., Reed,J.C. and Kroemer,G.** (1998b). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins". *J Exp Med* 187(8):1261-71.

**Matsui,W., Huff,C.A., Vala,M., Barber,J., Smith,B.D. and Jones,R.J.** (2003). "Anti-tumour activity of interferon-alpha in multiple myeloma: role of interleukin-6 and tumor differentiation". *Br J Haematol* 121(2):251-8.

**McCarthy,N.J., Whyte,M.K., Gilbert,C.S. and Evan,G.I.** (1997). "Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak". *J Cell Biol* 136(1): 215-27.

**Michaelis,M., Michaelis,U.R., Fleming,I., Suhan,T., Cinatl,J., Blaheta,R.A., Hoffmann,K., Kotchetkov,R., Busse,R., Nau,H. and Cinalt,J,Jr.** (2004). "Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo". *Mol Pharmacol* 65:520-7.

**Micheau,O., Thome,M., Schneider,P., Holler,N., Tschopp,J., Nicholson,D.W., Briand,C. and Grutter,M.G.** (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex". *J Biol Chem* 277: 45162-71.

**Michels,J., Johnson,P.W.M. and Packham,G.** (2005). "Mcl-1". *Int J Biochem Cell Biol* 37(2):267-71.

**Migone,T.S., Zhang,J., Luo,X., Zhuang,L., Chen,C., Hu,B., Hong,J.S., Perry,J.W., Chen,S.F., Zhou,J.X., Cho,Y.H., Ullrich,S., Kanakaraj,P., Carrell,J., Boyd,E., Olsen,H.S., Hu,G., Pukac,L., Liu,D., Ni,J., Kim,S., Gentz,R., Feng,P., Moore,P.A., Ruben,S.M. and Wei,P.** (2002). "TL1A is a TNF like ligand for DR3 and TR6/DCR3 and functions as a T cell costimulator". *Immunity* 16(3):479-92.

**Minet,E., Cosse,J.P., Demazy,C., Raes,M. and Michiels,C.** (2006). "Accumulation of the pro-apoptotic factor Bak is controlled by antagonist factor Mcl-1 availability". *Apoptosis* 11(6):1039-47.

**Mitsiades,C.S., Treon,S.P., Mitsiades,N., Shima,Y., Richardson,P., Schlossman,R., Hideshima,T. and Anderson,K.C.** (2001). "TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications". *Blood* 98:795-804.

**Mitsiades,N., Mitsiades,C.S., Poulaki,V., Anderson,K.C. and Treon,S.P.** (2001). "Concepts in the use of TRAIL/Apo2L: an emerging biotherapy for myeloma and other neoplasias". *Expert Opin Investig Drugs* 10(8):1521-30.

**Mitsiades,N., Mitsiades,C.S., Poulaki,V., Anderson,K.C. and Treon,S.P.** (2002). "Intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human multiple myeloma cells". *Blood* 99(6):2162-71.



**Mitsiades,N., Mitsiades,C.S., Richarson,P.G., MacMullan C., Poulaki V., Fanourakis G., Scholossman,R., Chauhan,D., Munshi,N.C., Hideshima,T., Richon,V.M., Marks,P.A., Anderson,K.C.** (2003). "Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells". *Blood* 101(10):4055-62.

**Monleón,I, Martínez-Lorenzo,MJ, Monteagudo,L, Lasierra,P, Taulés,M, Iturralde,M, Piñeiro,A, Larrad,L., Alava,M.A., Naval,J. and Anel,A.** (2001). "Differential secretion of FasL or APO2L carrying microvesicles during activation induced death of human T cells". *J Immunol* 167:6736-44.

**Morgan,M.A., Ganser,A. and Reuter,C.W.M.** (2003). "Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia". *Leukemia* 17: 1482-98.

**Mulcahy,L.S., Smith,M.R. and Stacey,D.W.** (1985). "Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells". *Nature* 313:241-43.

**Nagata,S. and Golstein,P.** (1995). "The Fas death factor". *Science* 267: 1449-56.

**Nakazato,T., Ito,K., Ikeda,Y. and Kizaki,M.** (2005). "Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species". *Clin Cancer Res* 11(16):6040-9.

**Nicholson,D.W., Ali,A., Thornberry,N.A., Vaillancourt,J.P., Ding,C.K., Gallant,M., Gareau,Y., Griffin,P.R., Labelle,M., Lazebnik,Y.A. et al.** (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis". *Nature* 376(6535):37-43.

**Nicotera,P., Leist,M. and Manzo,L.** (1999). "Neuronal cell death: a demise with different shapes". *Trends Pharmacol Sci* 20 (2):46-51.

**Nijhawan,D., Fang,M., Traer,E., Zhong,Q., Gao,W., Du,F. and Wang,X.** (2003). "Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation". *Genes Dep* 17:1475-1486.

**Nitsch,R., Bechmann,I., Deisz,R.A., Haas,D., Lehmann,T.N., Wendling,U. and Zipp,F.** (2000). "Human brain cell-death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)". *The Lancet* 356: 827-8.

**O'Regan,R.M. and Khuri,F.R.** (2004). "Farnesyl transferase inhibitors: the next targeted therapies for breast cancer?". *Endocrine-Related Cancer* 11:191-205.

**Okano,J. and Rugsti,A.K.** (2001). "Placitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery". *J Biol Chem* 276 (1):19555-64.

**Orlowski,R.Z. and Zeger,E.L.** (2006). "Targeting the proteasome as a therapeutic strategy against haematological malignancies". *Expert Opin Investig Drugs* 15 (2):117-30.

**Otsuki,T., Yamada,O., Sakaguchi,H., Tomokuni,A., Wada,H., Yawata,Y. and Ueki,A.** (1998). "Human myeloma cell apoptosis induced by interferon-alpha". *Br J Haematol* 103, 518-529.

**Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L. and Maniatis,T.** (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B". *Cell* 78:773-85.

**Panaretakis,T., Pokrovskaja,K., Shoshan,M.C. and Grandeur,D.** (2003). "Interferon-alpha-induced apoptosis in U266 cells is associated with activation of the proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax". *Oncogene* 22(29):4543-56

**Papadimitrakopoulou,V., Agelaki,S., Tran,H.T., Kies,M., Gagel,R., Zinner,R., Kim,E., Ayers,G., Wright,J. and Khuri,F.** (2005). "Phase I study of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 given weekly in patients with solid tumors". *Clin Cancer Res* 11(11): 4151-59.

**Parrish,J., Li,L., Klotz,K., Ledwich,D., Wang,X. and Xue,D.** (2001). "Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*". *Nature* 412:90-94.

**Perez-Galan,P., Roue,G., Villamor,N., Montserrat,E., Campo,E. and Colomer,D.** (2006). "The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status". *Blood* 107(1):257-64.

**Pestka,S., Langer,J.A., Zoon,K.C. and Samuel,C.E.** (1987). "Interferons and their actions". *Annu Rev Biochem* 56:727-77.

**Peter,M.E. and Krammer,P.H.** (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis". *Curr Opin Immunol* 10(5):545-51.

**Peter,M.E., Scaffidi,C., Medema,J.P., Kischkel,F.C. and Krammer,P.H.** (1999). "The death receptors in apoptosis". *Results Probl Cell Differ* 23:25-63.

**Peter, M.E.** (2005). "Taming TRAIL: the wiming path to a novel form of cancer therapy". *Cell Death Differ* 12:693-4.

**Platanias, L.C.** (2005). "Mechanisms of Type-I and Type-II-interferon-mediated signaling". *Nature Reviews* 5:375-86.

**Puthier,D., Derenne,S., Barille,S., Moreau,P., Harousseau,J., Bataille,R. and Amiot,M.** (1999). "Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells". *Br J Haematol* 107(2); 392-95.

**Puthier,D., Thabard,W., Rapp,M, Etrillard,M., Harousseau,J., Bataille,R. and Amiot,M.** (2001). "Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 anti-apoptotic molecule". *Br J Haematol* 112(2):358-63.

**Qin,J., Chaturvedi,V., Bonish,B. and Nickoloff,B.J.** (2001). "Avoiding premature apoptosis of normal epidermal cells". *Nat Med* 7: 385-6.

**Rajkumar,S.V., Mesa,R.A. and Tefferi,A.** (2002). "A review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematologic malignancies". *J Hematother Stem Cell Res* 11:33-47.

**Ravagnan,L., Gurbuxani,S., Susin,S.A., Maise,C., Daugas,E., Zamzami,N., Mak,T., Jäättelä,M., Penninger,J.M., Garrido,C. and Kroemer,G.** (2001). "Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor". *Nature Cell Biol* 3:839-843.

**Reed, J.C.** (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer". *J Clin Oncol* 17:2941-53.

**Ricci,J.E., Munoz-Pinedo,C., Fitzgerald,P., Baillo-Maitre,B., Perkins,G.A., Yadava,N., Scheffler,I.E., Ellisman,M.H. and Green,D.R.** (2004). "Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport Chain". *Cell* 117(6):773-86.

**Rodríguez-Calvillo,M., Inogés,S., López Díaz de Cerio,A., Zabalegui,N., Panizo,C., Hernández,M., Pérez-Calvo,J., Prósper,F., Melero,I., Sánchez-Ibarrola,A., Rocha,E. y Bendandi,E.** (2004). "Pasado, presente y futuro de la vacunación anti-idiotipo". *Rev Med Univ Navarra* Vol 48 N°3

**Rose,W.C., Lee,F.Y., Fairchild,C.R., Lynch,M., Monticello,T., Kramer R.A. and Manne,V.** (2001). "Preclinical antitumor activity of BMS-214662, a highly apoptotic and novel farnesyl transferase inhibitor". *Cancer Res* 61:7507-17.

**Rosen,D., Li,J.H., Keidar,S., Markon,I., Orda,R. and Berke,G.** (2000). "Tumor immunity in perforin-deficient mice: a role for CD95 (Fas/APO-1) ". *J Immunol* 164:3229-3235.

**Roth,W., Wagenknecht,B., Dichgans,J. and Weller,M.** (1998). "Interferon-alpha enhances CD95L-induced apoptosis of human malignant glioma cells". *J Neuroimmunol* 87(1-2):121-9.

**Roux,S., Lambert-Comeau,P., Saint-Pierre,C., Lepine,M., Sawan,B., Parent,J.L.** (2005). "Death receptors, Fas and TRAIL receptors, are involved in human osteoclast apoptosis". *Biochem Biophys Res Commun* 333(1) :42-50.

**Ruben,S.M. and Wei,P.** (2002). "TLA1 is a TNF like ligand for DR3 and TR6/DCR3 and functions as a T cell costimulator". *Immunity* 16(3):479-92.

**Ryan,D.P., Eder,J.P.Jr., Puchlaski,T., Seiden,M.V., Lynch,T.J., Fuchs,C.S., Amrein,P.C., Sonnichsen,D., Supko,J.G. and Clark,J.W.** (2004). "Phase I clinical trial of the farnesyltransferase inhibitor BMS-214662 given as a 1-hour intravenous infusion in patients with advanced solid tumors". *Clin Cancer Res* 10(7): 2222-30.

**Saelens,X., Festjens,N., Vande Walle,L., van Gurp,M., van Loo,G. And Vandenameele,P.** (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death". *Oncogene* 23:2861-74.

**Sahara, N., Ihara,M., Ono,T., Tamashima,S., Matsui,H., Takeshita,A. and Ohno,R.** (2000). "Multiple myeloma expressing CD19(+)/CD56(-) phenotype. *Am J Hematol* 64(4): 311-3.

**Sahara,N., Takeshita,A., Shigeno,K., Fujisawa,S., Takeshita,K, Naito,K., Ihara,M., Ono,T, Tamashima,S, Nara,K, Ohnishi,K and Ohno,R.** (2002). "Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma". *Br J Haematol* 117(4):882-5.

**Sánchez-Pérez,I. and Perona,R.** (1999). "Lack of c-jun activity increases survival to cis-platin". *FEBS Lett* 453:151-8.

**Santucci,R., Mackley,P.A., Sebti,S. and Alsina,M.** (2003). "Farnesyltransferase inhibitors and their role in the treatment of multiple myeloma". *Cancer Control* 10:384-7.

**Sayers,T.J.** (2005). "Mcl-1 reduction: releasing a death brake? ". *Blood* 105 (8):3005.

**Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H. and Peter,M.E.** (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways". *EMBO J* 17(6): 1675-87.

**Schmitt,C.A., McCurrach, M.E., de Stanchina,E., Wallace-Brodeur,R.R. and Lowe,S.W.** (1999). "INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promotes chemoresistance by disabling p53". *Genes Dev* 13:2670-77.

**Schwabe,M., Brini,A.T., Bosco,M.C., Rubboli,F., Egawa,M., Zhao,J., Princler,G.L. and Kung,H.F.** (1994). "Disruption by interferon-alpha of an autocrine interleukin-6 growth loop in IL-6-dependent U266 myeloma cells by homologous and heterologous down-regulation of the IL-6 receptor alpha- and beta-chains". *J Clin Invest* 94(6):2317-25.

**Schwartz,G.G.** (1997). "Multiple myeloma: clusters, clues and dioxins". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:49-56.

**Sebti,S.M.** (2003). "Blocked Pathways: FTIs Shut Down Oncogene Signals". *The Oncologist* 8(3):30-38.

**Sebti,S.M. and Der,C.J.** (2003). "Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors". *Nature Reviews* 3:945-51.

**Seward,R.J., von Haller,P.D., Aebersold,R. and Hubert,B.T.** (2003). "Phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bim in lymphocytes is associated with protection from apoptosis". *Mol Immunol* 39(16): 983-93.

**Sheridan,J.P., Marsters,S.A., Pitti,R.M., Gurney,A., Skubatch,M., Ramakrishnan,L., Gray,C.L., Baker,K.,Wood,W.I., Goddard,A.D., Godowski,P. and Ashkenazi,A.** (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors". *Science* 277:818-21

**Shikama,Y., Miyashita,T. and Yamada,M.** (2001). "Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis related caspases". *Exp Cell Res* 264: 315-25.

**Shimizu,S., Narita,M. and Tsujimoto,Y.** (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC". *Nature* 399:483-87.

**Siegel,R.M., Frederiksen,J.K., Zacharias,D.A., Chan,F.K., Johnson,M., Lynch,D., Tsien,R.Y. and Leonardo,MJ.** (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations". *Science* 288:2354-57.

**Siegel,R.M.** (2006). "Caspases at the crossroads of immune-cell life and death". *Nat Rev Immunol* 6(4):308-17.

**Sihori,B. and Powles,R.** (2004). "Multiple myeloma". *The Lancet* 363; 875-887.

**Singh,S.B. and Lingham,R.B.** (2002). "Current progress on farnesyl protein transferase inhibitors". *Curr Opin Drug Discov Devel.* 5:225-44.

**Soengas,M.S., Capodiceci,P., Polski,D., Mora,J., Esteller,M., Optiz-Araya,X.,McCombie,R., Herman,J.G., Gerald,W.L., Lazebnik,Y.A., Cordon-Cardo,C. and Lowe,S.W.** (2001). "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma". *Nature* 409(6817):207-211.

**Spencer,A., Yeh,S.L., Koutrevelis,K. and Baulch-Brown,C.** (2002). "TRAIL-induced apoptosis of authentic myeloma cells does not correlate with the procaspase-8/FLIP ratio". *Blood* 100(8): 3049; author reply 3050-1.

**Spets,H., Georgii-Hemming,P., Siljason,J., Nilsson,K. and Jernberg-Wiklund,H.** (1998). "Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon-gamma and interferon- in IL-6-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines". *Blood* 92(8):2914-23.

**Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Fernandes-Alnemri,T. and Alnemri,E.S.** (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization". *Mol Cell Biol* 1(7):949-957.

**Stamatakis,K., Cernuda-Morollón,E., Hernández-Perera,O. and Pérez-Sala,D.** (2002). "Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation". *Journal Biol Chem* 277(51):49389-96.

**Stephen RD Johnston.**(2003). "BMS-214662 Bristol-Myers Squibb". *Idrugs* 6(1):72-78.

**Stevenson,F.K., Bell,A.J., Cusack,R., Hamblin,T.J., Slade,C.J., Spellerberg,M.B. and Stevenson,G.T.** (1990). "Preliminary studies for an immunotherapeutic approach to the treatment of human myeloma using chimeric anti-CD38 antibody". *Blood* 77(5):1071-79.

**Strasser,A.** (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system". *Nat Rev Immunol* 5(3):189-200.

**Sulston, J.E.** (1976). "Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275(938):287-97.

**Sun,Y. and Leaman,D.W.** (2005). "Involvement of Noxa in Cellular Apoptotic Responses to Interferon, Double-stranded RNA, and Virus Infection". *J Biol Chem* 280(16):15561-68.

**Susin,S.A., Zamzami,M. and Kroemer,G.** (1998). "Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more". *Biochem Biophys Acta* 1366(1-2): 151-65.

**Susin,S.A., Lorenzo,H.K., Zamzami,N., Marzo,I., Snow,B.E., Brothers,G.M., Mangion,J., Jacotot,E., Costantini,P., Loeffler,M., Larochette,N., Goodlett,D.R., Aebersold,R., Siderovski,D.P., Penninger,J.M. and Kroemer,G.** (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". *Nature* 397(6718):441-6.

**Susin,S.A., Daugas,E., Ravagnan,L., Samejima,K., Zamzami,N., Loeffler,M., Constatini,P., Ferri,K.F., Irinopoulou,T., Prevost,M.C., Brothers,G., Mak,T.W., Penninger,J., Earnshaw,W.C. and Kroemer,G.** (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis". *J Exp Med* 192(4):571-79.

**Takeda,K., Hayakawa,Y., Smyth,M.J., Kayagaki,N., Yamaguchi,N., Kakuta,S., Iwakura,Y., Yagita,H. and Okumura,K.** (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells". *Nat Med* 7(1): 94-100.

**Takeda,K., Smyth,M.J., Cretney,E., Hayakawa,Y., Kayagaki,N., Yagita,H. and Okumura,K.** (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development". *J Exp Med* 195:161-9.

**Talanian,R.V., Quinlan,C., Trautz,S., Hackett,M.C., Mankovich,J.A., Banach,D., Ghayur,T., Brady,K.D. and Wong,W.W.** (1997). "Substrate specificity of caspase family proteases". *J Biol Chem* 272:9677-82.



**Tanaka,S., Saito,K. And Reed,J.C.** (1993). "Structure function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival". *J Biol Chem* 268(15):10920-6.

**Tartaglia,L.A., Ayres,T.M., Wong,G.H. and Goeddel,D.V.** (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death". *Cell* 74:845-53.

**Tecchio,C., Huber,V., Scapini,P., Calzetti,F., Margotto,D., Todeschini,G., Pilla,L., Martinelli,G., Pizzolo,G., Rivoltini,L. and Casatella,M.A.** (2004). "IFN $\alpha$ -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL-Apo2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells". *Blood* 103(10):3837-44.

**Tewari,M., Quan,L.T., O'Rourke,K., Desnoyers,S., Zeng,Z., Beidler,D.R., Poirier,G.G., Salvesen,G.S. and Dixit,V.M.** (1995). "Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase". *Cell* 81(5): 801-9.

**Thome,M. and Tschoop,J.** (2001). "Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP". *Nat Rev Immunol* 1:50-8.

**Thompson,J.E., Cubbon,R.M., Cummings,R.T., Wicker,L.S., Frankshun,R., Cunningham,B.R., Cameron,P.M., Meinke,P.T., Liverton,N., Weng,Y. and DeMartino,J.A.** (2002). "Photochemical preparation of a Pyridone Containing Tetracycle: A Jak Protein Kinase Inhibitor". *Bioorg Med Chem Lett* 12:1219-23.

**Thornberry,N.A. and Lazebnik,Y.** (1998). "Caspases: enemies within". *Science* 281:1312-16.

**Thyrell,L., Erickson,S., Zhivotovsky,B., Pokrovskaja,K., Sangfelt,O., Castro,J.J., Einhorn,S. and Grander,D.** (2002). "Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells". *Oncogene* 21(8):1251-62.

**Thyrell,L., Hjortsberg,L., Arulampalam,V., Panaretakis,T., Uhles,S., Dagnell,M., Zhivotovsky,B., Leibiger,I., Grander,D. and Pokrovskaja,K.** (2004). "Interferon-alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide3-kinase/mammalian target of Rapamycin Signaling Pathway. *J Biol Chem* 279(23):24152-62.

**Truneh,A., Sharm,S., Silverman,C., Khandekar,S., Reddy,M.P., Deen,K.C., McLaughlin,M.M., Srinivasula,S.M., Livi,G.P., Marshall,L.A., Alnemri,E.S., Williams,W.V. and Doyle,M.L.** (2000). "Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor". *J Biol Chem* 275(30):23319-25.

**Tsujimoto,Y., Finger,L.R., Yunis,J., Nowell,P.C. and Croce,C.M.** (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation". *Science* 226:1097-99.

**Uddin,S., Majchrzak,B., Wang,P-C., Modi,S., Khan,M.K., Fish,E.N. and Plataniias,L.C.** (2000). "Interferon-Dependent Activation of the Serine Kinase PI3-Kinase Requires Engagement of the IRES Pathway but not the Stat Pathway". *Biochem Biophys Res Commun* 270:158-62.

**van de Donk,N.W., Kamphuis,M.M., van Dijk,M., Borst,H.P., Bloem,A.C. and Lokhorst,H.M.** (2003). "Chemosensitization of myeloma plasma cells by an antisense-mediated downregulation of Bcl-2 protein". *Leukemia* 17:211-19.

**van de Donk,N.W., lokhorst,H.M. and Bloem,A.C.** (2005). "Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma". *Leukemia* 19(12):2177-85.

**Vanags,D.M., Pörn-Ares,M.I., Coppola,S., Burgess,D.H. and Orrenius,S.** (1996). "Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis". *J Biol Chem* 271:31075-85.

**Vanoosten,R.L., Moore,J.M., Ludwig,A.T. and Griffith,T.S.** (2005). "Depsipeptide (FR901228) enhances the cytotoxic activity of TRAIL by redistributing TRAIL receptor to membrane lipid rafts". *Mol Ther* 11:542-52.

**Vasalli,P.** (1992). "The pathophysiology of tumor necrosis factors". *Annu Rev Immunol* 10:411-52.

**Verhagen,A.M., Ekert,P.G.,Pakusch,M., Silke,J., Conolly,J.,Reid,G.E., Moritz,R.L., Simpson,R.J. and Vaux,D.L.** (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins". *Cell* 102(1):43-53.

**Verhagen,A.M., Silke,J., Ekert,P.G., Pakusch,M., Kaufmann,H., Connolly,L.M., Day,C.L., Tikoo,A., Burke,R., Wrobel,C., Moritz,R.L., Simpson,R.J. and Vaux,D.L.** (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins". *J Biol Chem* 277(1):445-54.

**Vivanco,I. and Sawyers,C.L.** (2002). "The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer". *Nat Rev Cancer* 2(7):489-501.

**Volm,M.** (1998). "Multidrug resistance and its reversal". *Anticancer Res* 18:2905-17.

**Wallace-Brodeur,R.R. and Loewe,S.W.** (1999). "Clinical implications of p53 mutations". *Cell Mol Life Sci* 55:64-75.

**Wallach,D., Kovalenko,A.V.,Varfolomeev,E.E. and Boldin,M.P.** (1998). "Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict". *Curr Opin Immunol* 10:279-288.

**Waterhouse,N.J. and Trapani,J.A.** (2003). "A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells". *Cell Death Differ* 10(7):853-5.

**Wherlock,M., Gampel,A., Futter,C. and Mellor,H.** (2004). "Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase". *J Cell Science* 117:3221-31.

**Whyte,D.B., Kirschmier,P., Hockenberry,T.N., Nunez-Oliva,I., James,L., Catino,J.J., Bishop,W.R. and Pai,J.K.** (1997). "K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors". *J Biol Chem* 272(22):14459-64.

**Willis, S.N. and Adams, J.M.** (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis". *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 617-25.

**Willis,S.N., Chen,L., Dewson,G., Wei,A., Naik,E., Fletcher,J.I., Adams,J.M. and Huang,D.C.S.** (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins". *Genes & Dev* 19:1294-1305.

**Wuillème-Toumi,S., Robillard,N., Gomez,P., Moreau,P., Le Guill,S., Avet-Loiseau,H., Harousseau,J.L., Amiot,M. and Bataille,R.** (2005). "Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival". *Leukemia* 19:1248-52.

**Wyllie,A.H.** (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous activation". *Nature* 284(5756):555-6.

**Yang,T., Kozopas,K.m. and Craig,R.W.** (1995). "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2". *J Cell Biol* 128: 1173-84.

**Yin,Q., Park,H.H., Chung,J.Y., Lin,S.C., Lo,Y.C., DaGraca,L.S., Jiang,X. and Wu,H.** (2006). "Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine". *Mol Cell* 22(2):259-68.

**Yuan,J., Shaham,S., Ledoux,S., Ellis,H.M. and Horvitz, H.R.** (1993). "The C-elegans cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme". *Cell* 75:641.

**Zaidi, A.A. and Vesole,D.H.** (2001). "Multiple myeloma: an old disease with new hope for the future". *CA Cancer J Clin* 51:273-85.

**Zerafa,N., Westwood,J.A., Cretney,E., Mitchell,S., Waring,P., Lezzi,M. and Smyth,M.J.** (2005). "Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies". *J Immunol* 175:5586-90.

**Zhang,B., Gojo,I and Fenton,R.G.** (2002). "Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma". *Blood* 99:1885-93.

**Zhang,F.L., Kirschmeier,P., Carr,D., James,L., Bond,R.W., Wang,L., Patton,R., Windsor,W.T., Syto,R., Zhang,R. and Bishop,W.R.** (1997). "Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A and Ki-Ras4B as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I". *J Biol Chem* 272(15):10232-39.

**Zhang,L. and Fang,B.** (2005). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer". *Cancer Gene Ther* 12:228-37.

**Zhong,Q., Gao,W., Du,F. and Wang,X.** (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis". *Cell* 121(7): 1085-95.

**Zhou, P., Kalakonda,N. and Comenzo,R.L.** (2005). "Changes in gene expression profiles of multiple myeloma cells induced by arsenic trioxide (ATO): possible mechanisms to explain ATO resistance in vivo". *Br J Haematol* 128(5):636-44.

**Zou,H., Li,Y., Liu, X. and Wang,X.** (1999). "An apaf-1-cytocrome C muticomplex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". *J Biol Chem* 274(17):11549-56.

