

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Trabajo Fin de Máster

“Apoptosis inducida por el inhibidor del proteasoma Ixazomib en células de mieloma humano”

“Apoptosis induced by the proteasome inhibitor Ixazomib in human myeloma cells”

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular

Grupo de Investigación: “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”

Autor

Manuel Beltrán Visiedo

Directores

Isabel Marzo Rubio

José Javier Naval Iraberri

Curso Académico 2017 – 2018

HOJA DE PRESENTACIÓN

Dra. **ISABEL MARZO RUBIO**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y Dr. **JOSÉ JAVIER NAVAL IRABERRI**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Máster “*Apoptosis Inducida por el Inhibidor del Proteasoma Ixazomib en Células de Mieloma Humano*” ha sido realizado por **MANUEL BELTRÁN VISIEDO** en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Máster y que cumple los objetivos recogidos en las Directrices de TFM del Máster Universitario en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Junio 2018

Firmado:

Firmado:

Director

Director

Isabel Marzo Rubio

José Javier Naval Iraberri

Agradecimientos

A través de estas líneas me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han contribuido de manera directa o indirecta a la realización del presente Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, agradecer a mis directores la Dr. Isabel Marzo y el Dr. Javier Naval por permitirme trabajar en este magnífico grupo y por todo lo que he aprendido con ellos (y de ellos) durante estos meses. Gracias por todas las indicaciones, la ayuda y el apoyo ofrecido. Esperemos que esto no sea un punto y final, sino un punto y seguido.

También quiero agradecer la ayuda de Alfonso y Nelia, su esfuerzo, interés y sobretodo paciencia (¡Sí, paciencia! U os recuerdo las veces que os he preguntado dónde está algún anticuerpo o cómo funciona tal equipo). Siempre han estado ahí para apoyarme, resolver cualquier duda y, gran parte del mérito de este trabajo es también suyo. Con personas así es inevitable que la ciencia avance hacia un futuro prometedor.

Asimismo, también quiero dar las gracias a todos los compañeros del grupo “*Apoptosis, Inmunidad y Cáncer*” por ofrecerme su constante apoyo, crear un ambiente de trabajo perfecto y acogerme de manera inmejorable. Espero más *Thanksgiving Days* en casa de Chantal, o barbacoas en La Muela.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos por creer en mí desde el principio y por aguantarme durante estos 5 años de universidad. Reconozco que no ha sido fácil. A todos: ¡Gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Mieloma Múltiple	2
1.1.1. Características generales y epidemiología	2
1.1.2. Estadios del Mieloma Múltiple	2
1.1.3. Microambiente medular en el Mieloma Múltiple	3
1.1.4. Alteraciones genéticas en Mieloma Múltiple	4
1.1.5. Tratamientos actuales	5
1.2. Muerte Celular	5
1.2.1. Muerte celular programada o apoptosis	6
1.2.2. Efectores intracelulares del proceso apoptótico	8
1.2.2.1. Familia de proteínas Bcl-2	8
1.2.2.2. Familia de las caspasas	9
1.2.2.3. Reguladores de la actividad de las caspasas	10
1.2.3. Vía intrínseca	11
1.2.4. Vía extrínseca	11
1.3. El Proteasoma	12
1.3.1. Características generales	12
1.3.2. Estructura y subunidades	13
1.3.3. Proteasoma y cáncer	14
1.4. Inhibidores del Proteasoma	15
1.4.1. Bortezomib	15
1.4.2. Carfilzomib	15
1.4.3. Ixazomib	16
1.5. Autofagia	17
1.5.1. Cloroquina	19
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Cultivos Celulares	21
3.1.1. Materiales y medios de cultivo celulares	21
3.1.2. Líneas celulares	22
3.1.3. Mantenimiento de los cultivos	22
3.1.4. Evaluación de la densidad y viabilidad de los cultivos celulares	22
3.1.5. Congelación y descongelación de los cultivos celulares	23
3.2. Estudio de la Proliferación y Apoptosis Celular	23
3.2.1. Determinación de la proliferación celular	23
3.2.2. Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V	24
3.3. Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo	25
3.4. Análisis de la Expresión de Proteínas Implicadas en la Muerte por Ixazomib	26
3.4.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western-blot	26

3.4.1.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares.....	26
3.4.1.2. Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF.....	27
3.4.1.3. Análisis de proteínas por Western-blotting y detección de inmunocomplejos.....	28
3.4.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo.....	29
3.4.2.1. Determinación de caspasa 3 activa mediante citometría de flujo.....	30
3.4.2.2. Determinación de los niveles de expresión de PUMA y Noxa mediante citometría de flujo.....	30
3.5. Análisis estadístico.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Ixazomib induce Apoptosis en Células de Mieloma Múltiple Humanas.....	32
4.2. Análisis del Efecto de Ixazomib en el Ciclo Celular.....	35
4.3. Efecto del Ixazomib en los Niveles de Procaspa 3.....	37
4.4. Participación de las Proteínas de la Familia Bcl-2 en la Muerte Inducida por Ixazomib.....	41
4.4.1. Análisis de proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma U266.....	42
4.4.2. Análisis de proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma MM.1S.....	46
4.4.3. Análisis de las proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma NCI-H929.....	48
4.5. Análisis de Efectos Sinérgicos entre Ixazomib y otros Fármacos.....	51
4.5.1. Estudio del posible efecto sinérgico entre Ixazomib e inhibidores de VCP/p97 (DBeQ y CB-5083).....	51
4.5.2. Estudio del posible efecto sinérgico entre Ixazomib y cloroquina.....	53
4.5.2.1. Análisis de la sensibilidad a Ixazomib de la línea MM.1S silenciada en el gen <i>ATG5</i> (shAtg5 MM.1S).....	54
5. CONCLUSIONES.....	56
6. BIBLIOGRAFÍA.....	58

ANEXOS

Listado de Abreviaturas

7-AAD: 7-aminoactinomicina D	EMA: Agencia Europea del Medicamento
AAA: Familia de ATPasas asociadas a diversas actividades celulares	ER: Retículo endoplásmico
ABB: Buffer de unión a Anexina V	FADD: Dominio de muerte asociado a Fas
AIF: Factor de inducción de apoptosis mitocondrial	FDA: Administración de alimentos y drogas
Apaf-1: Proteasa activadora del factor 1	FGFR3: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3
APC: Aloficocianina	FITC: Isotiocianato de fluoresceína
ASCT: Trasplante autólogo de células madre	GFP: Proteína fluorescente verde
Atg: Genes precursores de autofagia	GMSI o MGUS: Gammapatía benigna de significado incierto
ATP: Adenosín trifosfato	IAPs: Inhibidores de apoptosis
BCA: Ácido bicinconínico	IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%
BH: Dominio de homología a Bcl-2	Ig: Inmunoglobulinas
BIR: Repetición IAP de baculovirus	IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas
CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas	IL-6: Interleuquina 6
CAM-DR: Resistencia a fármacos mediada por adhesión celular	IMiDs: Inmunomoduladores
Cdk_i: Inhibidores de ciclinas quinasas	INrf2: Inhibidor del factor 2 relacionado con NF-E2
c-FLIP: Inhibidor celular proteico de FLICE	mETC: Cadena de transporte electrónico mitocondrial
CP: Región catalítica del proteasoma	MFI: Intensidad media de fluorescencia
Crio-EM: Criomicroscopía electrónica	MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad I
DcR: Receptores tipo señuelo	miR: Micro RNA
DD: Dominio mortal	MM: Mieloma múltiple
DED: Dominio efector de muerte	MTT: [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
DISC: Complejo señalizador de muerte inducida	OMM: Membrana externa mitocondrial

PBS: *Tampón fosfato salino*

PCD: *Muerte celular programada*

PCL: *Leucemia de células plasmáticas*

PE: *Ficoeritrina*

PUMA: *p53 modulador de apoptosis*

PS: *Fosfatidilserina*

PVDF: *Polifluoruro de vinilideno*

ROS: *Radicales libres de oxígeno*

RP: *Región reguladora del proteasoma*

SD: *Desviación estándar*

SFB: *Suero fetal bovino*

$t_{1/2}^{off}$: *Tiempo medio de unión al proteasoma*

TFs: *Factores de transcripción*

TNF- α : *Factor de necrosis tumoral α*

TNFR: *Receptor del factor de necrosis tumoral*

TRADD: *Dominio mortal asociado al receptor de TNF*

TRAIL: *Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF*

TRAILR: *Receptor de TRAIL*

UPR: *Respuesta a proteínas desplegadas*

VCP: *Proteína que contiene valosina*

VPS34: *Proteína vacuolar 34*

XIAP: *Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X*

zVAD: *Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona*

Listado de Figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Desarrollo del Mieloma Múltiple.....	3
Figura 2. Proceso de inducción de apoptosis.....	7
Figura 3. Familia de proteínas Bcl-2.....	9
Figura 4. Estructura del proteasoma.....	13
Figura 5. Inhibidores del proteasoma.....	17
Figura 6. Esquema representativo del proceso autofágico.....	18
Figura 7. Estructura química de la cloroquina.....	19
Figura 8. Evaluación del efecto de Ixazomib sobre la viabilidad celular en líneas de Mieloma Múltiple	32
Figura 9. Análisis de la apoptosis inducida por Ixazomib en líneas de Mieloma Múltiple humano.....	33
Figura 10. Análisis mediante estudio tipo <i>time-course</i> de la inducción de apoptosis en células de Mieloma Múltiple humano.....	34
Figura 11. Análisis del ciclo celular de células de Mieloma Múltiple después del tratamiento con Ixazomib.....	36
Figura 12. Efecto del Ixazomib en los niveles de procaspasa 3.....	37
Figura 13. Análisis de la activación de caspasa 3.....	38
Figura 14. Análisis de la activación de caspasa 3 en la línea U266.....	39
Figuras 15. Análisis de activación de la caspasa 3 en presencia o ausencia de zVAD	40
Figuras 16-19. Efecto de Ixazomib en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2	43-50
Figura 20. Análisis de la apoptosis inducida por CB-5083 en líneas de Mieloma Múltiple humano	52
Figura 21. Efecto de la combinación de Ixazomib y DBE-Q.....	52
Figura 22. Efecto de la combinación de Ixazomib y CB-5083.....	52
Figura 23. Efecto de la combinación de Ixazomib y cloroquina.....	54
Figura 24. Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con Ixazomib de la línea MM.1S <i>wild-type</i> y la línea shAtg5 MM.1S.....	55
Figura 25. Análisis de la apoptosis inducida por Ixazomib en células MM.1S <i>wild-type</i> y shAtg5 MM.1S.....	56

Resumen

El mieloma múltiple humano es una neoplasia hematológica caracterizada por una proliferación maligna de células B plasmáticas productoras de ingentes cantidades de anticuerpos, procedentes de un solo clon y cuya expansión tiene lugar en la médula ósea. A pesar de los avances realizados en la terapia frente a esta patología, continúa siendo una enfermedad incurable. El estudio del mecanismo de acción de nuevos fármacos introducidos para el tratamiento del mieloma múltiple podría aportar información útil en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. El presente trabajo aborda el análisis de las vías de muerte celular implicadas en la acción del inhibidor del proteasoma Ixazomib, recientemente aprobado por la FDA y la EMA. En concreto, se ha comprobado la capacidad de Ixazomib de inducir muerte celular de manera dosis-dependiente en diversas líneas de mieloma múltiple, así como su efecto sobre el ciclo celular provocando, en la mayoría de las líneas celulares estudiadas, una parada en las fases G2/M. Además, ha quedado demostrada la activación de caspasa 3, principal caspasa ejecutora, en células tratadas con Ixazomib y la variación en los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, lo cual podría indicar su directa implicación en el mecanismo de muerte celular desarrollado por éste. En paralelo, se ha descartado la posible sinergia entre Ixazomib e inhibidores de VCP/p97 (DBeQ y CB-5083) pero ha quedado constatada una clara sinergia entre Ixazomib y cloroquina que, en un futuro, podría constituir una nueva estrategia terapéutica de combinación frente al mieloma múltiple.

Abstract

Human multiple myeloma is an hematological neoplasia characterized by a malignant proliferation of plasma B cells that produce enormous amounts of antibodies, they come from a single clon and their expansion takes place in the bone marrow. Despite the therapy's advances against this pathology, it continues being an incurable disease. Studying the mechanism of action of new anti multiple myeloma drugs should provide useful information in the search for new therapies. The present work deals with the analysis of the causes involved in the death caused by the proteasome inhibitor Ixazomib, recently approved by the FDA and EMA. In particular, the ability of Ixazomib to induce cell death in a dose-dependent manner in several lines of multiple myeloma has been proved, as well as its effects on the cell cycle causing, in most of the cell lines studied, a stop in phases G2/M. In addition, the activation of caspase 3, main executing caspase, has been demonstrated in cells treated with Ixazomib. Moreover, treatment with Ixazomib induced protein expression changes of the main Bcl-2 family members, suggesting their possible involvement in the mechanism of apoptosis induced by Ixazomib. At the same time, the possible synergy between Ixazomib and VCP/p97 inhibitors (DBeQ and CB-5083) has been ruled out. However, a clear synergy between Ixazomib and chloroquine has been established. In the future, it could constitute a new therapeutic strategy against multiple myeloma.

1. Introducción

1.1. Mieloma Múltiple

1.1.1. Características generales y epidemiología

El **mieloma múltiple** (MM), también conocido como enfermedad de Kahler, es un tipo de cáncer hematológico en el que se produce la **proliferación maligna de células B plasmáticas** [1-2]. Se caracteriza por la expansión clonal y la posterior acumulación latente de células plasmáticas malignas con bajo índice proliferativo y un ciclo de vida extenso [3].

Inicialmente, las células B malignas se acumulan en la **médula ósea** originando situaciones patológicas entre las que destacan: **anemia, trombocitopenia y neutropenia** [4]. Posteriormente, y debido a su acumulación progresiva, se produce la destrucción del hueso generando dolor, hipercalcemia y parálisis. Otras características clínicas que evidencian la progresión del MM pueden ser pancitopenia, hiperproteíнемia e inmunodeficiencia [1]. En algunos casos, las células B plasmáticas malignas son capaces de generar de manera continua y elevada un tipo de **inmunoglobulina** (Ig) **específica** denominada **proteína M** [5]. La presencia de esta proteína monoclonal puede llegar a ser la responsable de ocasionar daños en órganos debido a **(I)** su acumulación o paso por los mismos, **(II)** desarrollar actividad autoinmune [5].

La exposición a radiaciones ionizantes, así como a contaminantes ambientales (herbicidas, pesticidas y dioxinas) y una estimulación antigénica crónica, han sido propuestos como factores etiológicos que desencadenan el desarrollo de la enfermedad [1], sin embargo, éstos no están del todo claros y, todo parece indicar que, aparte de los anteriormente mencionados, existen **otros desencadenantes todavía desconocidos** [1,5]. El MM es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, después del linfoma de no Hodgkin. Constituye, aproximadamente, el 10% del total de neoplasias hematológicas, y el 1,8% de todos los cánceres de manera global [6]. Se estima que más de una cuarta parte del total de pacientes pueden vivir más de 10 años desde el comienzo de desarrollo de la enfermedad y dicha fracción va en aumento gracias a las aproximaciones terapéuticas que se están desarrollando actualmente [7].

1.1.2. Estadios del Mieloma Múltiple

El desarrollo del MM tiene varias etapas diferenciadas (**Figura 1**). Inicialmente, se produce un **aumento en un número limitado de clones de células B plasmáticas**. Se trata de un estado premaligno y recibe el nombre de **gammapatía monoclonal benigna de significado incierto** (GMSI o MGUS) que a su vez es responsable de la aparición de entre el 30-50% de los MM malignos [1]. En esta fase las

células son tumorales, pero no proliferan. Además, este estadio no conlleva síntomas ni daño para el paciente y solo es detectable por el incremento de proteína M en suero y orina [1].

A partir del estadio de MGUS aparece otra etapa denominada **MM latente** (*smouldering MM*) donde un pequeño porcentaje de las células tumorales (alrededor del 1%) empiezan a proliferar. Finalmente, cuando las células ya se acumulan en el interior de la médula ósea, es cuando surge el MM propiamente dicho. En este estadio las células reciben el nombre de **mielomasas**, y, entre otras características, se encargan de estimular la actividad de los osteoclastos e inhibir de la de los osteoblastos, produciendo así una degradación continua del tejido óseo [1-2]. En algunos pacientes, las células mielomasas pueden adquirir la **capacidad de extravasación** y crecer en regiones extramedulares (p. piel, sangre o líquido pleural). Si esto ocurre, la enfermedad pasa a llamarse **leucemia de células plasmáticas** (PCL) [1].

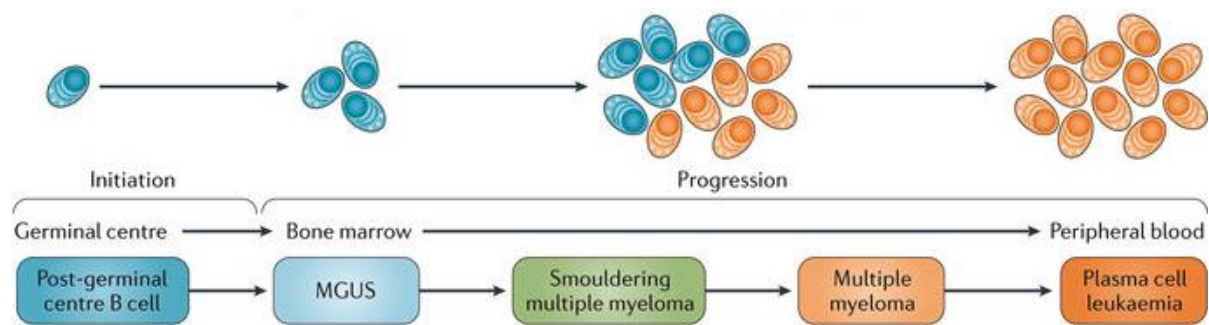


Figura 1. Desarrollo del MM. El desarrollo del MM es un proceso dividido en varias etapas: generalmente deriva de situaciones patológicas precursoras (p. MGUS) y progresa hacia el desarrollo de enfermedades independientes de la médula ósea (p. PCL). Imagen adaptada de Kumar et al., *Nature Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, pp. 1–20, 2017. [1]

1.1.3. Microambiente medular en el Mieloma Múltiple

Las **células del MM** establecen una **gran cantidad de interacciones con la médula ósea** [2]. Concretamente, estas interacciones tienen lugar tanto con proteínas de la matriz extracelular, células del estroma, osteoclastos, osteoblastos y células del sistema inmunitario circundantes. Dichas interacciones permiten, entre otras cosas, la proliferación de las células tumorales, la migración de éstas y son esenciales para el mantenimiento del tumor [8]. Además, la adhesión de las células de MM a proteínas de la matriz extracelular favorece la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, así como proteínas anti-apoptóticas [2]. Este tipo de interacciones poseen un papel principal en la resistencia a fármacos denominada “**resistencia a fármacos mediada por adhesión celular**” (CAM-DR: *Cell Adhesion Mediated Drug Resistance*) [8-9].

1.1.4. Alteraciones genéticas en Mieloma Múltiple

El origen patológico que desencadena el desarrollo de MM no está del todo claro, sin embargo, y principalmente gracias a la investigación básica, se sabe que una de las características principales que presenta el MM son **alteraciones citogenéticas** tales como variación en el número de cromosomas y en la estructura de los mismos [3].

En el MM suelen producirse reordenamientos cromosómicos que dan lugar a anormalidades cromosómicas estructurales, siendo una de las más habituales la que se produce en el **locus de la cadena pesada de las Ig** (IgH) localizado en 14q32. Generalmente, en dicho segmento se producen translocaciones entre las que destacan t(11;14)(q13;32), t(4;14)(p16;q32) y t(14;16)(q32;23) [3]. Además, se sabe que **su incidencia es mayor cuanto más agresivo es el tumor**, es decir, prevalece en la fase extramedular. La primera de las translocaciones afecta a la **ciclina D1** que regula la entrada en el ciclo celular, y cuya duración se encuentra alterada en MM [1]. La segunda de ellas, afecta al **receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos** (FGFR3: *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*) provocando su desregulación. Por último, la translocación t(14;16)(q32;23) provoca la sobreexpresión del **oncogen c-maf** y puede observarse en alrededor de un 25% de los MM diagnosticados [3]. El **oncogen c-maf** pertenece a la familia de factores de transcripción (TFs) asociados a estructuras de unión a DNA denominadas **cremallera de leucina**, al igual que fos, jun y proteínas maf pequeñas. Generalmente este tipo de proteínas forman heterodímeros y están involucradas en procesos celulares básicos como la proliferación celular y la diferenciación en respuesta a la interleuquina 6 (IL-6) [3], de la que dependen la mayoría de los MM para su crecimiento y supervivencia [1–3].

Teniendo en cuenta que **las alteraciones cromosómicas aumentan con la progresión de la enfermedad**, todo parece indicar que la transición de MGUS a MM, y finalmente a PCL, requiere de mutaciones adicionales que permitan a las células proliferar y sobrevivir fuera del nicho que les proporciona la médula ósea. En este sentido destacan las mutaciones en proteínas Bcl-2 y Bcl-XL, proteínas antiapoptóticas, situadas en la membrana mitocondrial externa (OMM: *Outer Mitochondrial Membrane*) y cuya función está relacionada con la supervivencia celular [2]. Concretamente, aparte de las mutaciones existen otros mecanismos por los cuales se favorece la sobreexpresión de la proteína Bcl-2: **(I) translocación cromosómica** que sitúa el gen *BCL2* cerca de las regiones potenciadoras de la IgH, **(II) deleciones cromosómicas** que conllevan la **pérdida de algunos microRNAs** (miR) reguladores de la proteína Bcl-2, como es el caso del miR-15a y el miR-16 los cuales de manera fisiológica *downregulan* la expresión de Bcl-2 uniéndose a su correspondiente mRNA, y, por último **(III) mutaciones inactivantes** en el inhibidor relacionado de NF-E2 factor 2 (INrf2: *Inhibitor of NF-E2-related factor 2*) que interactúa con el dominio BH2 de Bcl-2, y la dirige a la ubiquitinación mediada por Cul3-Rbx1 provocando su posterior degradación; en consecuencia, todas estas alteraciones

provocan una estabilización de Bcl-2 que confiere resistencia a las células frente a estímulos apoptóticos [10]. También se han descrito mutaciones en la proteína G pequeña Ras; se trata de una proteína con 3 isoformas: K-Ras, N-Ras y H-Ras, y cuyo papel es la de actuar como agente regulador en multitud de procesos biológicos [3]. Suele ser estimulada por receptores con actividad tirosín-quinasa activados por factores de crecimiento o citoquinas como la anteriormente mencionada IL-6. El 39% de las mutaciones se producen en la isoforma N-Ras y facilita la independencia de IL-6 por parte de las células favoreciendo así su salida de la médula ósea [3].

1.1.5. Tratamientos actuales

Hoy en día los tratamientos utilizados para combatir el MM tienen como objetivo fundamental **frenar la progresión y mejorar la calidad de vida de los pacientes**, ya que ninguno de ellos cura la enfermedad totalmente [1]. Aun así, se suelen generar **resistencias** a la mayoría de los fármacos existentes por lo que la media de supervivencia tras el diagnóstico es de 5-7 años [1]. Durante muchos años se utilizaron los agentes quimioterapéuticos **melfalán** y **prednisona** como tratamiento estándar para el MM (de hecho, aún se utilizan para pacientes con edad avanzada) junto con el **trasplante autólogo de células madre** (ASCT) reservado a pacientes jóvenes y con buen pronóstico [1-2,5].

Sin embargo, el tratamiento del MM ha mejorado en los últimos años gracias a compuestos más específicos contra las células tumorales y cuyos efectos secundarios son menores. Su uso se centra principalmente en pacientes que ya no responden a la administración de los fármacos clásicos. Se pueden destacar dos grandes grupos: **inmunomoduladores** (IMiDs) e **inhibidores del proteasoma** (PIs: *Proteasome Inhibitors*) [1].

Los IMiDs (derivados en su mayoría de la talidomida como la pomalidomida y la lenalidomida) poseen propiedades antiproliferativas, anti-inflamatorias y antiangiogénicas, además también **estimulan el sistema inmunitario** (células NK y células T) y **disminuyen la producción de citoquinas** implicadas en la supervivencia celular. En cuanto a los PIs, se explicarán posteriormente.

1.2. Muerte Celular

Se trata de un **proceso fisiológico esencial en organismos eucariotas**, necesario para el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos [11]. Generalmente ocurre cuando una célula ha sido dañada, infectada por algún tipo de agente externo, o ha dejado de cumplir su función y ya no es útil para la comunidad. En un organismo pluricelular debe existir un constante **equilibrio entre muerte y proliferación celular** ya que la ruptura de dicho equilibrio puede ser responsable de la aparición de

diversas patologías: un incremento de la muerte celular puede derivar en enfermedades de tipo degenerativo mientras que un aumento de la proliferación puede conllevar la aparición de cáncer [11].

En un principio se pensaba que las células morían por senescencia o destrucción, proceso conocido como **necrosis**. Después se comprobó que durante el desarrollo embrionario ocurría otro tipo de muerte de células aparentemente sanas, que, además, no presentaban efectos típicos de la muerte necrótica y cuyos cadáveres desaparecían. A este tipo de muerte se le denominó **apoptosis o muerte celular programada** (PCD: *Programmed Cell Death*). La **proteólisis** es el principal tipo de reacción bioquímica que tiene lugar durante la apoptosis y es de carácter irreversible.

1.2.1. Muerte celular programada o apoptosis

El término apoptosis procede del griego clásico *αποπτωση* y significa desprendimiento de las hojas del árbol durante el otoño. Dicho término fue sugerido por James Cormack a Kerr y Wyllie en 1972 [12] y lo aplicaron al proceso de eliminación de células por parte de los tejidos para la supervivencia del organismo. La apoptosis puede iniciarse en **respuesta a diversos estímulos**: radiaciones, ausencia de factores de crecimiento, presencia de radicales libres de oxígeno (*ROS*), fármacos antitumorales o daños en el DNA [11].

La célula apoptótica sufre una serie de **cambios morfológicos** que definen el proceso. En primer lugar, los contactos intercelulares disminuyen a la par que lo hace la adhesión celular. A continuación, se producen **cambios a nivel de la membrana plasmática**, que inicialmente se mantiene íntegra, produciéndose una redistribución de los fosfolípidos que la constituyen; concretamente, se produce la translocación de **fosfatidilserina** (PS) de la hemicapa interna a la externa, quedando expuesta en la superficie celular [11]. Además, la célula se va redondeando a la vez que se retraen los pseudópodos, la cromatina se condensa (**piconosis**) adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, el DNA es fragmentado, **las proteínas del citoesqueleto** se desensamblan y la **función mitocondrial** se reduce [11]. La membrana permanece íntegra hasta las últimas etapas, momento en el que se produce la formación de burbujas (**blebbing**) y la consiguiente formación de los cuerpos apoptóticos [11]. La translocación de PS es una señal quimiotáctica que hace que las células fagocíticas eliminen los cuerpos apoptóticos generados, imposibilitando así la liberación de señales pro-inflamatorias.

La apoptosis puede iniciarse por dos vías de señalización principalmente (**Figura 2**):

- **Vía intrínseca o mitocondrial**: la mitocondria es el principal orgánulo implicado en esta ruta apoptótica [13]. Se desencadena en respuesta a una amplia variedad de estímulos

generados en la propia célula. En este sentido destaca el daño a nivel de DNA, niveles altos de ROS, infecciones virales, etc

- **Vía extrínseca o de los receptores mortales:** vía apoptótica mediada por la unión de ligandos mortales, como Apo2L/TRAIL, FasL o TNF- α , a sus receptores mortales correspondientes situados en la membrana plasmática, como por ejemplo TRAILR, Fas o TNFR, respectivamente [14].

Ambas rutas convergen en la activación de enzimas proteolíticas denominadas **casapas** (Cisteinil – Aspartato Proteasas) que desencadenarán el dismantelamiento de la estructura y las proteínas celulares.

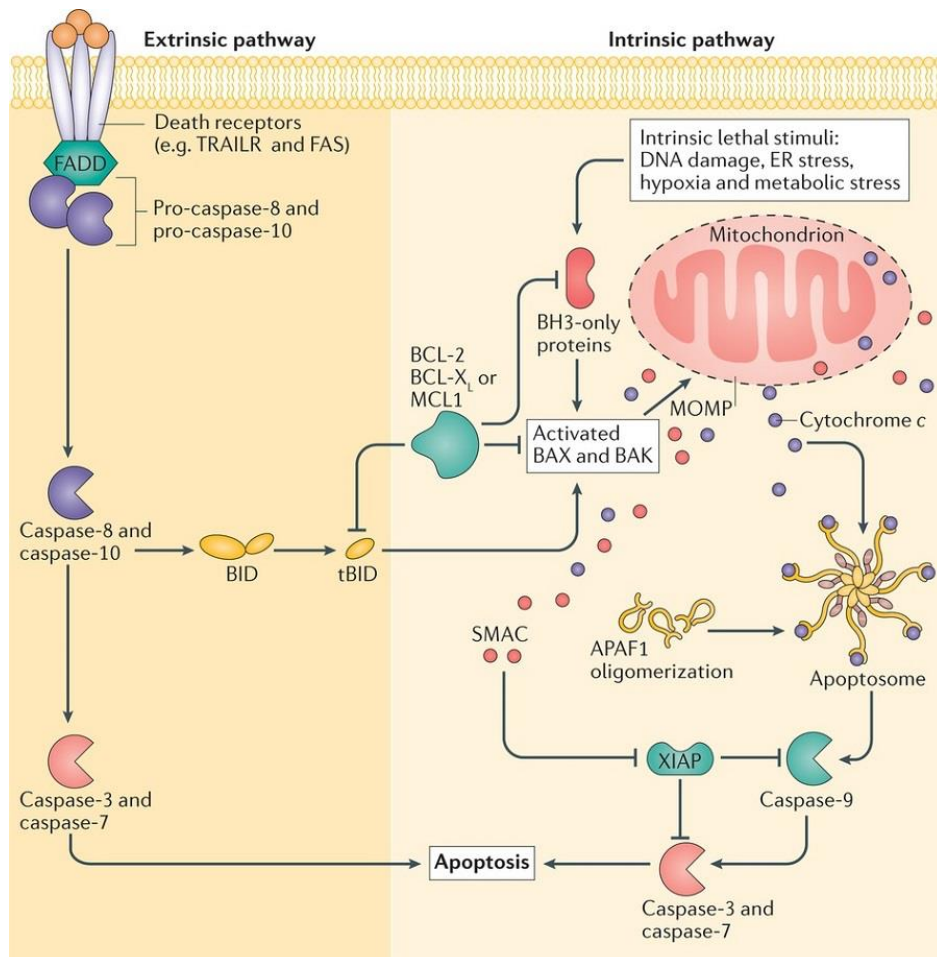


Figura 2. Proceso de inducción de apoptosis. Representación esquemática de las vías intrínseca y extrínseca de inducción del proceso apoptótico. En la vía extrínseca la unión de los ligandos mortales (Apo2L/TRAIL, FasL) a sus receptores correspondientes es capaz de activar las caspasas iniciadoras (casapas -8 y -10) a través de la dimerización de éstas y gracias al adaptador FADD. La vía intrínseca requiere de la permeabilización de la OMM proceso regulado por las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2. Imagen adaptada de Ichim and W. G. Tait, *Nature Rev. Cancer*, vol. 16, no. 8, pp. 539–548, 2016. [11]

1.2.2. Efectores intracelulares del proceso apoptótico

La apoptosis es un **proceso regulado** por la interacción de multitud de proteínas, entre las que se distinguen dos grupos o familias de proteínas ampliamente estudiados: las **proteínas de la familia Bcl-2** (divididas a su vez en proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas, anti-apoptóticas y “solo-BH3”) y las caspasas [15].

1.2.2.1. Familia de proteínas Bcl-2

Esta familia de proteínas adopta un papel clave en la inducción de **apoptosis mediante la vía intrínseca**. Sin embargo, también participan en otros procesos como tumorigénesis y respuesta celular a la terapia antitumoral. Presentan entre uno y cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH: *Bcl-2 Homology*) denominados BH1, BH2, BH3 y BH4 (*Figura 3*). En función de cómo afectan las proteínas al proceso de muerte celular pueden clasificarse en: **proteínas anti-apoptóticas** (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-B) con cuatro dominios BH (BH1-BH4), excepto Mcl-1 que carece del dominio BH4 [15]; **proteínas pro-apoptóticas multidominio** (Bax y Bak) en las que se pueden encontrar dominios BH1, BH2 y BH3; y, por último, **proteínas “sólo-BH3”** (Bid, Bad, PUMA (PUMA: *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*), Noxa, Bmf, Hrk y Bik) [15-16].

Los dominios BH1, BH2 y BH3 de las **proteínas anti-apoptóticas** conforman una cavidad hidrofóbica que facilita la interacción con proteínas de tipo sólo-BH3 [17]. Además, este tipo de proteínas presentan un dominio hidrofóbico en su región carboxi-terminal que facilita su anclaje a la región citoplásmica de tres membranas diferentes [17]: **(I)** membranas mitocondriales, **(II)** la membrana nuclear y **(III)** la membrana del retículo endoplásmico (ER). La sobreexpresión de este tipo de proteínas protege a las células de una gran variedad de estímulos pro-apoptóticos.

Las **proteínas pro-apoptóticas multidominio** están presentes en la mayoría de los tejidos. De manera basal, este tipo de proteínas se encuentran en forma de monómeros inactivos: Bax en el citosol y Bak asociada a la OMM. Durante el proceso apoptótico, ambas proteínas se activan y Bax es traslocada a la OMM, donde, junto a Bak, experimentan cambios conformacionales que permiten su consiguiente oligomerización [11,13]. Esta oligomerización promueve la formación de poros en la mitocondria, indispensables para la inducción de apoptosis a través de la vía intrínseca [11].

Por su parte, las **proteínas “sólo-BH3”** están constituidas únicamente por dominios BH3. Éste es necesario y suficiente para la inducción de apoptosis [15]. Presentan un gran interés como sensores del estrés celular y su activación constituye la primera diana del daño mitocondrial. Pueden clasificarse según se unan solo a **proteínas anti-apoptóticas** (Bad) [16] o si **se asocian tanto con proteínas anti-apoptóticas como pro-apoptóticas** (Bid, Bim, PUMA, Noxa) [16]. Este tipo de proteínas “sólo-BH3”

están muy reguladas tanto a nivel transcripcional (PUMA, Noxa) como a nivel post-transcripcional (Bad, Bim) [16].

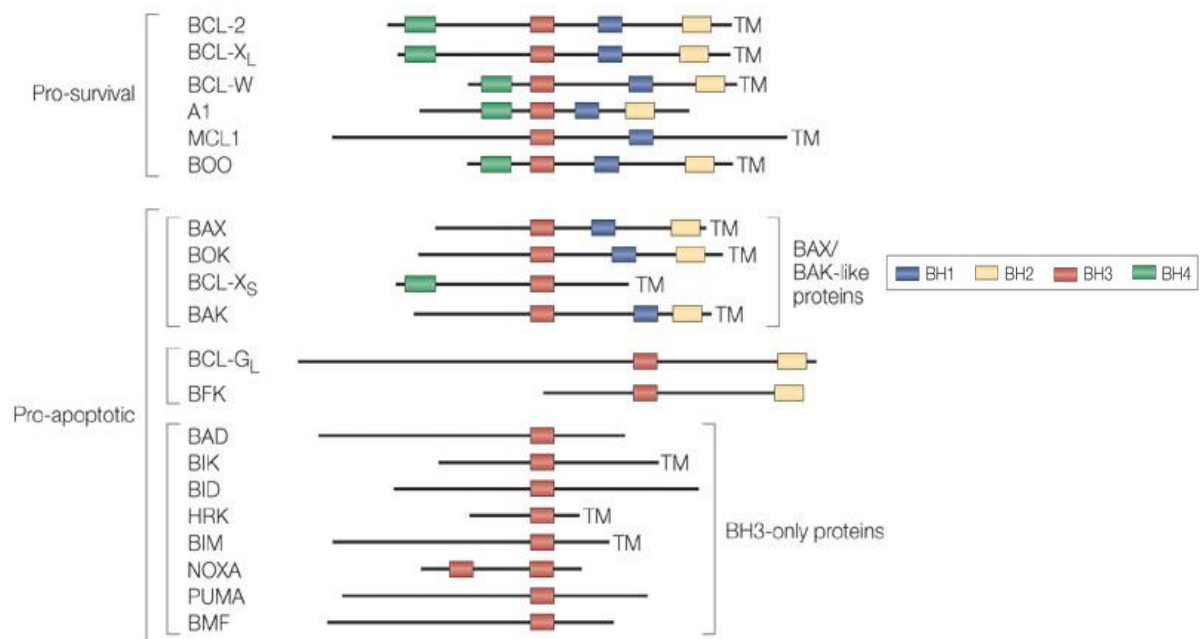


Figura 3. Familia Bcl-2. Proteínas de mamífero pertenecientes a la familia Bcl-2. Aparecen clasificadas según su acción pro o anti-apoptótica. Además, se representan los dominios BH existentes en cada una de ellas. Imagen adaptada de Strasser et al., *Nature Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 189–200, 2005. [15]

1.2.2.2. Familia de las caspasas

Son una familia de proteínas que contienen en la estructura de su centro activo un residuo nucleofílico de cisteína que participa en la ruptura proteolítica de motivos que contienen residuos de ácido aspártico [18-19]. La familia de caspasas está compuesta por 15 miembros que a su vez se pueden clasificar en dos subfamilias: **caspasas del grupo I** (caspasa-1, -4, -5, -11 y -15) involucradas en procesos inflamatorios y en el procesamiento de citoquinas; el resto de caspasas están implicadas en el proceso de apoptosis y conforman la otra gran subfamilia. Ésta se puede dividir a su vez en **caspasas iniciadoras o del grupo II** (caspasa-2, -8, -9 y -10) y en **caspasas ejecutoras o del grupo III** (caspasa-3, -6 y -7) [18].

Inicialmente las caspasas se sintetizan como **zimógenos** [19], es decir, a modo de proenzimas inactivas que se localizan en el citoplasma y reciben el nombre de pro-caspasas. Su activación se lleva a cabo mediante proteólisis limitada [19] y asociación de subunidades, fenómeno que les permite adquirir su capacidad catalítica para degradar sustratos diana. Las pro-caspasas poseen 3 dominios diferenciados: el **pro-dominio amino terminal**, una subunidad grande de aproximadamente 20 kDa (p20) y donde se sitúa el **centro activo** de la caspasa, y otra región más pequeña de unos 10 kDa (p10)

en la **parte carboxi-terminal**. El prodominio está implicado en la regulación de la activación de las caspasas [19] y tiene una longitud variable. Cabe destacar también la presencia de un prodominio largo con diferentes motivos reguladores [20-21], como el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD: *Caspasase Recruitment Domain*) en las caspasas iniciadoras. Concretamente, el dominio CARD puede encontrarse en las procaspasas -2 y -9 [21]. Por otro lado, destaca también el dominio efector de muerte (DED: *Death Effector Domain*) presente en las procaspasas -8 y -10 [20]. Ambos dominios son cruciales para la activación de las caspasas ya que median interacciones homo- y heterofilicas entre las caspasas y sus adaptadores [20].

Una vez se ha producido la activación de las caspasas, éstas **se agrupan en forma de tetrameros** de dos subunidades p10 en el interior y dos subunidades p20 en el exterior [18-19], generándose así dos centros activos por cada tetramero formado. La activación de las caspasas iniciadoras puede producirse tanto por oligomerización como por acción proteolítica y puede desencadenarse tras la activación de tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca. Por otro lado, la activación de caspasas ejecutoras solo puede producirse por acción de enzimas proteolíticas (caspasas iniciadoras o la propia acción de otras caspasas ejecutoras), granzima B, catepsina G o calpains [19].

1.2.2.3. Reguladores de la actividad de las caspasas

Además de la regulación vista hasta el momento, existen otros mecanismos [19] de gran interés en el que se ven involucradas una serie de moléculas:

- **IAPs** (*Inhibitors of Apoptosis*): proteínas celulares con capacidad de asociación al centro activo de las caspasas **(1)** inhibiendo su actividad o **(2)** estimulando su degradación. Por tanto, los IAPs están implicados en la regulación de la muerte celular, inmunidad, ciclo celular, inmunidad y migración [11]. Los IAPs se caracterizan por tener de uno a tres dominios de repetición IAP de baculovirus (BIR: *Baculoviral IAP Repeat*). Está compuesta por un total de 8 miembros: NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, survivina, Bruce, M1-IAP e ILP-2. Destaca XIAP (*X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein*) capaz de inhibir a las caspasas ejecutoras y a la caspasa 9 [11].
- **Proteínas c-FLIP** (*celular FLICE (FADD-like-IL-1 β -converting enzyme) – Inhibitory Proteins*): actúan a modo de inhibidor competitivo de la procaspasa-8 al competir por las proteínas intracelulares adaptadoras FADD (*Fas – Associated Death Domain*). La interacción evita la formación del complejo de señalización de muerte celular (*DISC: Death-Inducing Signaling Complex*) y la consiguiente activación de la cascada de caspasas [11,18].

1.2.3. Vía intrínseca

Conocida como **vía intrínseca** o **vía mitocondrial**, es una ruta de inducción de apoptosis principalmente regulada por proteínas de la familia Bcl-2 [18] (*Figura 2*). El orgánulo central implicado en esta vía es la mitocondria. Su activación se produce a partir de una gran variedad de estímulos apoptóticos: estrés celular, presencia de agentes oxidantes, radiaciones, fármacos, etc.

Las mitocondrias son orgánulos esenciales en la célula cuya principal función es la obtención de energía en forma de adenosin trifosfato (ATP). Están constituidas por una matriz rodeada por una membrana interna (donde se sitúan las ATP-sintasas), un espacio intermembrana y una membrana externa [22-23]. En condiciones fisiológicas, la **cadena de transporte electrónico mitocondrial** (mETC) situada en la membrana interna mitocondrial, genera un gradiente electroquímico o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) bombeando protones (H^+) desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial. Este potencial de membrana es, a su vez, responsable de la síntesis de ATP [22].

Además, en el espacio intermembrana se encuentran algunas proteínas de interés para la activación de la vía intrínseca: citocromo C, Endo G, Smac/Diablo y AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) [22,24]. Cuando la célula recibe algunos de los estímulos apoptóticos anteriormente mencionados se activan las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak que oligomerizan y forman poros en la OMM [11], [13]. La formación de estos poros facilita la salida de proteínas pro-apoptóticas al citosol, así como una caída del $\Delta\Psi_m$. El citocromo C una vez se sitúa en el citosol se une a la proteína adaptadora Apaf-1 (*Apoptosis Protease – Activating Factor 1*) que oligomeriza y recluta a la procaspasa-9 [11]. Todo este complejo proteico recibe el nombre de **apoptosoma** [18]. Concretamente, el apoptosoma está formado por 7 moléculas de citocromo C, 7 moléculas de Apaf-1, cada una de las cuales posee un dominio CARD que permite unir 7 moléculas de procaspasa-9 gracias a dicho dominio. La unión de la procaspasa-9 al apoptosoma favorece su activación sin necesidad de ser proteolizada. Una vez la caspasa-9 está activa, ésta proteoliza el prodominio de caspasas efectoras como la caspasa-3 que llevará a cabo el desmantelamiento de la célula.

1.2.4. Vía extrínseca

Esta segunda ruta de señalización del proceso apoptótico tiene su origen en la membrana plasmática de la célula, y no a nivel de mitocondria como ocurría con la vía intrínseca, a través de los conocidos como **receptores mortales** [18,25] (*Figura 2*). Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor TNF (TNFR: *TNF Receptor*). Los miembros pertenecientes a esta superfamilia poseen un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio mortal (DD: *Death Domain*) en su región citoplasmática que permite acoplar el receptor mortal al resto de la cadena

apoptótica situada en el interior celular [26]. Cabe destacar que, además de los receptores funcionales, en esta superfamilia también se pueden encontrar los conocidos como receptores tipo “señuelo” (DcR: *Decoy Receptors*) incapaces de inducir apoptosis [14,26].

La **unión de los ligandos a los receptores mortales induce la oligomerización de éstos** y el reclutamiento de varias proteínas entre las que destacan las proteínas intracelulares adaptadoras FADD o TRADD (*TNFR – Associated Death Domain*) que interactúan con los receptores a través de los dominios DD presentes en su estructura [26]. La proteína adaptadora FADD además posee dominios DED a través de los cuales se une a los prodominios de las caspasas iniciadoras 8 y 10 [18]. Toda esta estructura conforma el complejo DISC. El reclutamiento de las procaspasas iniciadoras por parte de FADD facilita que éstas se aproximen, lo que resulta en su proteólisis y consiguiente activación [19], [26]. Una vez que las caspasas iniciadoras se encuentran activas, éstas activan mediante proteólisis a las procaspasas ejecutoras 3 y 7, responsables de culminar el proceso de desmantelamiento celular asociado a la apoptosis.

1.3. El Proteasoma

1.3.1. Características generales

El principal sistema de degradación de proteínas en las células es el proteasoma [27]. Se estima que entre el 80-90% de las proteínas intracelulares son degradadas en el proteasoma siendo éstas degradadas a pequeños péptidos de 3-25 residuos. Concretamente, el proteasoma se trata de un **conjunto de proteasas altamente conservadas** y encargadas de eliminar de manera selectiva proteínas que no son necesarias para la célula en ese momento, así como proteínas mal plegadas o aberrantes actuando como agente responsable del control de calidad en las células. Las proteínas que van a ser degradadas en el proteasoma deben ser previamente marcadas con cadenas de poli-ubiquitina [28]. Este proceso de degradación asociado a poli-ubiquitina es el considerado como canónico y se conoce como **degradación proteica dependiente de ubiquitina**. Aparte de este mecanismo, existen evidencias de otros tipos de degradación proteica intracelulares: un tipo de degradación independiente de ubiquitina (degradación lisosomal), y, otro tipo de degradación que podría modular la función de las proteínas procesadas.

El **proteasoma 26S** está constituido por **dos núcleos proteolíticos (20S)** y una **región reguladora (19S)**; la región reguladora puede subdividirse a su vez en dos subunidades diferentes: 14S y 19S [27,29]. Constituyen el segundo complejo proteico más abundante en la célula y están en constante ensamblaje a partir de los precursores inactivos que lo constituyen [27]. El proteasoma media la degradación de la mayor parte de las proteínas de vida media y corta que controlan diversos procesos biológicos como el ciclo celular, la transcripción proteica, la reparación del DNA, etc. [27]. Cabe

destacar también que el proteasoma participa en la generación del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I: *Major Histocompatibility Complex I*) generando péptidos a partir de la ruptura de proteínas procedentes de patógenos intracelulares [30].

1.3.2. Estructura y subunidades

El proteasoma 26S (*Figura 4*) es un complejo proteico de 2,5 MDa constituido por dos subunidades: la región catalítica (CP o proteasoma 20S) y la región reguladora (RP, proteasoma 19S o PA700) [27,29]. Los dominios RP se unen a las regiones terminales de CP para formar la estructura RP1CP o RP2CP (dependiendo del número de subunidades reguladoras unidas). La subunidad CP está constituida por una serie de anillos proteicos apilados ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) que adoptan morfología de barril. Las **subunidades α** (α_1 - α_7) configuran las regiones más externas del barril, mientras que las **subunidades β** (β_1 - β_7) forman parte de la región interna del mismo [29,31]. Al contrario de lo que ocurre en organismos eucariotas, el proteasoma de organismos procariotas posee únicamente un tipo de subunidad α y un tipo de subunidad β . Tan solo se ha hallado un tipo de bacteria, *Rhodococcus*, cuyo proteasoma está constituido por dos subunidades α y dos β [31].

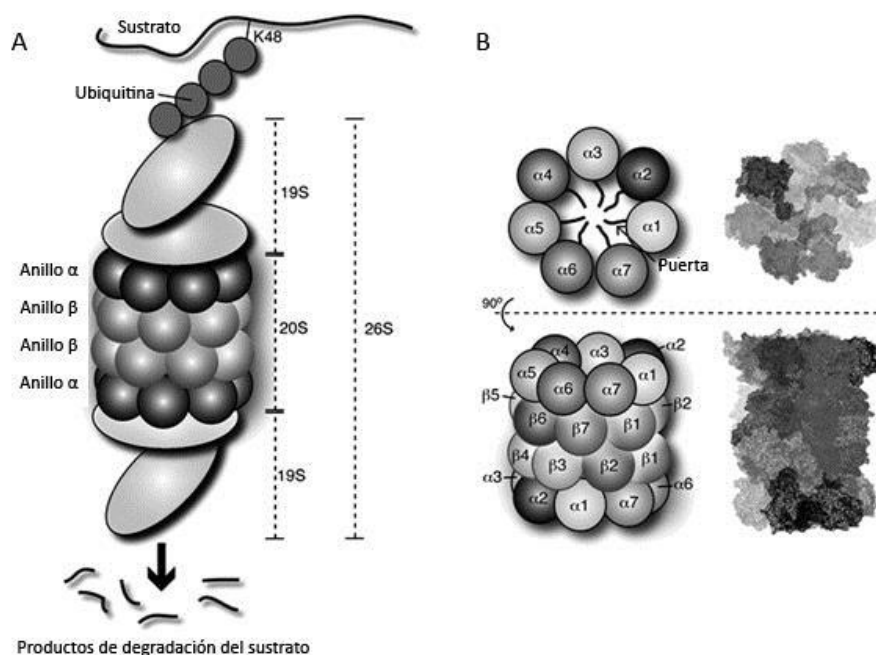


Figura 4. Estructura del proteasoma. (A) El proteasoma 26S consta de dos subunidades reguladoras 19S y un núcleo 20S catalítico y formado por cuatro anillos heptaméricos. Los sustratos ubiquitinados son reconocidos por la subunidad 19S y conducidos a la subunidad 20S donde son degradados. (B) Vista del anillo α en levaduras. Imagen adaptada de Ruschak et al. *J Nat Cancer Inst Rev.* vol. 103, no. 13, pp. 1007–1017, 2011. [29]

La subunidad CP posee 3 tipos diferentes de actividades catalíticas: **actividad quimotripsina, actividad tripsina y actividad caspasa**, las cuales tienen lugar en las subunidades β_5 , β_2 y β_1 respectivamente [4,27]. Se han resuelto las estructuras del proteasoma tanto en levaduras como en mamíferos y se ha comprobado la existencia de un pequeño poro en la parte central del anillo que conforman las subunidades α y β que constituiría la puerta de entrada de las proteínas al interior del proteasoma. Sin embargo, también es cierto que dicho poro permanece cerrado (debido a interacciones de las regiones N-terminal de las subunidades α_2 , α_3 y α_4) si la subunidad CP está aislada de la subunidad RP [27,31]. Por tanto, se plantea que en el proteasoma 26S la subunidad RP actúa como activador, facilitando la apertura del poro, ya que interacciona con las subunidades α implicadas en el cierre del mismo [27].

Las células del sistema inmunitario, expresan de manera constitutiva las subunidades β_5 , β_2 y β_1 en la subunidad CP. Sin embargo, cuando se desencadena una respuesta inmunitaria en el organismo, éstas son reemplazadas por otras subunidades cuya expresión es inducida: β_{5i} , β_{2i} y β_{1i} , dando lugar al conocido como **inmunoproteasoma** [30]. El inmunoproteasoma cuenta con una mayor actividad quimiotripsina y tripsina, ya que éstas están relacionadas favorablemente con el **procesamiento de antígenos** para su posterior exposición en el MHC-I.

En relación con la subunidad reguladora RP, no se ha conseguido obtener su estructura cristalizada, a diferencia de la subunidad CP, probablemente debido a su poca estabilidad o a la variabilidad que presenta en su composición [31]. La poca información que se tiene de esta región procede íntegramente de **estudios de crio-microscopía electrónica** (crio-EM) así como de ensayos bioquímicos. Se trata de un complejo con varias subunidades, que puede ser dividido a su vez en dos supercomplejos denominados “base” y “tapa”. La “base” consiste en un complejo de seis AAA+ ATP-*asas* (Rpt1-6) y tres subunidades no ATP-*asas* (Rpn1, Rpn2 y Rpn13). Por otro lado, la “tapa” está constituida únicamente por 9 subunidades de carácter no ATP-*asa* (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 y Rpn15/Sem1) [27]. La conexión existente entre la “base” y la “tapa” de la subunidad RP está estabilizada por la subunidad Rpn10 [27,31]. La falta de una estructura completa impide conocer con exactitud cómo se entrelazan estas subunidades entre sí, y cómo la subunidad RP estimula la apertura de la subunidad CP.

1.3.3. Proteasoma y cáncer

La degradación asociada al **sistema ubiquitina-proteasoma** es clave en el correcto funcionamiento celular ya que regula multitud de rutas moleculares [28]. Al contrario de lo que se pensaba anteriormente, el proteasoma no solo se centra en eliminar proteínas que estén mal plegadas, aberrantes, envejecidas o dañadas por oxidación, sino que éste también **regula la vida media de**

proteínas de vida media/corta tales como las ciclinas (implicadas en la regulación del ciclo celular) y reguladores de la transcripción [4]. El papel que adopta el proteasoma en la degradación de oncogenes, proteínas supresoras de tumores, moléculas señalizadoras y factores de transcripción hacen que su estudio sea de enorme interés en relación con el papel que éste desempeña en patologías tales como el cáncer [4,27]. Algunos ejemplos de proteínas cuya degradación tiene lugar en el proteasoma e implicadas en el proceso de carcinogénesis son las ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk_i: *Cycline-dependent kinase inhibitors*), AIF, Bcl-2, Mcl-1, Noxa, Bax, Bik, tBid, p53 (supresor de tumores), c-Fos, c-Jun, NFκB, etc. [4].

El **papel del proteasoma** en la fisiología celular también es importante en relación a la **progresión del ciclo celular**. Concretamente, el proteasoma regula las transiciones G1/S y G2/M ya que las Cdk_i p21 y p27 son degradadas por dicho orgánulo [27]. Además, se sabe que la inhibición del proteasoma detiene la proliferación celular e induce apoptosis en células de MM, ya que una característica de este tipo de células es la sobreproducción de Ig's [1,3]. Para que el correcto recambio proteico tenga lugar en las células de MM es necesario que el proteasoma degrade todas las Ig's sobreproducidas sin interés alguno, por lo que si se consigue bloquear la actividad del proteasoma responsable del recambio proteico generaría una situación de estrés celular que acabaría induciendo la apoptosis celular [7].

1.4. Inhibidores del Proteasoma

Dado que el proteasoma está involucrado en diversas rutas esenciales para el desarrollo, progreso y metástasis del cáncer, varios inhibidores del proteasoma se están evaluando en estudios pre-clínicos y en ensayos clínicos para distintos tipos de cáncer.

1.4.1. Bortezomib

Bortezomib (Velcade®) fue el primer inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA (FDA: *Food And Drug Administration*) para el tratamiento del MM. Se trata de un **dipéptido del ácido borónico** (*Figura 5(A)*) que se une de manera reversible al proteasoma a través de su dominio catalítico o 20S. En condiciones fisiológicas, inhibe preferentemente el sitio activo de la subunidad β₅, y con algo menos de afinidad, el sitio activo de la subunidad β₁ [7,29].

1.4.2. Carfilzomib

Carfilzomib (Kyprolis®) es un **tetrapéptido** constituido por una **epoxicetona** (*Figura 5(B)*) que inhibe irreversiblemente la actividad del proteasoma uniéndose a la subunidad catalítica β₅ y

eliminando su actividad quimiotripsina [7]. Muestra una mayor actividad anti-mieloma en comparación con el bortezomib siendo además eficaz en aquellas células resistentes a bortezomib y otros fármacos [32].

1.4.3. Ixazomib

Ixazomib (Ninlaro®, MLN9708) se desarrolló a partir de un **cribado a gran escala de PIs** que contienen ácido borónico en su estructura, y que poseen propiedades físico-químicas diferentes al bortezomib con el fin de detectar PIs con mayor eficacia y efectos secundarios reducidos [6]. En dicho estudio se identificó el Ixazomib como un PI perteneciente a la familia del bortezomib [6,33]. Su uso en pacientes de mieloma fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2015, y, un año después, por la EMA (*European Medicines Agency*) [6].

La estructura del Ixazomib consiste en un **núcleo dipeptídico de alanina-leucina unido a un ácido bórico protegido por un grupo citrato** [6]. Inhibe preferencialmente la subunidad β_5 del proteasoma con actividad quimiotripsina. Además, **a muy altas concentraciones, Ixazomib es capaz de inhibir otros sitios proteolíticos del proteasoma** como la subunidad β_1 con actividad caspasa y la subunidad β_2 con actividad tripsina [7,34].

Su **administración es vía oral**, ventaja que lo diferencia de los otros dos inhibidores anteriormente mencionados (carfilzomib y bortezomib) [6]. Se administra como un **pro-fármaco** (MLN9708), y cuando éste entra en contacto con soluciones acuosas (plasma, tracto intestinal, etc.) se hidroliza a un ácido borónico libre (MLN2238) (*Figura 5(C)*) encargado de desempeñar su correspondiente efecto biológico [6] (*Figura 5(D)*). Experimentos *in vivo* demostraron que Ixazomib presenta una mayor actividad antitumoral que el resto de PIs, atribuida, en parte, a una mayor distribución en sangre que le confiere una mejor farmacodinámica [33]. Actualmente se está utilizando como agente terapéutico en pacientes con MM resistente a bortezomib [34] y se suele administrar o bien en combinación con dexametasona, o en combinación conjunta con dexametasona y lenalidomida [7].

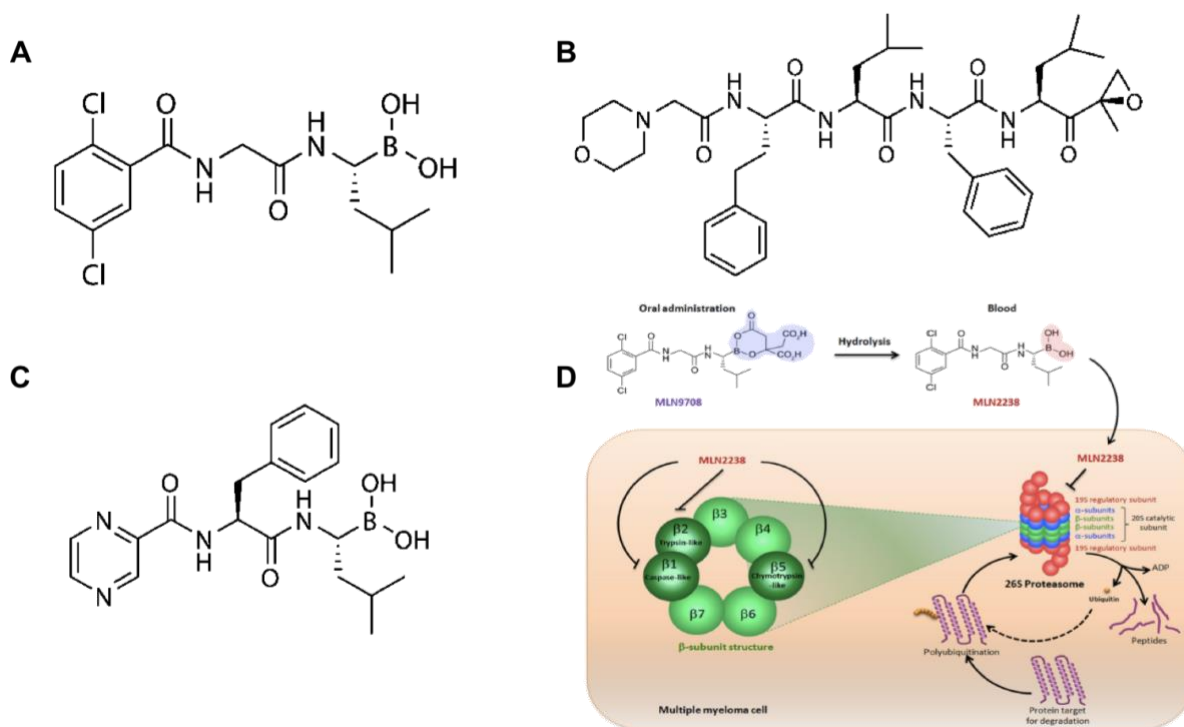


Figura 5. Inhibidores del proteasoma. (A) Estructura química del bortezomib (Velcade®). (B) Estructura química del carfilzomib (Kyprolis®). (C) Estructura química del ixazomib (Ninlaro®). (D) Mecanismo de acción del ixazomib: se ingiere como un pro-fármaco que en medio acuoso sufre una hidrólisis que desprotege el ácido bórico del citrato que lo protegía inicialmente. La imagen (D) fue adaptada de Muz, et al., *Drug Design, Development and Therapy*. vol. 10. pp. 217–226, 2016. [6]

1.5. Autofagia

Existen otras alternativas a la degradación proteica intracelular y que no están asociadas al sistema ubiquitina-proteasoma [28]. Concretamente, la **degradación lisosomal** consiste en la degradación de componentes celulares que tiene lugar el interior de los conocidos como lisosomas, vesículas de tamaño variable y en cuyo interior se pueden encontrar enzimas con diferentes preferencias de sustrato, pero preferiblemente de carácter proteolítico. Una manera de incorporar proteínas al interior de estos orgánulos es mediante el proceso conocido como autofagia. **La autofagia se trata de un proceso catabólico conservado en organismos eucariotas y esencial para mantener la homeostasis del organismo** [35]. Uno de los principales papeles que juega esta ruta catabólica es mantener un balance correcto entre la síntesis, la degradación y el subsecuente reciclado de diversos componentes celulares [35-36].

Normalmente, **la célula presenta niveles basales bajos de autofagia** para mantener una correcta homeostasis celular [37]. Sin embargo, bajo ciertas condiciones (p.ej. inanición, falta de oxígeno, estrés metabólico, etc.), **las células son capaces de modular el proceso autofágico** y eliminar así de manera específica ciertas estructuras potencialmente dañinas: agregados de proteínas aberrantes,

orgánulos celulares dañados e incluso patógenos intracelulares [38]. Todos ellos son incorporados selectivamente en vesículas de doble membrana (**autofagosomas**), y, posteriormente, estas vesículas se fusionan con lisosomas dando lugar al conocido como **autofagolisosoma** donde tiene lugar la degradación completa del cargo incorporado [39]. El proceso de **biosíntesis de novo del autofagosoma** es complejo (**Figura 6**) y está dividido en tres etapas: **inducción**, **nucleación** y, por último, **expansión y crecimiento del autofagosoma** [39]. En esta última etapa se encuentran involucrados los **genes asociados a autofagia** (Atg: *Autophagy related genes*), precursores esenciales del proceso de autofagia [36].

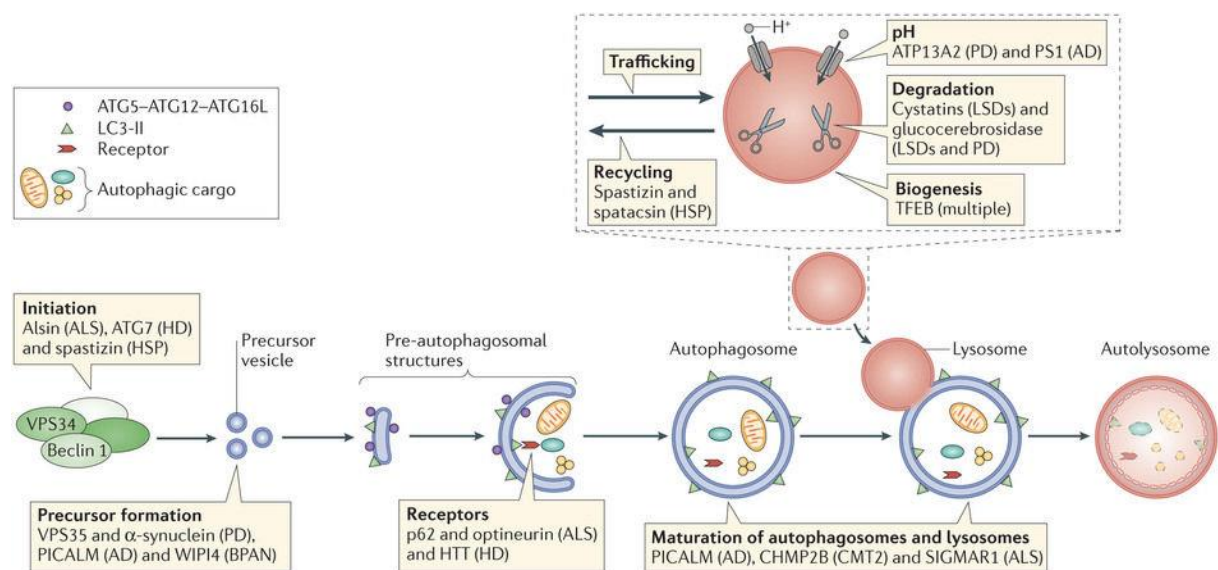


Figura 6. Esquema representativo del proceso autofágico. Éste se inicia a partir del complejo formado por la proteína vacuolar 34 (VPS34: *Vacuolar Protein Sorting 34*) y la proteína Beclina 1 principalmente. Las vesículas precursoras forman el pre-autofagosoma que acaba generando una única vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma. Los componentes celulares que van a ser degradados o bien son envueltos por el autofagosoma durante el proceso de formación del mismo o, por el contrario, son incorporados gracias a adaptadores moleculares que los secuestran y los incorporan al autofagosoma, destacando como adaptador principal p62. Imagen adaptada de F.M. Menzies et al. *Nat Rev. Neurosci.*, vol. 16, no. 6, pp. 345–357, 2015. [38]

Originalmente se consideraba que la autofagia era un proceso no selectivo, es decir, que bajo determinadas condiciones celulares los componentes que se incorporaban al lisosoma eran escogidos aleatoriamente. Actualmente se sabe que a pesar de que **existe cierta inespecificidad** en el proceso autofágico, preferiblemente se trata de un **proceso selectivo** [35]. Existen ciertas moléculas adaptadoras, como es el caso de **p62**, que reconoce específicamente etiquetas moleculares asociadas a degradación, y se encargan de translocar componentes celulares hacia el autofagosoma en formación [36-37]. En la superficie interna del autofagosoma existen receptores específicos (p.ej. LC-II, GABARPL, etc.) [37] para estas moléculas adaptadoras que permiten anclar el cargo al interior del autofagosoma facilitando su posterior degradación. Los **31 genes Atg** conocidos pueden ser clasificados en base a su participación

en la autofagia selectiva o no selectiva. Del total de genes, 16 son esenciales para ambos tipos de autofagia [36].

1.5.1. Cloroquina

La cloroquina es un **fármaco de la familia de las 4-aminoquinolonas** (*Figura 7*) tradicionalmente utilizado para el tratamiento y prevención de la malaria. A concentraciones muy elevadas puede llegar a inhibir la actividad del proteasoma, pero su diana principal es el lisosoma. Concretamente, **la cloroquina inhibe la acidificación del lisosoma** [40]. Al no haber un ambiente ácido intralisosomal, las enzimas lisosomales no pueden funcionar correctamente ya que su actividad depende de un pH ácido. Por tanto, la cloroquina se trata de una droga que bloquea el proceso autofágico en su último paso, ya que impide que se degrade el contenido incorporado al lisosoma.

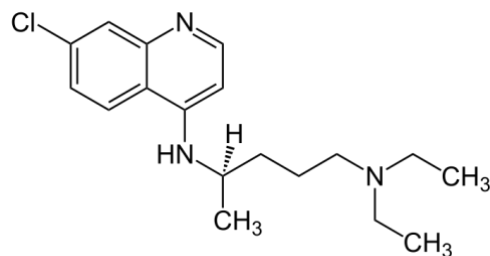


Figura 7. Estructura química de la cloroquina. La cloroquina es capaz de inhibir la acidificación del lisosoma y también es capaz de inhibir la actividad del proteasoma (solo a concentraciones muy elevadas).

2. Antecedentes y Objetivos

Los PIs son uno de los principales agentes quimioterápicos que han surgido para el tratamiento del MM durante las dos últimas décadas [7]. El éxito de éstos fármacos en el tratamiento del MM reside en la elevada sensibilidad que presentan las células mielomatosas a la inhibición del proteasoma 26S ya que el recambio proteico de las mismas depende, en gran medida, del correcto funcionamiento del proteasoma [1,7]. Previamente, nuestro grupo ha realizado una gran cantidad de estudios detallando el mecanismo molecular por el cual varios PIs (especialmente bortezomib y carfilzomib) inducen apoptosis en células de mieloma humanas. Por otro lado, también nuestro grupo ha descrito la existencia de sinergias entre dichos fármacos y otros agentes quimioterápicos (p.ej. cloroquina, inhibidores de VCP/p97 (*Valosin Containing Protein*) como DBeQ y CB-5083, etc.) que podrían aplicarse para diseñar una estrategia terapéutica óptima en el tratamiento del MM [41]. Concretamente, VCP/p97 es una proteína de la familia AAA (*ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares*) [42]. Generalmente, este tipo de enzimas emplean energía procedente de la hidrólisis de ATP para modificar estructuralmente diversos sustratos. Además, se sabe que VCP/p97 media diversas funciones celulares entre las que destaca el proceso de degradación asociado al ER, a través del sistema ubiquitina-proteasoma, uniéndose directa o indirectamente a moléculas marcadas con ubiquitina y favoreciendo su transferencia al sistema de degradación asociado al proteasoma 26S [41-42] de ahí el interés de estudiar su efecto en combinación con el fármaco Ixazomib .

Sin embargo, la información que se tiene del fármaco Ixazomib es escasa dada su reciente aprobación por parte de la FDA y la EMA. En consecuencia, se ha decidido estudiar la apoptosis inducida por Ixazomib en células de mieloma humano de manera más detallada. El estudio del mecanismo de acción de este nuevo fármaco podría aportar información útil en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Por ello, la **obtención de datos básicos de este mecanismo** será el objetivo principal de este trabajo. Los objetivos concretos son:

- I. Evaluar el **efecto sobre la viabilidad y la apoptosis** de Ixazomib en diversas líneas celulares de mieloma humano.
- II. Estudiar el **efecto de Ixazomib** en el desarrollo del **ciclo celular** de diversas líneas celulares de mieloma humano.
- III. Analizar el **mecanismo celular responsable de la inducción de apoptosis** en presencia del fármaco Ixazomib mediante el estudio de **expresión de proteínas de la familia Bcl-2**, y de la **caspasa 3**, desencadenante del proceso apoptótico.
- IV. Estudiar la posibilidad de **efecto sinérgico** entre el fármaco Ixazomib y otros fármacos como DBeQ, CB-5083 y cloroquina con el fin de desarrollar una estrategia terapéutica de combinación.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivos Celulares

3.1.1. Materiales y medios de cultivo celulares.

Las líneas celulares de mieloma utilizadas en el presente Trabajo Fin de Máster son células que crecen en suspensión y para su cultivo se utilizó el medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con un 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (SFB: *Serum Fetal Bovine*, Gibco) y en 1%, también en volumen, de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomomicina 100 µg/ml, Sigma). El medio RPMI 1640 GlutaMAX™ una vez suplementado se denominó **medio completo**.

Tanto los frascos de cultivo, como el resto del material de plástico utilizado durante el desarrollo de este trabajo (placas de 6, 12, 24 ó 96 pocillos, tubos criogénicos, etc.) fueron estériles y procedían del proveedor TPP. Los tubos de fondo cónico de 15 y 50 mL así como las pipetas serológicas empleadas para cultivo celular (5, 10 y 25 mL) procedían de Cornik. Se utilizó dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma) para regenerar el fármaco Ixazomib (Selleckchem). Todas las manipulaciones de células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P), y los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado (Heraeus Heracell 150i, Thermo) a 37°C, con un 5% de CO₂ y aire saturado de humedad. Además, el material de vidrio utilizado, las puntas de micropipetas y cualquier otro tipo de material usado en la manipulación de las células fue previamente esterilizado en autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta) durante 20-30 minutos a 1,2 atmosferas de presión.

Durante el desarrollo del presente trabajo se han utilizado las siguientes centrífugas:

- **Microfuge 16 (Beckman Coulter)**: utilizada para tubos Eppendorf, a temperatura ambiente.
- **Eppendorf Centrifuge 5417R**: utilizada para centrifugar tubos Eppendorf a temperatura controlada.
- **Allegra X-15R (Beckman Coulter)**: empleada para tubos de fondo cónico y tubos de citometría (5 mL).

3.1.2. Líneas celulares

A lo largo del desarrollo de este trabajo se han empleado tres líneas de mieloma múltiple humano:

- **U266:** línea celular establecida en 1968 a partir de células plasmáticas de sangre periférica de un varón de 53 años (cedidas por el Dr. Antonio Campos, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, España). Esta línea celular se caracteriza por sobreproducir IgE λ .
- **MM.1S:** línea celular establecida en 2003 a partir de la línea celular MM.1, habiendo sido establecida ésta última en 1986 a partir de sangre periférica de una mujer de 45 años (cedidas por Atanasio Pandiella; Centro Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, España). Se caracteriza por una gran producción de IgA λ y una elevada sensibilidad a glucocorticoides. Además, esta línea celular es capaz de formar una ligera monocapa sobre el sustrato donde está situada.
- **NCI-H929:** línea celular establecida en 1986 a partir del derrame pleural de una mujer de 62 años con mieloma múltiple (cedidas por el Dr. Antonio Campos, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, España). Se caracterizan por la sobreproducción de IgA κ .

3.1.3. Mantenimiento de los cultivos

Las líneas celulares empleadas se cultivaban rutinariamente en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² (TPP), en función de la cantidad de células necesarias. Periódicamente se realizaron subcultivos de todas las líneas celulares empleadas. Para ello, inicialmente se determinaba la densidad celular (células mL⁻¹) y la viabilidad de los cultivos; seguidamente, se procedía a diluir las células en medio RPMI 1640 completo hasta obtener una densidad mínima entre 1,5·10⁵ y 3·10⁵ células mL⁻¹. Rutinariamente se comprobó el estado de los cultivos evaluando, principalmente, la morfología celular de los mismos y gracias a un microscopio invertido (Nikon). La detección de Micoplasmas se realizó, de manera periódica, mediante el kit “Mycoplasma Gel Detection” (Biotools) basado en una reacción de PCR.

3.1.4. Evaluación de la densidad y viabilidad de los cultivos celulares

La densidad (células mL⁻¹) y la viabilidad (% células viables) de los cultivos fueron determinados rutinariamente mediante el conteo con azul Trypan. Este colorante es capaz de introducirse en aquellas células cuya membrana plasmática está dañada, es decir, permite observar las células muertas como azules al microscopio óptico. En cada conteo se mezclaron 50 μ L de la suspensión celular con el mismo volumen de azul Trypan. Parte de la mezcla final se dispuso en una cámara de

Neubauer (o hemocitómetro) y se procedió al conteo utilizando un microscopio óptico. La densidad celular se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Densidad Celular} = \frac{N^{\circ} \text{ células viables} \cdot \text{Factor de Dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ de Cuadrantes Contados}}$$

En este caso, el factor 10^4 es el factor de corrección del volumen del hemocitómetro y, el factor de dilución es 2, dado que se mezclaban 50 μL de solución celular con 50 μL de azul Trypan. En cuanto a la viabilidad celular, ésta se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Células Viables} = \frac{N^{\circ} \text{ de Células Contadas Viables}}{N^{\circ} \text{ de Células Contadas Totales}} \cdot 100$$

3.1.5. Congelación y descongelación de los cultivos celulares

Para proceder a la **congelación** de los cultivos se recogió el volumen correspondiente a $6 \cdot 10^6$ células totales de cada línea celular en tubos de fondo cónico de 15 mL y se centrifugaron durante 5 min a 524 x g. A continuación, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 0,5 mL de medio RPMI 1640 completo que contenía un 10% de DMSO y se trasvasó el contenido a un criotubo de congelación estéril. Los viales se almacenaron rápidamente en un congelador a -80°C . Pasadas al menos 24 h, los viales se introdujeron en un contenedor con nitrógeno líquido a -196°C hasta su uso.

Para la **descongelación** de células, se sacaron los criotubos del contenedor de nitrógeno líquido y se añadió lentamente un pequeño volumen de medio RPMI 1640 completo hasta observarse la descongelación completa de las células. En ese momento, la suspensión se añadió en un tubo de fondo cónico de 15 mL al que previamente se le había añadido un volumen de 8 mL de medio RPMI 1640 completo. En la mayor brevedad posible, se centrifugaron las células durante 5 min a 524 x g. Se descartó el sobrenadante y el pellet generado se resuspendió en 10 mL de medio RPMI 1640 completo. Una vez determinada la viabilidad celular, las células se sembraron a la densidad habitual.

3.2. Estudio de la Proliferación y Apoptosis Celular

3.2.1. Determinación de la proliferación celular

Para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con Ixazomib se utilizó una variación del método originalmente propuesto por Mossman [43] y, posteriormente, modificado por Denizot y Lang en 1986 [44]. En este método se relaciona el número de células viables con la cantidad de cristales de azul de formazán generados. Estos cristales son insolubles en medio acuoso y se producen por reducción del [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT) gracias a la acción de

enzimas deshidrogenasas intracelulares (principalmente participan las deshidrogenasas mitocondriales). Por tanto, la cantidad total de cristales formados es proporcional a la proliferación celular, lo que incluye tanto inhibición de crecimiento (efecto citostático) como muerte celular (efecto citotóxico).

Las células se cultivaron a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} en placas de 96 pocillos de fondo plano con un volumen final de $100 \mu\text{L}$ pocillo⁻¹ y 5 repeticiones por punto experimental, en presencia de diferentes concentraciones de Ixazomib (Control, 1,56 nM, 3,12 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM). El cultivo se incubó en la estufa a 37°C y 5% de CO_2 durante el tiempo estipulado (24 ó 48 h). Transcurrido ese tiempo, se añadieron $10 \mu\text{L}$ pocillo⁻¹ de una disolución de MTT (5 mg mL^{-1}) en PBS con ayuda de una pipeta de repetición. Posteriormente, se incubó la placa durante 2 h a 37°C , tiempo tras el cual los cristales eran visibles a simple vista. A continuación, la placa se centrifugó a $3720 \times g$ durante 25 minutos, se retiraron $50 \mu\text{L}$ de sobrenadante de cada pocillo para reducir las interacciones del disolvente orgánico con el medio RPMI 1640 y acelerar así la disolución de los cristales de formazán. Seguidamente, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de una mezcla de isopropanol/HCl 0,05 M por pocillo, y se resuspendió el contenido de cada pocillo para favorecer la disolución de los cristales, los cuales terminaron de disolverse en un agitador de placas (Bioblock). Para concluir, se midió la absorbancia de los pocillos a 550 nm en un lector de placas ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific).

3.2.2. Análisis de la apoptosis por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V

Se analizó el nivel de apoptosis inducida por Ixazomib, sólo o en combinación con otros fármacos (DBeQ, CB-5083 y cloroquina, todos ellos procedentes de Sellekchem). Uno de los primeros eventos que tienen lugar una vez que la célula entra en apoptosis es la translocación del fosfolípido PS desde la hemicapa interna a la hemicapa externa, siendo éste un mecanismo que favorece la fagocitosis de la célula muerta por parte de células adyacentes. Una manera de evaluar la translocación de PS es el marcaje celular con Anexina V, una molécula que se une con una afinidad elevada a este fosfolípido. Además, el uso de Anexina V ha resultado ser un procedimiento muy interesante de análisis apoptótico dado que esta molécula puede conjugarse con diferentes fluoróforos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$), ficoeritrina (PE) ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$), DY634 ($\lambda_{\text{ex}} = 635 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$) o alofocianina (APC) ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$).

Todas las líneas celulares analizadas con esta metodología fueron sembradas a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} en $500 \mu\text{L}$ de medio completo RPMI 1640, por duplicado y en placas de 24 pocillos. Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, las células control y las células tratadas se recogieron en tubos de citometría. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a $250 \times g$ y, posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes por decantación. Durante la centrifugación, se preparó una dilución de ABB 1x (ABB: *Annexin Binding Buffer*; HEPES/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM,

CaCl₂ 2.5 nM) en agua Mili-Q estéril a partir de una solución de ABB 10x, para cada ensayo, a la que se le adicionó 1 µL de Anexina V - FITC por cada 25 tubos de citometría. Se añadieron 100 µL de la disolución de ABB 1x + Anexina V – FITC en cada pellet celular y se resuspendió con ayuda de un vórtex. Las muestras se dejaron incubar durante 20 minutos en oscuridad y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences). Los resultados obtenidos se procesaron y analizaron con los programas informáticos CellQuest pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 6.

En ocasiones, también se utilizó la sonda 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 647 \text{ nm}$) capaz de unirse al DNA; solo marca aquellas células cuya membrana plasmática está dañada. Se utiliza como marcador de necrosis celular, y permite complementar a la información aportada por la Anexina V en el proceso de muerte celular. El procedimiento de empleo es semejante al de la Anexina V anteriormente descrito, la diferencia radica en que se añade 1 µL por cada muestra que se vaya a analizar por citometría de flujo.

3.3. Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se analizó mediante el marcaje de las mismas con yoduro de propidio, y su posterior análisis por citometría de flujo. El yoduro de propidio es un fluorocromo ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) capaz de intercalarse en el DNA. Generalmente, es utilizado para identificar células muertas en una población y estudiar el ciclo celular. El análisis por citometría de flujo del marcaje con yoduro de propidio informa sobre el contenido de DNA, permitiendo así distinguir y cuantificar la distribución relativa de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M).

Se recogieron las células sembradas en placas de 6 pocillos en tubos de fondo cónico de 15 mL. La mitad de los tubos contenían células sin tratar que se tomaron como control (10^6 células totales iniciales), y la otra mitad, células tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de Ixazomib en función de la línea celular de MM: las células U266 y MM.1S fueron incubadas con una concentración 25 nM de Ixazomib mientras que las células NCI-H929 15 nM de Ixazomib. Se centrifugaron a 250 x g durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes y se lavó con PBS (3 mL) cada tubo. Se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 250 x g revoluciones, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µL de PBS que se pasaron a un eppendorf estéril. Tras un nuevo lavado, las células se fijaron con 1 mL de etanol al 70% añadido gota a gota y previamente enfriado. El etanol fue añadido a la vez que el pellet celular era agitado con ayuda de un vórtex con el fin de mezclar y resuspender las células, evitando la formación de agregados. Tras la fijación, los eppendorf se guardaron a -20°C durante al menos 24 h, momento en el que las células se lavaron con 500 µL de PBS frío, y se centrifugaron a 2095 x g, durante 10 minutos y a 4°C. Se decantó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en

500 μ L de la solución que contenía yoduro de propidio y RNasa (en PBS y azida de sodio al 0,09%, pH 7.2, Immunostep) y se incubaron a T^a ambiente durante 20 minutos y en oscuridad. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences) y los datos obtenidos se analizaron con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 6.

3.4. Análisis de la Expresión de Proteínas Implicadas en la Muerte por Ixazomib

3.4.1. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western-blot

Se evaluó la expresión de diferentes proteínas de la familia Bcl-2 así como la activación de la caspasa-3 mediante ensayos de Western-Blot. Concretamente, se determinó la expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bim, PUMA, Noxa y Procaspasa 3 en las líneas de mieloma U266, MM.1S y NCI-H929 a diferentes tiempos y tratadas con el fármaco Ixazomib.

3.4.1.1. Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Para los experimentos relativos al estudio del mecanismo de inducción de apoptosis por Ixazomib fue necesario obtener lisados celulares. Las células a analizar fueron sembradas en placas de 6 pocillos ($3 \cdot 10^6$ células pocillo⁻¹, en un volumen total de 10 mL por pocillo). A continuación, se dejaron incubando las células durante 0 h (control), 6 h, 24 h o 48 h, y a diferentes concentraciones de Ixazomib en función de la línea celular (concretamente, la línea U266 se incubó a 25 nM y 50 nM de Ixazomib, la línea MM.1S a 25 nM y, finalmente, la línea NCI-H929 a 15 nM).

Una vez había transcurrido el tiempo estipulado, se recogieron las células en tubos de fondo cónico de 15 mL y se evaluó el número de células totales, así como la viabilidad de las mismas, utilizando el método del azul Trypan. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 524 x g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS. Dicho volumen fue trasvasado posteriormente a un eppendorf estéril y se centrifugó durante 5 minutos a 250 x g. Se eliminó el PBS y se resuspendieron los pellets en tampón de lisis (20 μ L por cada 10^6 células) que contenía: Tritón-X100 al 1%, Sigma; NaCl 150 mM, Merck; Tris/HCl 50 mM, pH: 7.6, Sigma; glicerol al 10% v/v, Scharlau; EDTA 1 mM, Sigma; ortovanadato sódico 1 mM, Sigma; pirofosfato sódico 10 mM, Sigma; leupeptina 10 μ g mL⁻¹, Sigma; fluoruro de sodio 10 mM, Sigma; fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, Sigma. Una vez añadido el tampón de lisis, se incubaron las muestras durante 30 minutos en hielo. Seguidamente, éstas se centrifugaron a 10600 x g y 4°C; finalmente se recuperaron los sobrenadantes (donde se sitúan las proteínas celulares a analizar) y se trasvasaron a nuevos tubos eppendorf. Se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

3.4.1.2. Separación de proteínas celulares mediante electroforesis en geles de Poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF

En primer lugar, se determinó la cantidad de proteína total presente en cada extracto celular para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo. Para ello, se empleó el método de BCA (BCA: *Bicinchoninic Acid*; Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) basado en un ensayo colorimétrico muy sensible que no interacciona ni con los detergentes iónicos ni con los no iónicos. Concretamente, este método se basa en la formación de un complejo proteína-Cu²⁺ en condiciones alcalinas, seguido de una reducción del Cu²⁺ a Cu⁺, siendo este proceso de reducción proporcional a la cantidad de proteína total presente en la muestra. Esta reacción está fundamentada en la capacidad de los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina para reducir este ion. Por tanto, la cantidad de proteína es proporcional a la cantidad de reducción. Esta reducción es cuantificable debido a la formación de un complejo estable de color azulado-morado entre BCA y el Cu⁺ con absorbancia a 562 nm. Finalmente, la concentración de proteína en las muestras se calculó extrapolando el valor de absorbancia de las mismas en una recta patrón de albúmina (Sigma). Los datos de la BCA se analizaron con el programa informático Microsoft Excell 2016 gracias al cual se obtuvo el volumen de extracto necesario para tener 100 µg de proteína en cada muestra a analizar.

A cada muestra se le añadió además 15 µL de tampón de carga 3x (Tris/HCl 150 mM, pH: 7.4; dodecilsulfato sódico (SDS) al 3%; molibdato de sodio 0,3 mM; pirofosfato sódico 30 mM; fluoruro de sodio 30 mM; glicerol al 30% v/v; β-mercaptoetanol al 30% v/v; azul de bromofenol al 0,06%, p/v) para que quedase a una concentración final 1x, y un volumen de agua Mili-Q específico para cada muestra hasta alcanzar un volumen final de muestra de 40 µL. A continuación, las muestras preparadas se calentaron a 95°C durante 10 minutos en bloque térmico sin agitación y se les dio un pulso de centrifuga a 11500 x g durante 30 segundos.

Por otra parte, se prepararon geles de poliacrilamida al 15% a los que se les adicionó SDS. Tanto el gel concentrador (*stacking gel*) como el gel separador (*resolving gel*) se prepararon en el laboratorio y sus composiciones quedan recogidas en la **Tabla 1**. Se cargaron 100 µg de cada muestra en los geles, habiendo sido éstos previamente colocados en cubetas de electroforesis (Sub-Cell GT, Bio-Rad) llenas de *Running Buffer* (Trizma 19 mM, Sigma; glicina 1,9, Panreac; SDS al 0,01%, Merck). La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 80 V y 20 mA gel⁻¹ con el fin de que se produjera un correcto alineamiento de las muestras a lo largo del *stacking gel*, y, posteriormente, se dejó que recorrieran el *resolving gel* durante 1h 30 minutos a 180 V y 20 mA gel⁻¹.

Tabla 1. Composición de los geles empleados para la electroforesis.

Componentes	Stacking Gel ($\cong 2\%$)	Resolving Gel (15%)
Acrilamida/Bis, Bio-Rad	0,5 mL	1,9 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,25 mL
SDS al 10%	50 μ L	50 μ L
Agua Destilada	3 mL	1,7 mL
APS al 10% (p/v), Sigma	150 μ L	100 μ L
T.E.M.E.D, Sigma	15 μ L	10 μ L
Total	5 mL	5 mL

A continuación, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) previamente activada durante 30 segundos en metanol. La electrotransferencia se realizó en un montaje tipo sándwich (evitando la formación de burbujas) de manera que se colocaron la membrana y el gel entre papeles de filtro Whatman (GE Healthcare) humedecidos previamente con tampón de transferencia o *Transfer Buffer* (Tris/HCl 48 mM pH: 8,3, Sigma; glicina 39 mM, Sigma; SDS al 0,037%, Merck; 20% metanol grado HPLC, Panreac) dentro de un equipo de transferencia semiseca (Bio-Rad) conectado a una fuente de electroforesis (Bio-Rad) durante 1 h 15 minutos a 20 V y 400 mA.

Una vez finalizada la electrotransferencia, se recuperaron las membranas de PVDF del montaje y se comprobó que la transferencia se había producido correctamente sumergiéndolas en una solución de Rojo Ponceau (Merck) al 0,1% en ácido acético al 0,05%. De esta forma se consiguen colorear de manera reversible las bandas proteicas transferidas lo que facilita detectar visualmente si la electrotransferencia ha sido correcta o las proteínas continúan en el gel de poliacrilamida. Finalmente se procedió al bloqueo de las membranas introduciéndolas en cubetas que contenían una disolución de leche desnatada al 5% (p/v) en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH: 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 al 0,1%; timerosal 0,1 g L⁻¹) durante aproximadamente 1 h, a T^a ambiente y en agitación.

3.4.1.3. Análisis de proteínas por Western-blotting y detección de inmunocomplejos

Tras el bloqueo, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B bajo agitación moderada para eliminar los restos de leche. Finalizados los lavados, se añadieron los anticuerpos primarios adecuados en función de la proteína que se quisiera detectar (*Tabla 2*). Se dejaron incubar a 4°C durante toda la noche en un agitador.

Tabla 2. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados para Western-Blot

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Bcl-X_L	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Mcl-1	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotech.
Bcl-2	Ratón	1/500	Abcam
Bim	Conejo	1/1000	Merck Millipore
PUMA	Conejo	1/500	Abcam
Noxa	Ratón	1/250	Abcam
Procaspasa 3	Cabra	1/1000	RD-System

Tras la incubación, se recuperaron los anticuerpos y se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos en tampón B y en agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 h en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (Rabbit/Mouse/Goat IgG-Peroxidase, Sigma-Aldrich); todos ellos policlonales, obtenidos en cabra (anti-IgG de conejo y ratón) y en burro (anti-IgG de cabra), y diluidos 1:20.000 (Sigma) en una mezcla al 5% de leche diluida en tampón B. Finalizado este tiempo, se eliminó el anticuerpo secundario y las membranas se lavaron durante 10 minutos con tampón B en agitación. Seguidamente, las membranas se incubaron durante 2 minutos y en un volumen de 1 mL por membrana con el sustrato de la enzima peroxidasa (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Cada membrana se colocó en una funda de plástico transparente y se llevó a cabo el revelado en el equipo Amersham™ Imager 600 (GE Life Sciences) durante el tiempo de exposición automático (2-3 minutos), y cuando éste no era suficiente las membranas se expusieron durante 30 minutos.

Como control de carga se empleó la α -tubulina en cada uno de los Western-Blot realizados. Para ello se utilizó el anticuerpo primario anti- α -tubulina monoclonal obtenido en ratón (dilución 1:10.000, Sigma) en una solución de tampón B al 2,5% de leche; como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo frente a IgG de ratón (dilución 1:20.000, Sigma) obtenido en cabra y conjugado con peroxidasa.

3.4.2. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo

Inicialmente, se sembraron $5 \cdot 10^5$ células a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ en placas de 12 pocillos. Tras incubarlas durante 0 h, 6 h, 24 h y 48 h se tomaron células control y células tratadas con Ixazomib (las concentraciones de Ixazomib fueron variables en función de la línea celular: la línea U266 se incubó a 25 nM y 50 nM, la línea MM.1S a 25 nM y, por último, la línea NCI-H929 a 15 nM) en tubos de citometría. Se lavaron a 930 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante por decantación.

Los pellets se resuspendieron en 500 μ L de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos y a T^a ambiente para fijar las células.

Pasado el tiempo de incubación, las muestras se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 930 x g. Los pellets se resuspendieron en esta ocasión en 200 μ L de PBS con saponina (Sigma) al 0.1%, lo que permite generar poros en la membrana de las células facilitando así la entrada de los anticuerpos que serán utilizados más adelante. Se dejó incubando durante 20 minutos a T^a ambiente.

A la par que se realizaron los experimentos de análisis de caspasa 3 activa, PUMA y Noxa también se determinó la viabilidad de las células. Para ello se utilizó el marcaje con 7-AAD (explicado previamente en el apartado 3.2.2.); dicho compuesto es capaz de unirse al DNA y se utiliza como marcador de necrosis celular.

3.4.2.1. Determinación de caspasa 3 activa mediante citometría de flujo

Se analizó la activación de la caspasa 3 a diferentes tiempos. También se evaluó la activación de la caspasa 3 en presencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-(oMe)-FMK (zVAD) (MedChem Express) a una concentración de 50 μ M (concentración optimizada en estudios previos del laboratorio). Se trata de un compuesto de naturaleza peptídica, capaz de entrar al interior celular y bloquear la inducción de apoptosis celular.

Una vez incubados los tubos con PBS al 0,1% de saponina, éstos se lavaron y se les añadió 100 μ L de una disolución de PBS al 5% de SFB que contenía anticuerpo anti-caspasa-3 activa-FITC generado en conejo (dilución 1:20, BD Biosciences) en cada una de las muestras a analizar. Se trata de un anticuerpo ya marcado, por lo que no se requiere de un anticuerpo secundario para su posterior análisis. Se incubó durante 30 minutos a T^a ambiente y en oscuridad. A continuación, se lavaron las células con 1 mL de PBS y se resuspendieron en 300 μ L de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences). Los resultados obtenidos fueron estudiados con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 6.

3.4.2.2. Determinación de los niveles de expresión de PUMA y Noxa mediante citometría de flujo

Para determinar los niveles intracelulares inducidos por Ixazomib de estas dos proteínas pro-apoptóticas se utilizó la técnica de marcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos seguido de análisis por citometría, es decir, se procedió de la misma manera que con la determinación de la caspasa

3 activa. Al igual que ocurría con la activación de la caspasa 3, estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas zVAD (50 μ M).

Una vez las muestras se habían incubado en PBS con saponina al 0,1%, se lavaron, y se añadió a parte de las muestras 50 μ L de una disolución de PBS al 5% de SFB que contenía anticuerpo anti-Noxa (dilución 1:10, Santa Cruz Biotech.) generado en ratón y, a otro tanto de muestras, se les añadió 50 μ L de otra disolución semejante, pero que contenía anticuerpo anti-PUMA, generado en conejo (dilución 1:100, Abcam). Hubo muestras control a las que no se les añadió anticuerpo primario para actuar a modo de control de isotipo (permite evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario).

Se dejó incubar con los anticuerpos primarios durante 30 minutos a T^a ambiente, y, después, se centrifugaron 5 minutos a 930 x g. Tras decantar el sobrenadante, se lavaron los pellets celulares con 200 μ L de PBS. A continuación, se prepararon las disoluciones de los anticuerpos secundarios en PBS al 5% de SFB. Una vez preparadas, se añadieron 50 μ L de la disolución que contenía anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (dilución 1:100, Abcam) a las muestras incubadas con el anticuerpo primario de PUMA, y otros 50 μ L de la disolución que contenía anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor™ (dilución 1:50, Thermo) en las muestras incubadas con el anticuerpo primario frente a Noxa (ambos anticuerpos secundarios fueron generados en cabra). En este caso sí que se añadió anticuerpo secundario a los isotipos para evaluar la inespecificidad de unión del mismo. Seguidamente, se incubó durante 30 minutos a T^a ambiente y en oscuridad. Tras la incubación se centrifugó 5 minutos a 930 x g y se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente, los pellets celulares se resuspendieron en 200 μ L de PBS.

Una vez realizados los marcajes correspondientes en todas las muestras se procedió al análisis de los niveles de expresión de las proteínas PUMA y Noxa en un citómetro de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences) y los resultados obtenidos fueron analizados con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 6.

3.5. Análisis estadístico

El análisis, interpretación y representación de los resultados obtenidos en todos los experimentos detallados en el presente TFM se realizó con los programas informáticos Excel y GraphPad Prism 6. Además, se realizó la prueba t de Student despareada, considerando los distintos grados de significancia como:

- * si el p-valor es < 0,05
- ** si el p-valor es < 0,01
- *** si el p-valor es < 0,001

4. Resultados y Discusión

4.1. Ixazomib induce Apoptosis en Células de Mieloma Múltiple Humanas

Las células de MM son células B plasmáticas tumorales productoras de ingentes cantidades de anticuerpos [1]. La acumulación de anticuerpos podría provocar un estrés que desencadenaría en la conocida como **respuesta a proteínas desplegadas** (UPR: *Unfolded Protein Response*) y conllevaría la inducción de apoptosis. Una manera de provocar la acumulación de estas proteínas, y, por tanto, favorecer la apoptosis, es mediante la inhibición del proteasoma, de ahí el interés de estudiar el mecanismo detallado de muerte celular inducida por Ixazomib.

El efecto de Ixazomib en células de MM humanas se estudió usando las líneas NCI-H929, MM.1S y U266. Inicialmente, se llevó a cabo un ensayo dosis-respuesta mediante MTT. Éste se realizó a dos tiempos (24 y 48 h) y a concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50 nM). Para determinar el rango de concentraciones a evaluar en dicho ensayo se utilizó como modelo el estudio llevado a cabo por Chauhan et al., (2011) [45] también del fármaco Ixazomib sobre varias líneas de MM.

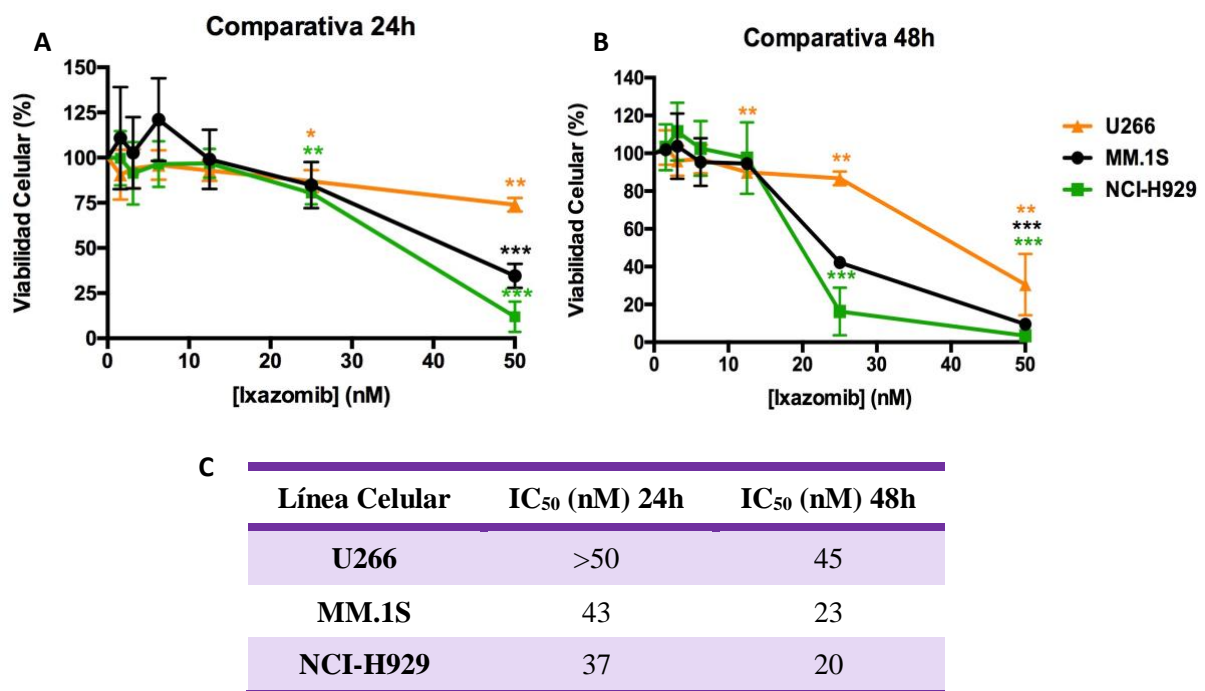


Figura 8: Evaluación del efecto de Ixazomib sobre la viabilidad celular en líneas de MM. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se trataron a concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50 nM). A las 24 y 48 h se analizó la viabilidad celular por el método de MTT (A)-(B). Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control. Además, se muestra una tabla donde se recogen los IC_{50} obtenidos para los diferentes tiempos y en las diferentes líneas de MM (C).

Como puede comprobarse en las Figuras 8(A) y 8(B), la sensibilidad al Ixazomib varía en función de la línea celular. Concretamente, la línea NCI-H929 parece ser la más sensible tanto a 24

como a 48 h, mientras que la línea U266 es la más resistente a ambos tiempos. Las concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀) de cada una de las líneas quedan recogidas en la **Figura 8(C)**. En el caso de las líneas MM.1S y NCI-H929 los IC₅₀ a 48 h fueron bastante similares a los obtenidos en el estudio realizado por Chauhan et al., (2011) (IC₅₀ ≈ 12,5 nM). Los IC₅₀ obtenidos tanto para Carfilzomib como para Bortezomib a 24 h de incubación en líneas de MM [46-47] fueron notablemente inferiores a los obtenidos para Ixazomib (**Tabla A1** del **Anexo I**). Una posible explicación a estas diferencias podría fundamentarse en el estudio realizado por B.B. Hasinoff (2018), donde se detallan las cinéticas de unión de varios PIs al proteasoma [33]. En dicho estudio se demuestra que Ixazomib es el PI con mayor afinidad por el proteasoma ($k_{on} = 2,3 \cdot 10^{-4} M^{-1} s^{-1}$). Sin embargo, también es cierto que Ixazomib presenta un tiempo medio de unión al proteasoma ($t_{1/2}^{off}$) notablemente inferior con respecto a otros PIs estudiados ($t_{1/2}^{off}$ de 5 minutos para Ixazomib frente a 30 de Carfilzomib o >98 para Delanzomib); por tanto, a pesar de su elevada afinidad, el periodo de tiempo que permanece unido ejerciendo su acción inhibitoria es bastante breve, y de ahí que se requieran dosis mayores de Ixazomib para ejercer el mismo efecto que el que ejercen otros PIs. Por otro lado, el efecto de Ixazomib sobre la inhibición de la proliferación (que es lo que se evaluó mediante el ensayo de MTT) puede deberse tanto a un efecto citostático como citotóxico. Para confirmar que Ixazomib induce muerte celular, se evaluó la capacidad de éste en inducir apoptosis (a 24 h) en líneas de MM a través del estudio de exposición de PS con Anexina V (**Figura 9**).

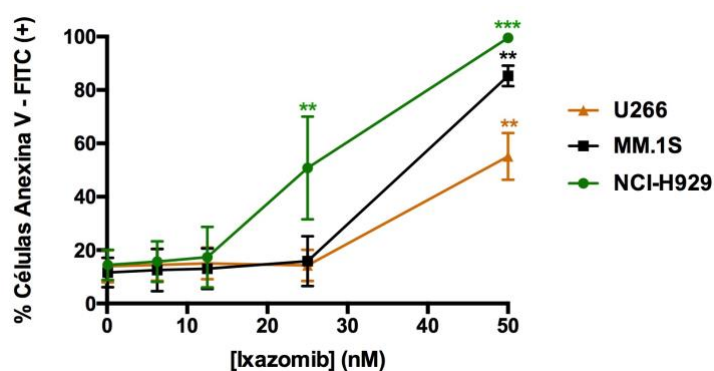


Figura 9: Análisis de la apoptosis inducida por Ixazomib en las líneas de MM humano. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h a concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50 nM). Se analizó la apoptosis por la exposición de la PS mediante el marcaje con Anexina V – FITC. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control.

En la **Figura 9** se aprecia como Ixazomib es capaz de inducir exposición de PS en todas las líneas estudiadas de manera dependiente de la dosis, al igual que ocurre con otros PIs como Carfilzomib o Bortezomib [46-47]. Además, este ensayo mantiene el perfil de sensibilidades entre líneas celulares observado mediante MTT, así como el perfil obtenido para otros PIs [49]. En este sentido, las IC₅₀ (a 24 h) obtenidas mediante MTT para las líneas MM.1S (43 nM) y NCI-H929 (37 nM) corresponden con dosis donde ya existe muerte celular como puede observarse en la **Figura 9**, es decir, el efecto de reducción en la viabilidad celular observado mediante MTT se debe a un efecto citotóxico de Ixazomib

y no citostático. Por otro lado, en el caso de la línea U266, el porcentaje de células Anexina V positivas es mayor que el descenso de viabilidad observado mediante MTT, lo cual indica que hay células U266 apoptóticas que todavía conservan su capacidad de reducir MTT.

Otra de las conclusiones que se puede obtener a partir de las **Figuras 8 y 9** es el modo en que actúa Ixazomib: los resultados sugieren que es necesaria una concentración mínima o umbral para que se desencadene la acción citotóxica de éste. Un comportamiento similar fue propuesto por Shabaneh et al., (2008) para el fármaco Bortezomib [50], y, resultados todavía no publicados de nuestro grupo, indican que el comportamiento desarrollado por Carfilzomib también es semejante.

En paralelo, se evaluó mediante ensayos de tipo *time-course*, el momento en que Ixazomib ejercía su actividad citotóxica en cada una de las líneas celulares. Para ello se utilizó una concentración 50 nM de Ixazomib en todas las líneas, y se midió el porcentaje de células Anexina V y 7-AAD positivas a 0, 4, 8, 16 y 24 h en las líneas NCI-H929 y MM.1S; y a 0, 24 y 48 h en el caso de U266, dado que éstas son más resistentes a Ixazomib tal y como ha quedado evidenciado en las **Figuras 8 y 9**. Los resultados obtenidos en los estudios de *time-course* se muestran en la **Figura 10**.

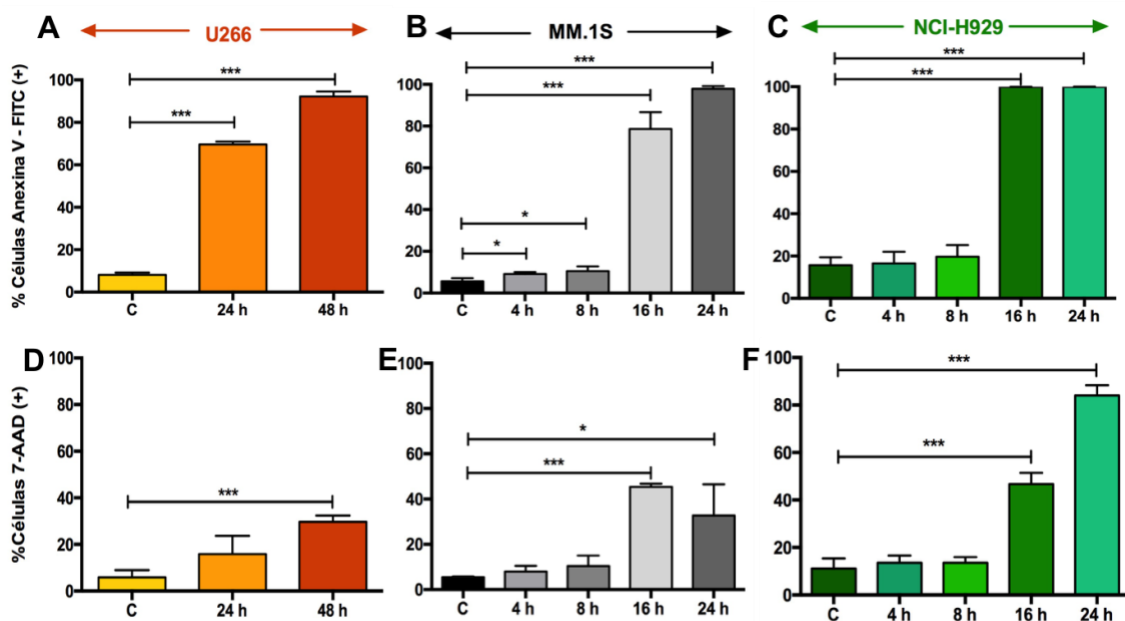


Figura 10: Análisis mediante estudio de tipo *time-course* de la inducción de apoptosis en células de MM humano. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ y se incubaron durante diferentes tiempos y a una concentración 50 nM de Ixazomib. Posteriormente, se analizó la exposición de PS mediante el marcaje con Anexina V – FITC (A)-(C), así como la necrosis celular con 7-AAD (D)-(F). Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control.

Gracias a los ensayos de tipo *time-course* (**Figura 10**) se determinaron los tiempos entre los cuales tenía lugar mayoritariamente el evento apoptótico en cada una de las líneas celulares. A las 24 h

de incubación tanto en la línea NCI-H929 como en MM.1S la totalidad de las células eran apoptóticas, mientras que en la línea U266 dicho porcentaje alcanzó valores del 60%. Tanto en la línea MM.1S como en la línea NCI-H929 el evento apoptótico tiene lugar mayoritariamente entre las 8 y las 16 h de incubación. Los resultados del marcaje de las células con 7-AAD confirman la idea de que la línea NCI-H929 es la más sensible a Ixazomib, ya que es la línea que presenta una cantidad significativamente mayor de células necróticas pasadas 24 h de incubación (*Figura 10(F)*). Una vez que las células entran en apoptosis, poco a poco van perdiendo la integridad de su membrana y su material genético queda expuesto al exterior (que es precisamente lo que indica el marcaje con 7-AAD). Por el contrario, la línea MM.1S, a pesar de que es un poco menos sensible a Ixazomib 50 nM que las células NCI-H929 (*Figuras 8 y 9*), éstas parecen mantener la integridad de su membrana durante un mayor periodo de tiempo (*Figura 10(E)*).

4.2. Análisis del Efecto de Ixazomib en el Ciclo Celular

El proteasoma es el orgánulo celular encargado de la degradación de entre el 80-90% de las proteínas intracelulares [27], entre las que se encuentran las ciclinas, las Cdk1 y otros complejos responsables de la correcta regulación del ciclo celular. Por tanto, la inhibición continuada del proteasoma podría afectar de manera directa a la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular, favoreciendo, por ejemplo, la parada de éste en alguna de las fases como ocurre con el fármaco Carfilzomib donde se observa un incremento de células de MM en fase G2/M tras el tratamiento [49]. Por dicho motivo, se decidió estudiar la distribución del ciclo celular en células control y en células tratadas con Ixazomib.

Para llevar a cabo el análisis del ciclo celular se utilizaron concentraciones de Ixazomib en las que no existiera una elevada muerte celular a 24 h de incubación, de manera que pudiera quedar reflejada la parada del ciclo celular ocasionada por Ixazomib en el caso de que ésta exista. Es decir, se utilizaron concentraciones de Ixazomib que permitan analizar el estado de células en las que se ha conseguido inhibir la actividad del proteasoma y justo antes de entrar en el evento apoptótico. Para determinar dichas concentraciones se utilizó la información obtenida en la *Figura 9*. Concretamente, en las líneas U266 y MM.1S se utilizó Ixazomib a una concentración de 25 nM mientras que la concentración utilizada para la línea NCI-H929 fue de 15 nM. De esta manera se pudo evaluar el efecto Ixazomib en el ciclo celular sin que hubiera muerte celular en un porcentaje elevado. Los resultados obtenidos se detallan en la *Figura 11*.

Las células control de las líneas U266 y MM.1S se encuentran mayoritariamente en la fase G0/G1 del ciclo celular; no es así con la línea NCI-H929 donde las células quedan distribuidas de manera más uniforme entre las fases G0/G1, S y G2/M. Sin embargo, una vez que se las células se trataron con

Ixazomib (a la concentración adecuada para cada línea) se observaron cambios en la distribución de éstas a lo largo del ciclo celular. Concretamente, en las tres líneas se observó un incremento significativo en el porcentaje de células en fases G2/M con una consiguiente disminución de células en fases S y G0/G1 (*Figura 11* y *Tabla A2* del *Anexo II*).

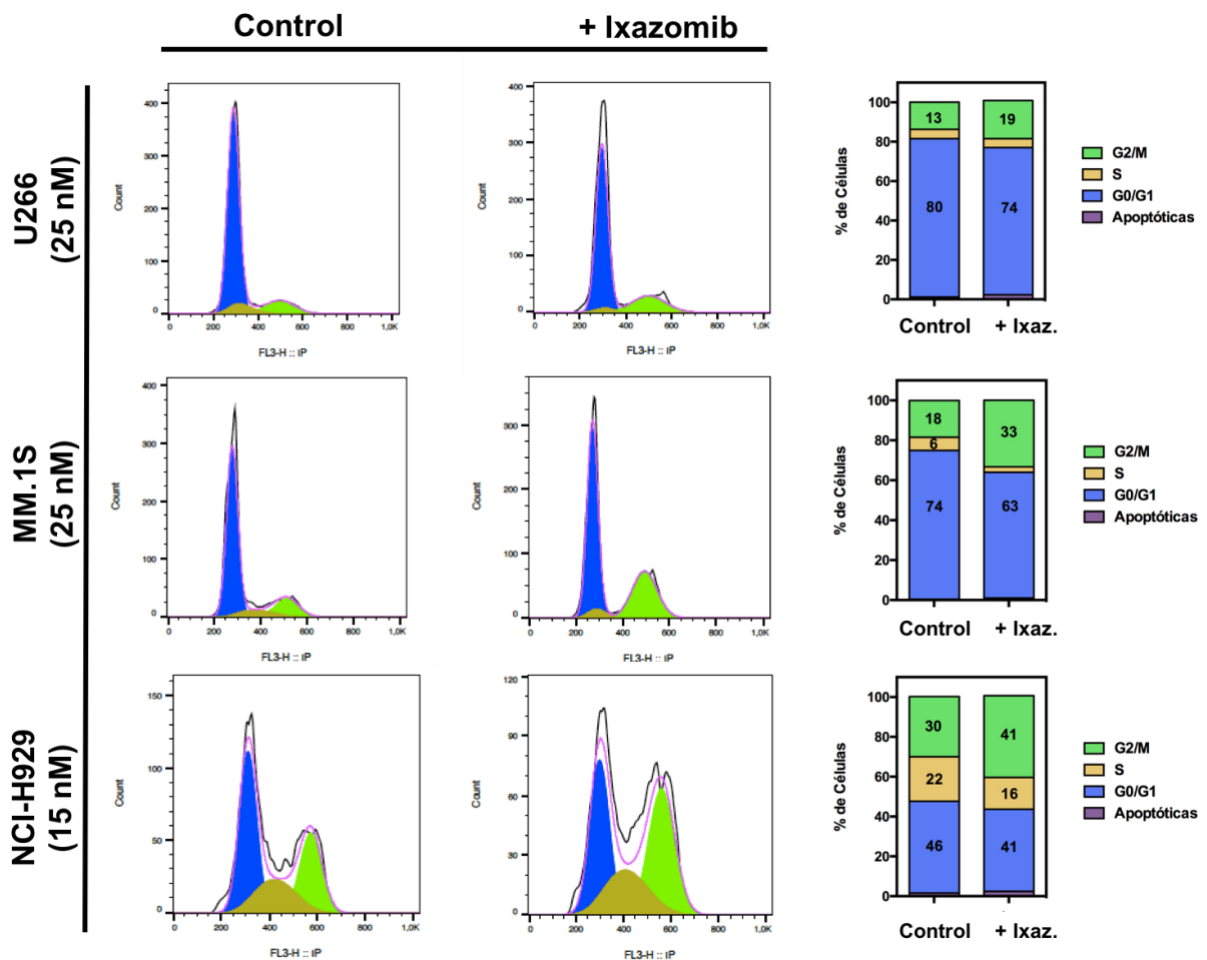


Figura 11. Análisis del ciclo celular de células de MM después del tratamiento con Ixazomib. Las células U266 y MM.1S se trataron con 25 nM de Ixazomib durante 24 h mientras que las células NCI-H929 con 15 nM de Ixazomib también durante 24 h. El ciclo celular (histogramas) se analizó con yoduro de propidio. Las gráficas de la derecha muestran el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular en ausencia o presencia del Ixazomib, analizado con el programa FlowJo 7.6.1. Los histogramas representan los resultados de un experimento representativo de tres realizados. Las gráficas indican el porcentaje de células promedio en cada una de las fases de tres experimentos independientes. Aunque no se indique en los gráficos, en todos los casos las SD obtenidas fueron inferiores al 15%.

La duración de la fase G1 varía en función de la línea celular estudiada. Generalmente, esta fase dura de 8 a 10 h en células de mamífero, aunque puede reducirse a unas pocas horas o alargarse a semanas en incluso meses [51]. En una célula de división rápida modelo con un ciclo celular de unas 24 h, la fase G1 abarcaría alrededor de 11 horas, la fase S unas 8 h, la fase G2 alrededor de 4 h y la fase M apenas 1 h, siendo por tanto la fase G1 la de mayor duración. Por ello, es lógico que la mayor parte de

las células control se encontraran en dicha fase siendo ésta también la fase en que las células crecen y son más activas desde el punto de vista metabólico. Sin embargo, el hecho de que se incremente el número de células en la fase G2/M tras el tratamiento con Ixazomib (*Figura 11*) podría ser consecuencia de un arresto mitótico prologado y ocasionado por la presencia del fármaco, indicando, como conclusión a este apartado, que Ixazomib es capaz de parar el ciclo principalmente en la fase G2/M en células de MM al igual que ocurría con otros PIs como Carfilzomib, Isotiocianato y BSc2118 [49,52]. Además, tal y como recoge Balsas et al., (2012), se encontró una sublínea de RPMI8226 (línea de MM) resistente a Bortezomib que presentaba poliploidía. Este hecho impulsa la idea de que los PIs provocan, mayoritariamente, un arresto del ciclo celular en fase G2/M ya que las células resistentes (poliploides) fueron capaces de escapar del arresto mitótico provocado por Bortezomib e iniciar un nuevo ciclo celular [53].

4.3. Efecto del Ixazomib en los Niveles de Procaspasa 3

Para avanzar en el estudio del mecanismo de inducción de apoptosis desarrollado por Ixazomib se procedió a analizar mediante Western-blot y citometría de flujo la activación de caspasa 3 (o caspasa ejecutora), ya que ésta es esencial y responsable en la ejecución del proceso apoptótico. Para ello las líneas U266 y MM.1S se incubaron a 25 nM de Ixazomib, y a 15 nM en el caso de la línea NCI-H929. Como se ha comentado en el apartado 1.2.2.2., las caspasas se sintetizan como zimógenos, es decir, a modo de pro-enzimas inactivas localizadas en el citoplasma. Esta versión inactiva de las caspasas recibe el nombre de procaspasas. Por tanto, una vez incubadas las células a 0 (control), 6, 24 y 48 h se evaluó la presencia de la procaspasa 3 mediante Western-blot. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 12*.

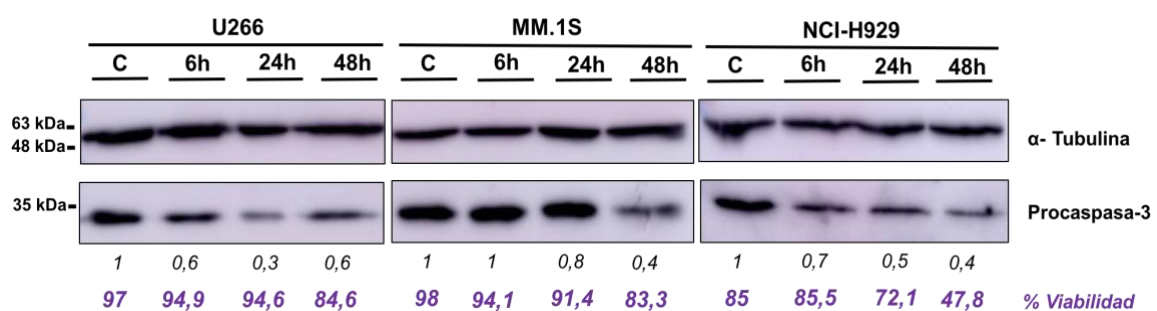


Figura 12: Efecto del Ixazomib en los niveles de procaspasa 3. En este caso las líneas U266 y MM.1S fueron incubadas con una concentración 25 nM de Ixazomib mientras que la línea NCI-H929 se incubó con 15 nM. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h (la viabilidad celular para cada tiempo medida con azul Trypan se indica en morado) para el análisis por Western-blot. Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ.

Como se puede apreciar en la **Figura 12**, la disminución de la procaspasa 3 fue progresiva en el intervalo de tiempo analizado (salvo en la línea U266). Este resultado concuerda con el hecho de que conforme pasa el tiempo vaya disminuyendo la viabilidad celular ya que la procaspasa 3 es proteolizada en caspasa 3 (activa), responsable de la inducción de apoptosis.

Evaluada la disminución progresiva de procaspasa 3 en varias de las líneas celulares mediante Western-blot, se determinó la activación de caspasa 3 mediante un análisis por citometría de flujo. Para ello, se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente a la caspasa 3 activa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**.

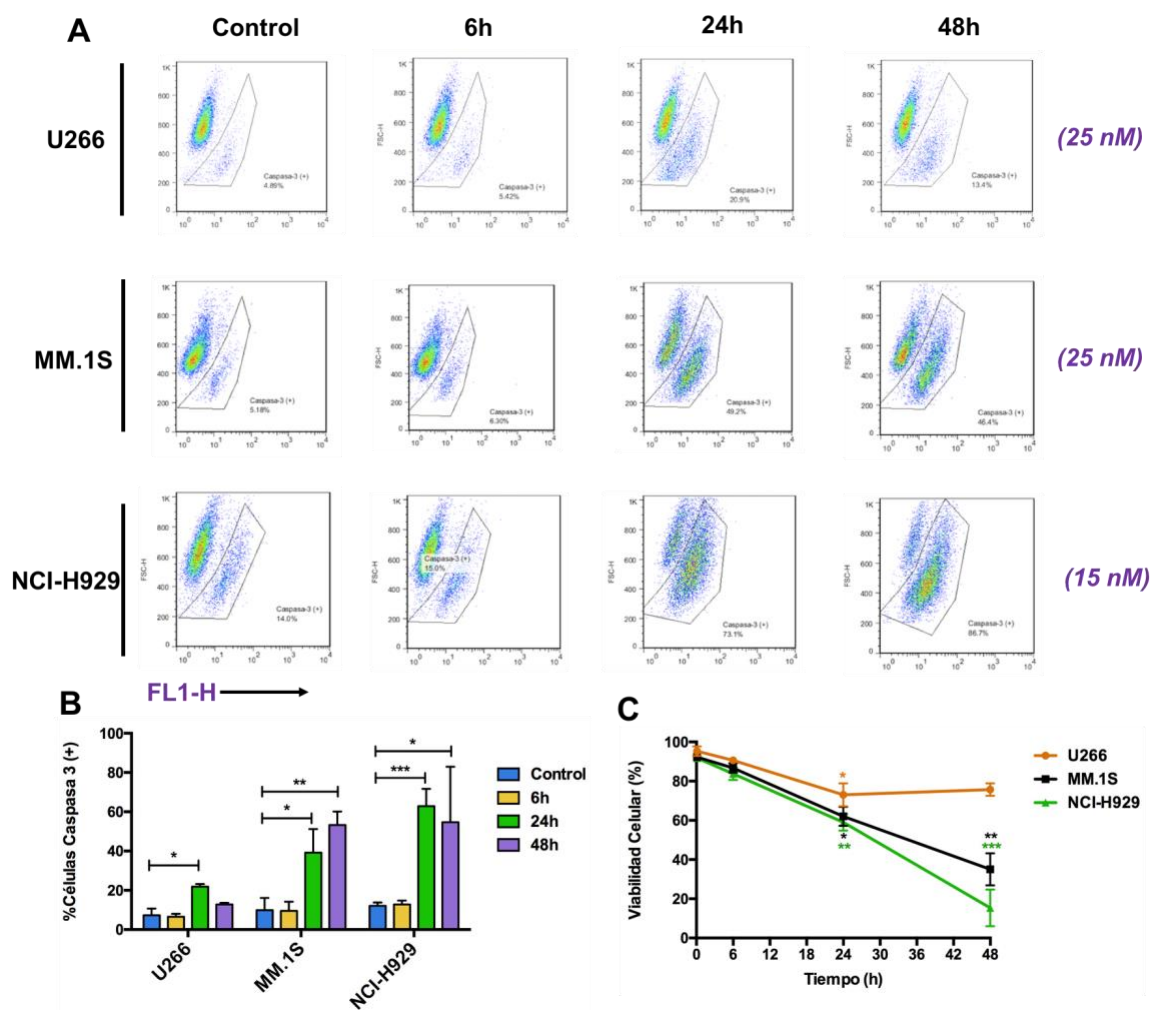


Figura 13: Análisis de activación de la caspasa 3. En este caso las líneas U266 y MM.1S fueron incubadas con una concentración 25 nM de Ixazomib mientras que la línea NCI-H929 se incubó con 15 nM. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h para el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante citometría de flujo. Se muestran los gráficos tipo dot-plot obtenidos para cada línea y en cada una de las situaciones estudiadas. La región del gráfico delimitada por la línea negra corresponde con células positivas para caspasa 3 activa. Se muestran los gráficos obtenidos en un experimento representativo de tres realizados (A). Además, se muestran los porcentajes de células positivas para caspasa 3 obtenidos mediante citometría, a diferentes tiempos y en tres experimentos independientes (B). El análisis estadístico se realizó respecto al control. A la par que se evaluó la activación de la caspasa 3, también se analizó la viabilidad celular mediante marcaje con 7-AAD (C).

Tal y como se observa en la *Figura 13* la presencia de Ixazomib produce la activación de caspasa 3 en todas las líneas celulares estudiadas. En el caso de las líneas MM.1S y NCI-H929 dicha activación es progresiva, es decir, conforme aumenta el tiempo en contacto con Ixazomib la viabilidad decae (*Figura 13(C)*) consecuencia de la activación de caspasa 3 (*Figuras 13(A)* y *13(B)*). Este resultado concuerda con los datos obtenidos mediante Western-blot (*Figura 12*), donde se producía un descenso progresivo de procaspasa 3 en ambas líneas. Posteriormente, cuando se evalúen los niveles de expresión de la proteína PUMA (perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2) habrá que tener en cuenta la activación progresiva de caspasa 3, y por ende, del resto de caspasas, ya que PUMA es una proteína susceptible de ser degradada por este tipo de enzimas tal y como han demostrado otros autores [54-55].

Estudios previos demostraron que la activación de caspasa 3 resultado de la incubación de las líneas MM.1S y NCI-H929 con Bortezomib (7 nM) ocurría de manera mayoritaria a las 12 h de estar en contacto con el fármaco [50]. Es decir, a diferencia de Ixazomib, donde se ha observado una activación progresiva hasta las 24 h de incubación, Bortezomib es capaz de alcanzar niveles máximos de caspasa 3 en un tiempo menor. No ocurre lo mismo con Carfilzomib (7 nM) donde los niveles de caspasa 3 (24 h) en ambas líneas están más reducidos con respecto a los obtenidos a 24 h con Ixazomib [49]. Cabe destacar que se emplearon concentraciones notablemente superiores de Ixazomib en todos los estudios realizados con respecto a las utilizadas en ensayos con otros PIs como Bortezomib y Carfilzomib. Este hecho permite confirmar que, entre los 3 PIs más comunes, Ixazomib constituiría el inhibidor con menor potencia tal y como se ha comentado anteriormente (apartado **4.1**).

Por otro lado, la concentración de Ixazomib utilizada en la línea U266 (25 nM) no fue suficiente para inducir unos niveles de apoptosis adecuados. Además, se observó un descenso en la viabilidad celular hasta las 24 h, y un posterior aumento a las 48 h (*Figura 13(C)*). Esto podría indicar que, al incubar las células con una concentración baja de Ixazomib, aquellas que no mueren inicialmente, se recuperan y continúan proliferando. Esta idea también queda reflejada en los niveles de procaspasa 3 evaluados mediante Western-blot donde se observa un descenso a 24 h (*Figura 12*) que coincide con un aumento significativo de caspasa 3 activa (*Figura 13 (B)*). Finalmente, mediante Western-blot a 48 h la expresión de procaspasa 3 aumenta mientras que por citometría la cantidad de caspasa 3 activa detectada disminuye. Por todo ello, se decidió repetir el experimento con la línea U266 incrementando la dosis de Ixazomib a 50 nM. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 14*.

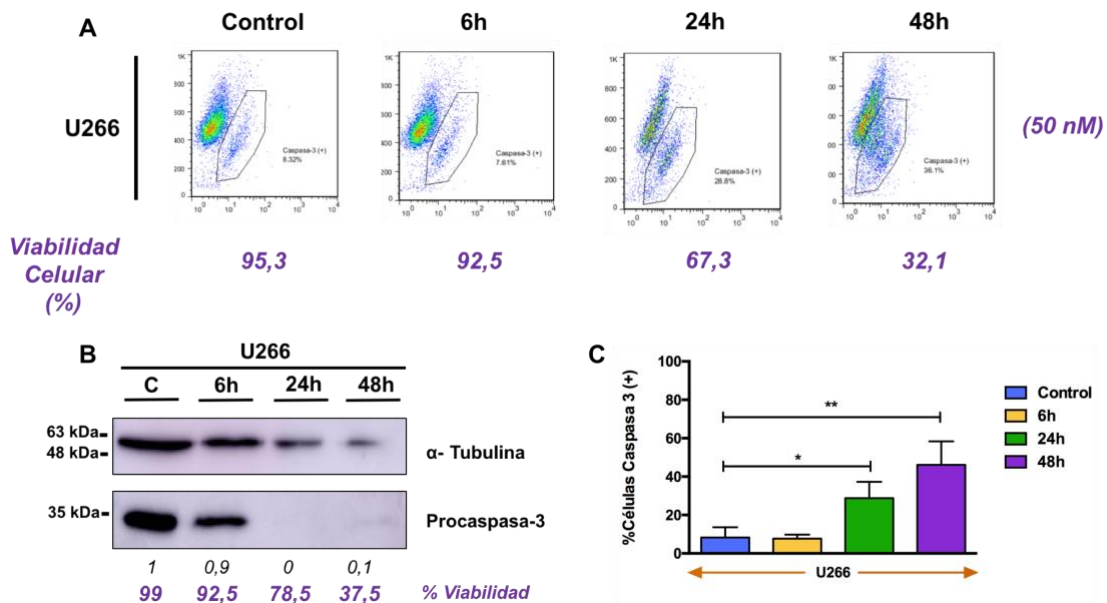


Figura 14: Análisis de activación de la caspasa 3 en la línea U266. La línea U266 se incubó con Ixazomib 50 nM. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h para el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante citometría de flujo y Western-blot. Se muestran los gráficos tipo dot-plot obtenidos para cada línea y en cada una de las situaciones estudiadas. La región del gráfico delimitada por la línea negra corresponde con células positivas para caspasa 3 activa. La viabilidad medida con 7-AAD se indica en morado. Se muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de dos realizados (A). Análisis mediante Western-blot de la procaspasa 3 en células U266 incubadas con Ixazomib 50 nM. Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ (B). Finalmente, se muestran los porcentajes de células positivas para caspasa 3 obtenidos mediante citometría de flujo, a diferentes tiempos y en dos experimentos independientes (C).

La **Figura 14** confirma la activación de caspasa 3 tras la incubación de las células U266 con Ixazomib a una concentración 50 nM. Además, comparándolo con los resultados obtenidos en la **Figura 13** donde se utilizó una concentración 25 nM de Ixazomib, a 50 nM se observó un notable incremento en la activación de caspasa 3 especialmente a 24 y 48 h de incubación. Por otro lado, desapareció la recuperación celular a 48 h que ocurría en los resultados previos y, con esta nueva concentración, la viabilidad celular fue decreciente para todos los tiempos estudiados (evaluada tanto por citometría (**Figura 14(A)**) como por azul Trypan (**Figura 14(B)**)). Otro resultado interesante obtenido en la **Figura 14(B)** está relacionado con el descenso en los niveles de procaspasa 3 especialmente a 24 h, coincidente con un incremento significativo en los niveles de caspasa 3 activa al mismo tiempo (**Figura 18(C)**).

También se estudió la activación de caspasa 3 mediante citometría de flujo en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas zVAD (50 μ M). Tal y como se esperaba, la presencia de zVAD redujo drásticamente la activación de caspasa 3 y ejerció un efecto protector frente a la inducción de apoptosis desarrollada por Ixazomib en todas las líneas celulares (**Figura 15** y **Figura A3 del Anexo III**).

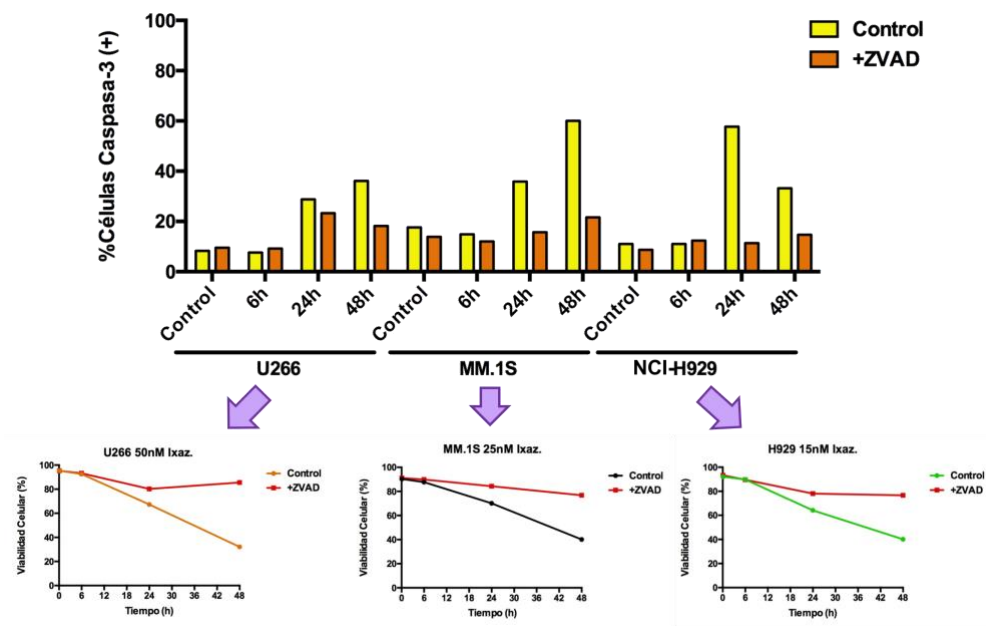


Figura 15: Análisis de activación de la caspasa 3 en presencia o ausencia de zVAD. En este caso la línea U266 se incubó con una concentración 50 nM, la línea MM.1S se incubó con una concentración 25 nM y la línea NCI-H929 se incubó con 15 nM. La activación de caspasa 3 se evaluó en ausencia y presencia de zVAD (50 μ M). Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h para el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de células positivas para caspasa 3 obtenidos mediante citometría y en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas zVAD. A la par que se evaluó la activación de la caspasa 3, también se analizó la viabilidad celular mediante marcaje con 7-AAD.

En conclusión, gracias a los datos complementarios obtenidos mediante dos técnicas, Western-blot y citometría de flujo, ha sido posible estudiar el proceso de activación a lo largo del tiempo de caspasa 3 en diversas líneas de MM humano.

4.4. Participación de las Proteínas de la Familia Bcl-2 en la Muerte Inducida por Ixazomib

Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel relevante en la regulación de la apoptosis tal y como se ha explicado en el apartado 1.2.2.1. El balance final entre las proteínas denominadas como pro-apoptóticas y las anti-apoptóticas determinará que las células acaben entrando, o no, en apoptosis. Por este motivo se analizó mediante Western-blot y citometría de flujo los niveles de expresión de varias proteínas pertenecientes a dicha familia tras tratar con Ixazomib diversas líneas de MM: U266, MM.1S y NCI-H929. Las células se incubaron con Ixazomib durante 0 (control), 6, 24 y 48 h y al igual que ocurría en el análisis del ciclo celular, cada línea se incubó con una dosis diferente de Ixazomib en función del nivel de sensibilidad a éste. Además, a cada uno de los tiempos estudiados se evaluó la viabilidad celular gracias al conteo con azul Trypan (Western-blot) y con 7-AAD (citometría de flujo). Para facilitar el análisis, se comentarán los resultados obtenidos por Western-blot y citometría de flujo de cada línea por separado.

4.4.1. Análisis de proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma U266

En un primer ensayo la línea U266 se incubó a una concentración sub-citotóxica de Ixazomib (25 nM) para evaluar las proteínas de la familia Bcl-2 implicadas. Los resultados obtenidos tanto por Western-blot como por citometría se muestran en la *Figura 16*.

Lo primero que llama la atención es el hecho de que la viabilidad celular (evaluada tanto con el método Azul Trypan (*Figura 16(A)*) como por citometría de flujo y 7-AAD (*Figura 16(C)*) apenas se vio afectada con la concentración de Ixazomib utilizada. Si se observan los resultados obtenidos por Western-blot (*Figura 16(A)*), se puede llegar a varias conclusiones: por un lado, se produjo un aumento a 24 y 48 h de la proteína Bcl-X_L así como a 48 h de la proteína Bcl-2, ambas de carácter anti-apoptótico, y, posiblemente, responsables de la supervivencia celular. Por otro lado, también mediante Western-blot, se observó un incremento muy significativo de la proteína PUMA (de carácter pro-apoptótico) y que podría compensar el efecto de Bcl-X_L y Bcl-2.

El anticuerpo anti-PUMA utilizado en citometría genera dos picos: un pico más negativo correspondiente con células PUMA negativas (células carentes de PUMA o que han proteolizado PUMA debido a la activación de caspasas) y un pico más a la derecha de células PUMA positivas. Una manera cuantitativa de analizar estos gráficos es analizando el valor MFI (MFI: *Mean Fluorescence Intensity*) indicativo de la intensidad media de fluorescencia existente en el canal del citómetro, es decir, determina la media del pico de fluorescencia generado en un canal concreto. En el caso de PUMA, el valor de MFI del pico más positivo puede considerarse indicativo de los niveles de PUMA intacta (*Figura 16(B)*). Al analizar los resultados obtenidos mediante citometría, se observó un incremento de PUMA, aunque igual no tan significativo como el obtenido mediante Western-blot. Por ello, es coherente pensar que el repunte de viabilidad celular que se observa entre las 24 y 48 h de incubación con Ixazomib pudiera estar favorecido por el efecto anti-apoptótico ejercido por la sobreexpresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L que compensan la leve inducción de PUMA obtenida mediante citometría. En paralelo, también se evaluó la expresión de la proteína Noxa mediante citometría de flujo ya que mediante Western-blot no fue posible detectarla. A diferencia de PUMA, el anticuerpo utilizado para Noxa solo genera un pico. Por tanto, lo que se evalúa en este caso es el desplazamiento del pico con respecto a las células control utilizando el parámetro de MFI anteriormente mencionado. Observando la *Figura 16(B)*, la variación de Noxa fue mínima e incluso decreciente a 48 h de incubación tal y como queda recogido en los valores de MFI obtenidos. Estos resultados tan poco significativos respecto al cambio de Noxa indican que la dosis de 25 nM fue insuficiente para inducir un aumento en los niveles de expresión de dicha proteína.

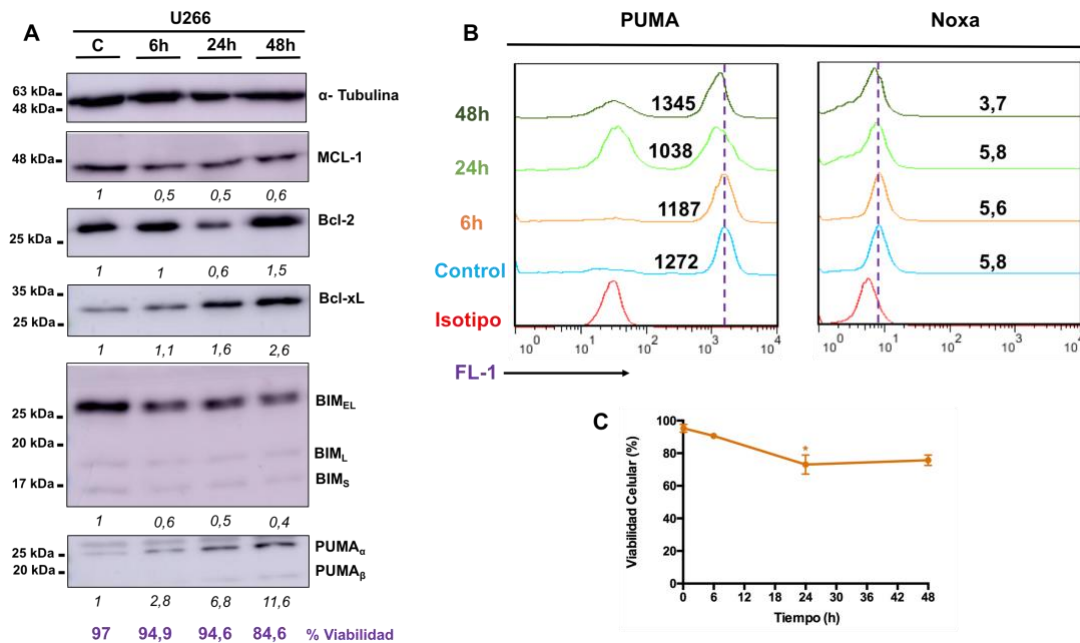


Figura 16: Efecto de Ixazomib en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. En este caso la línea U266 se incubó con una concentración 25 nM de Ixazomib. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h (la viabilidad celular para cada tiempo medida con azul Trypan se indica en morado) para el análisis por Western-blot de la expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL, Bim, PUMA y Noxa (aunque de esta última no se obtuvo resultado). Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ (A). Niveles de expresión obtenidos para las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo. La línea discontinua indica la posición central del pico correspondiente al control (B). Se indican los valores de MFI obtenidos para los picos correspondientes con células PUMA y Noxa positivas en cada una de las situaciones estudiadas. Por último, se muestran las viabilidades celulares obtenidas con 7-AAD en los experimentos de citometría de flujo (C).

Teniendo en cuenta que con la concentración de Ixazomib utilizada apenas produjo apoptosis en la línea U266 (**Figura 16 (C)**) se procedió a realizar experimentos con una concentración superior del fármaco con la que se asegurase la inducción de apoptosis en dicha línea y pudiera ser comparable con estudios previos realizados con otros PIs. Para ello, se evaluaron de nuevo los resultados obtenidos en las **Figuras 8 y 9** y se decidió repetir los experimentos a una concentración de Ixazomib 50 nM. De esta manera se pretendía evitar el fenómeno de “recuperación” de la viabilidad celular observado mediante citometría entre las 24 y 48 h (**Figura 16(C)**). Además, se optó por realizar el estudio de citometría de flujo en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas zVAD a una concentración de 50 μM. Los resultados obtenidos para este nuevo experimento se muestran en la **Figura 17**.

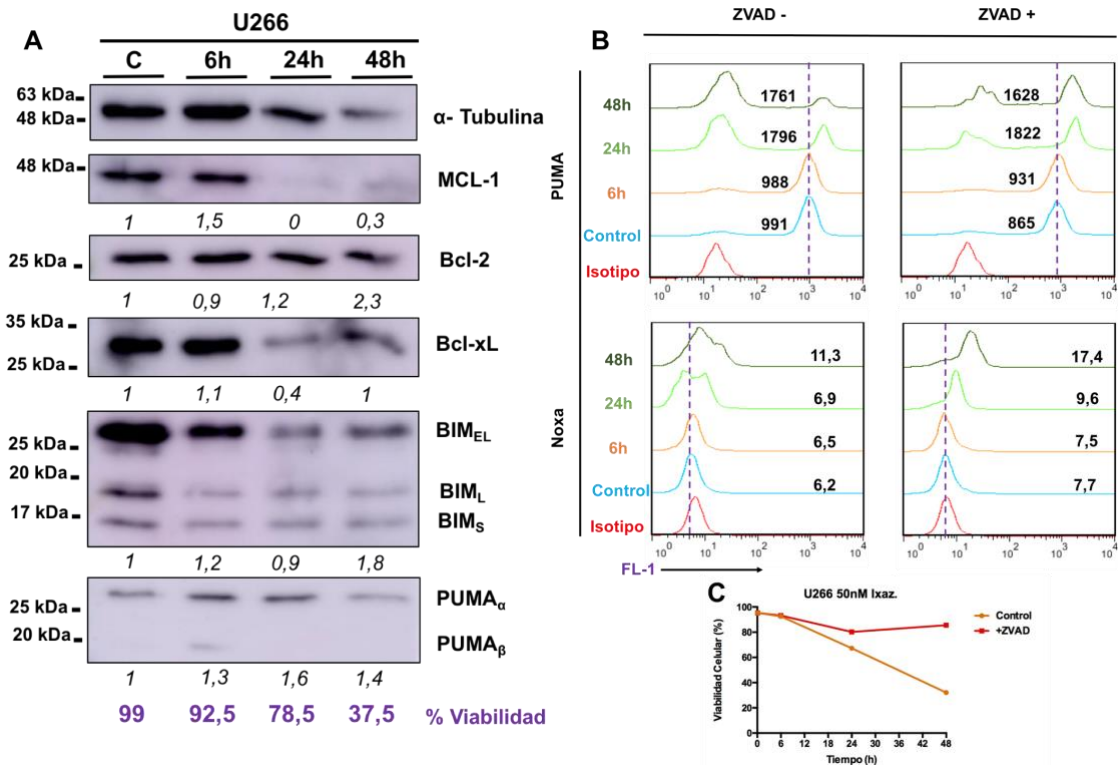


Figura 17: Efecto de Ixazomib en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. En este caso la línea U266 se incubó con una concentración 50 nM de Ixazomib. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h (la viabilidad celular para cada tiempo medida con azul Trypan se indica en morado) para el análisis por Western-blot de la expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, PUMA y Noxa (aunque de esta última no se obtuvo resultado). Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ (A). Niveles de expresión obtenidos para las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo. La línea discontinua indica la posición central del pico correspondiente al control (B). Se indican los valores de MFI obtenidos para los picos correspondientes con células PUMA y Noxa positivas en cada una de las situaciones estudiadas y en presencia o ausencia de zVAD. Por último, se muestran las viabilidades celulares obtenidas con 7-AAD en los experimentos de citometría de flujo en presencia (rojo) o ausencia (naranja) del inhibidor general de caspasas zVAD (C).

Como puede observarse en la **Figura 17**, utilizando una concentración 50 nM de Ixazomib se consiguió inducir el suficiente nivel de apoptosis en la línea U266 para el correcto análisis de este tipo de experimentos. A partir de la **Figura 17(A)** cabe destacar varias cosas; inicialmente, la caída en cuanto a expresión que sufrieron las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl-X_L a las 24 h de incubación, tiempo al que también se observó un máximo en los niveles de la proteína PUMA, una situación muy similar a lo que ocurre si se incuban estas mismas células con Carfilzomib (7nM) [49]. A las 48 h de incubación se produjo una reducción drástica de la viabilidad celular acompañada con una reducción en la cantidad de proteína (obsérvese el control de tubulina a 48 h en la **Figura 17(A)**). Es a ese mismo tiempo cuando parece que aumentó la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L; probablemente dicho incremento corresponda con aquellas células que han resistido la acción de Ixazomib y comienzan a proliferar del nuevo.

En cuanto a los niveles de expresión de PUMA obtenidos mediante citometría, en ausencia de zVAD se observó un incremento máximo de PUMA a las 24 h y una reducción de ésta a las 48 h, coincidente con los resultados obtenidos mediante Western-blot y con el fenómeno de activación de caspasas evaluado mediante citometría. Esta idea quedó confirmada gracias a la realización de un experimento complementario en el que se usó zVAD (inhibidor general de caspasas) que favorece la acumulación de PUMA (*Figura 17(B)*) ya que al utilizarlo se evitó la degradación de PUMA asociada a la acción de las caspasas y el pico de células PUMA positivas alcanzó valores máximos de expresión (24 h) superiores con respecto a la situación sin zVAD. La presencia de zVAD protegió de manera importante la inducción de apoptosis en las células especialmente a las 48 h de incubación. Todo ello hace indicar que PUMA estaría implicada en el mecanismo apoptótico inducido por Ixazomib y concuerda con resultados previos que indican que la apoptosis inducida por PIs es generalmente PUMA-dependiente [56].

En el caso de Noxa tan solo se pudo estudiar mediante citometría de flujo. Apenas hubo variaciones significativas en su expresión, salvo a las 48 h donde se observó un incremento importante. Por tanto, Noxa también podría participar en el mecanismo apoptótico inducido por Ixazomib en la línea U266, pero a tiempos largos de incubación (en este caso 48 h). Estos resultados coinciden con algunos estudios previos los cuales apuestan por la implicación directa de Noxa en la apoptosis inducida por PIs en células de MM [57]. Al contrario que PUMA, Noxa no es sustrato de caspasas, de ahí que la presencia de zVAD no afecte, en principio, a los niveles de Noxa en comparación con una situación control; sin embargo, en los ensayos realizados se observó que zVAD provocó una mayor acumulación de Noxa con respecto a la situación sin zVAD (*Figura 17(B)*) tal y como reflejan los valores de MFI obtenidos. Una posible explicación de este fenómeno es que al inhibir con zVAD la acción de las caspasas la apoptosis no se puede ejecutar, pero sí que se pueden inducir los elementos implicados en dicho proceso, de ahí que Noxa se acumule. Otra posible explicación es que zVAD ralentiza considerablemente la fase de ejecución y dismantelamiento de las estructuras celulares, reduciendo notablemente la pérdida general de proteínas que se suele observar en las etapas tardías de la apoptosis y durante la fase de necrosis. Ambas propuestas podrían explicar por qué se observó una mayor acumulación de Noxa en presencia de zVAD teniendo en cuenta que ésta no es sustrato de caspasas.

En conclusión, la caída de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl-X_L a 24 y 48 h de incubación, junto con el incremento de las proteínas pro-apoptóticas PUMA (24 h) y Noxa (48 h) podría estar detrás del mecanismo que desarrolla Ixazomib para inducir apoptosis en la línea de mieloma U266.

4.4.2. Análisis de proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma MM.1S

Se incubaron células de mieloma MM.1S con una concentración 25 nM de Ixazomib y se evaluó la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 en el mecanismo de inducción de apoptosis. Los resultados obtenidos en la evaluación de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, PUMA y Noxa mediante Western-blot, así como el estudio de las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo, quedan recogidos en la *Figura 18*.

Como puede observarse en las *Figura 18(A)* y *18(C)*, existe una notable diferencia entre las viabilidades obtenidas mediante el método del azul Trypan y la citometría de flujo. Dado que los ensayos de citometría y los de Western-blot fueron independientes podría existir la posibilidad de que en los experimentos de citometría las células estuvieran más sensibilizadas al tratamiento con Ixazomib y de ahí las diferencias significativas en viabilidad observadas mediante azul Trypan y 7-AAD. En definitiva, tal y como queda demostrado por citometría de flujo, la inducción de apoptosis desarrollada por Ixazomib a 25 nM parece ser suficiente como para poder estudiar el mecanismo de acción del fármaco en células MM.1S. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 18*.

En la *Figura 18(A)* se observan patrones diferentes de comportamiento entre las proteínas estudiadas. Por un lado, la proteína Bcl-X_L experimentó una bajada de expresión a las 6 h seguida de un aumento a las 24 h y se mantuvo constante hasta las 48 h. Por otro, la expresión de las proteínas Mcl-1 (anti-apoptótica) y Bim (pro-apoptótica) fue máxima a las 24 h de incubación y se redujo a las 48 h. Este mismo comportamiento de Bim también se observó al tratar células MM.1S con Carfilzomib [49]. Dado que los cambios más notables tienen lugar en las proteínas Mcl-1 y Bim, todo parece indicar que el mecanismo de inducción de apoptosis asociado a Ixazomib en células MM.1S tiene un protagonista principal durante las primeras 24 h de incubación: el par Mcl-1/Bim. Finalmente, a las 48 h, se observó un incremento en la expresión de la proteína pro-apoptótica PUMA mediante Western-blot. Dicha inducción debería ser la responsable de romper el equilibrio del par Mcl-1/Bim y favorecer la entrada en apoptosis de las células reflejada en una disminución en el porcentaje de células viables.

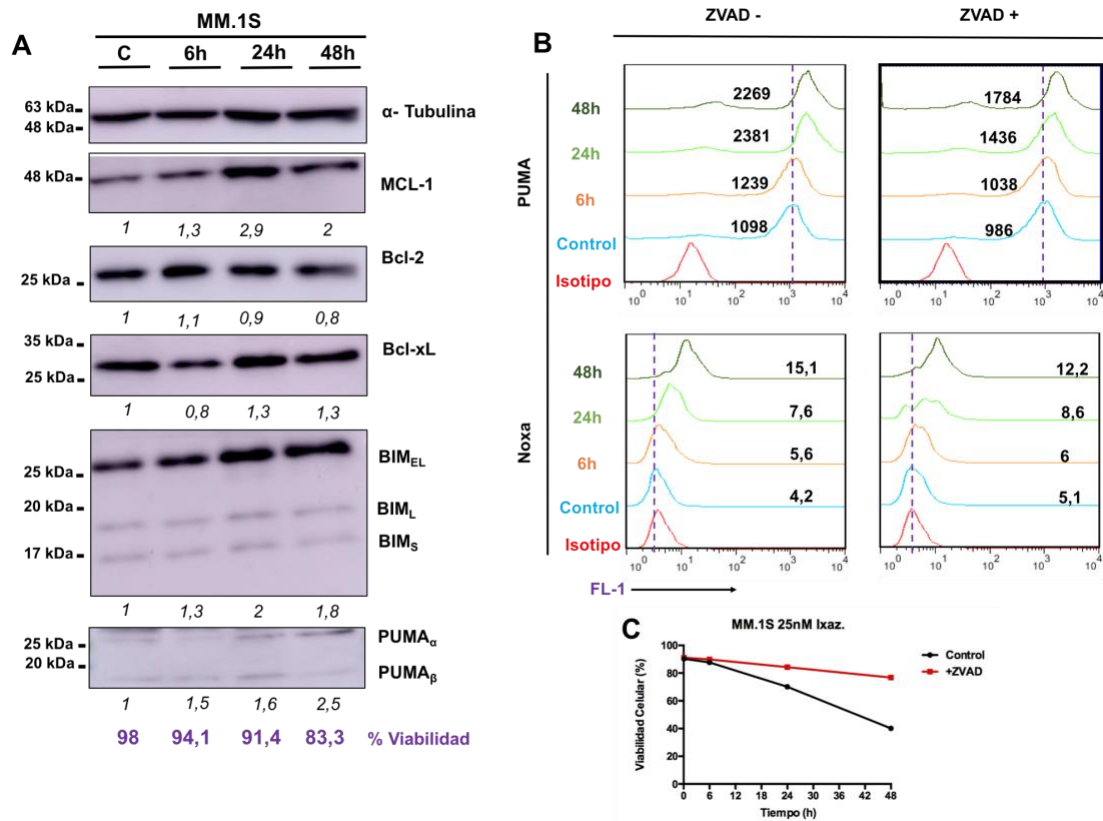


Figura 18: Efecto de Ixazomib en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. En este caso la línea MM.1S se incubó con una concentración 25 nM de Ixazomib. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h (la viabilidad celular para cada tiempo medida con azul Trypan se indica en morado) para el análisis por Western-blot de la expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, PUMA y Noxa (aunque de esta última no se obtuvo resultado). Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ (A). Niveles de expresión obtenidos para las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo. La línea discontinua indica la posición central del pico correspondiente al control (B). Se indican los valores de MFI obtenidos para los picos correspondientes con células PUMA y Noxa positivas en cada una de las situaciones estudiadas y en presencia o ausencia de zVAD. Por último, se muestran las viabilidades celulares obtenidas con 7-AAD en los experimentos de citometría de flujo en presencia (rojo) o ausencia (negro) del inhibidor general de caspasas zVAD (C).

El incremento de PUMA también fue detectado mediante los estudios de citometría de flujo (Figura 18(B)), acompañado de una reducción más drástica de la viabilidad celular. A diferencia de los resultados obtenidos mediante Western-blot, en los cuales el máximo ratio de PUMA ocurrió a las 48 h de incubación, mediante citometría se detectó un incremento máximo a las 24 h que acabó en un leve descenso a las 48 h. Como se ha comentado anteriormente con la línea U266, PUMA es sustrato de caspasas por lo que, en teoría, el comportamiento obtenido mediante citometría sería el más adecuado teniendo en cuenta que la activación de caspasa 3 (y por ende, del resto de caspasas) quedó confirmada mediante citometría en la Figura 13. Además, este comportamiento de PUMA es bastante similar al observado tras tratar las células con Carfilzomib donde también se propuso un máximo de expresión a las 24 h [49]. Los niveles de PUMA con zVAD en la línea U266 predominaron frente a la situación sin zVAD, sin embargo, en la línea MM.1S éstos fueron mayores en ausencia de zVAD. No obstante, el

descenso en los niveles de PUMA entre 24 y 48 h de incubación (asociada a la activación de caspasas) no se detectó en presencia de zVAD. Esto indica que zVAD evitó de manera efectiva la activación de caspasas y la consiguiente degradación de PUMA en células MM.1S (*Figura 15*) en comparación con la línea U266 en la cual sí tuvo lugar el descenso de los niveles de PUMA en presencia de zVAD entre las 24 y 48 h (*Figura 17(B)*).

Dado que no se obtuvo resultado en el análisis de Noxa mediante Western-blot, se volvió a analizar su expresión mediante citometría. Al igual que ocurría con la línea U266 ésta incrementó su expresión a lo largo del tiempo dado que se trata de una proteína pro-apoptótica, y, por tanto, conforme disminuyó la viabilidad celular, la expresión de Noxa aumentó. Sin embargo, su acumulación fue menor en presencia de zVAD, al contrario de lo que ocurría con la línea U266. Esta diferencia probablemente se deba a que los niveles de inducción de apoptosis en la línea MM.1S no fueron tan drásticos como los observados en las células U266 donde se utilizó una concentración de Ixazomib 50 nM, y, por tanto, no se produjo una acumulación tan evidente de Noxa. Aun así, todo parece indicar que, al igual que ocurre con Carfilzomib [49] y otros PIs [57], Noxa podría estar implicada en el mecanismo de inducción de apoptosis desarrollado por Ixazomib en células MM.1S y esto habría que verificarlo mediante experimentos de silenciamiento génico.

En conclusión, la apoptosis inducida por Ixazomib en la línea MM.1S parece tener un primer momento donde el par Mcl-1/Bim juega un papel clave (24 h). Esta situación acaba derivando en un incremento de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas PUMA (24 h) y Noxa (48 h) que culminarían el proceso apoptótico.

4.4.3. Análisis de las proteínas de la familia Bcl-2 en la línea de mieloma NCI-H929

Al igual que con las líneas U266 y MM.1S, se evaluó la participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la línea NCI-H929. Dado que ésta es una línea más sensible que las anteriormente estudiadas, se utilizó una concentración de Ixazomib inferior; concretamente, los experimentos se realizaron con una concentración 15 nM. Los resultados obtenidos en la evaluación de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, PUMA y Noxa mediante Western-blot, así como el estudio de las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo, quedan recogidos en la *Figura 19*.

Como puede observarse en la *Figura 19(A)* todas proteínas anti-apoptóticas estudiadas (Mcl-1, Bcl-X_L y Bcl-2) siguieron un mismo patrón de comportamiento: experimentaron un descenso a las 6 h de incubación, volviéndose a activarse su expresión a las 24 h en contacto con el fármaco. Este fenómeno correlaciona con los datos de viabilidad obtenidos mediante azul Trypan donde entre las 6 y las 24 h apenas descendió la viabilidad. Sin embargo, transcurridas 48 h, de las tres proteínas que habían

experimentado dicha variación, solo Mcl-1 siguió aumentando. Tanto Bcl-2 como Bcl-X_L redujeron su expresión. En paralelo, la reducción observada a las 48 h de proteínas anti-apoptóticas correlaciona con el periodo de tiempo (entre 24 y 48 h de incubación) en el cual se produjo una reducción más drástica de la viabilidad celular. En cuanto a las proteínas pro-apoptóticas, destaca el aumento de Bim a las 48 h, así como un aumento creciente de PUMA a lo largo de los tiempos estudiados. De todas las proteínas comentadas hasta este momento, solo Bim desarrolló un comportamiento semejante al obtenido en células de MM tras el tratamiento con Carfilzomib [49].

En este caso se pudo detectar la presencia de Noxa mediante Western-blot, aunque sí que es cierto que solo a 24 y 48 h de incubación. En este sentido, y pese a no poder realizar una cuantificación respecto a la situación control, en la *Figura 19(A)* puede intuirse un leve incremento de Noxa mediante Western-blot entre las 24 y las 48 h. Al tratarse Noxa de una proteína pro-apoptótica, su aumento a 48 h estaría acorde con la teoría de que en la línea NCI-H929 lo que ocurre es una reducción a las 48 h de las proteínas anti-apoptóticas y un aumento de las pro-apoptóticas que conlleva la entrada en apoptosis.

Al igual que con el resto de líneas de MM, se estudió la expresión de PUMA y Noxa mediante citometría de flujo (*Figura 19(B)*). La ventaja que presenta esta línea con respecto a las otras dos estudiadas es que se obtuvieron datos de la expresión de PUMA y Noxa mediante Western-blot y citometría, así que puede llevarse a cabo una comparación entre ambas técnicas. Mediante Western-blot se observó un incremento progresivo en los niveles de PUMA, sin embargo, mediante citometría se obtuvo un incremento máximo a las 24 h y una reducción de ésta a las 48 h. En principio, y siguiendo el mismo razonamiento que con el resto de líneas celulares, los resultados de citometría parecen ser más fiables ya que se trata de una técnica más sensible y está más acorde con la idea teórica que se tiene en cuanto a cómo actúa PUMA en el proceso de inducción de apoptosis, experimentando inicialmente una subida que favorece el proceso apoptótico, y, una vez que se produce activación de caspasas, éstas la degradan. Además un comportamiento similar se observó en presencia de Carfilzomib [49]. Esta idea quedó confirmada realizando el mismo experimento, pero en presencia de zVAD, en el cual a pesar de obtenerse valores más bajos de MFI apenas se aprecia el pico correspondiente a las células PUMA negativas tanto a 24 como a 48 h de incubación.

En paralelo, también se evaluó la expresión de Noxa mediante citometría. Ésta fue creciente a lo largo de los tiempos estudiados y, al igual que ocurría con la línea U266, hubo una mayor acumulación de Noxa en presencia de zVAD que en su ausencia, aunque se sabe que Noxa no es sustrato de caspasas. La ventaja de esta línea es que, además de los resultados de citometría, también se obtuvieron datos de Noxa mediante Western-blot. Por ambas técnicas se observó un incremento de los niveles de Noxa dependientes del tiempo de incubación con Ixazomib así que, en principio, Noxa podría tener un papel relevante en la apoptosis inducida por Ixazomib en la línea NCI-H929 al igual que ocurre con otros PIs.

[57]. De nuevo esta implicación habría que verificarla con experimentos complementarios de silenciamiento génico.

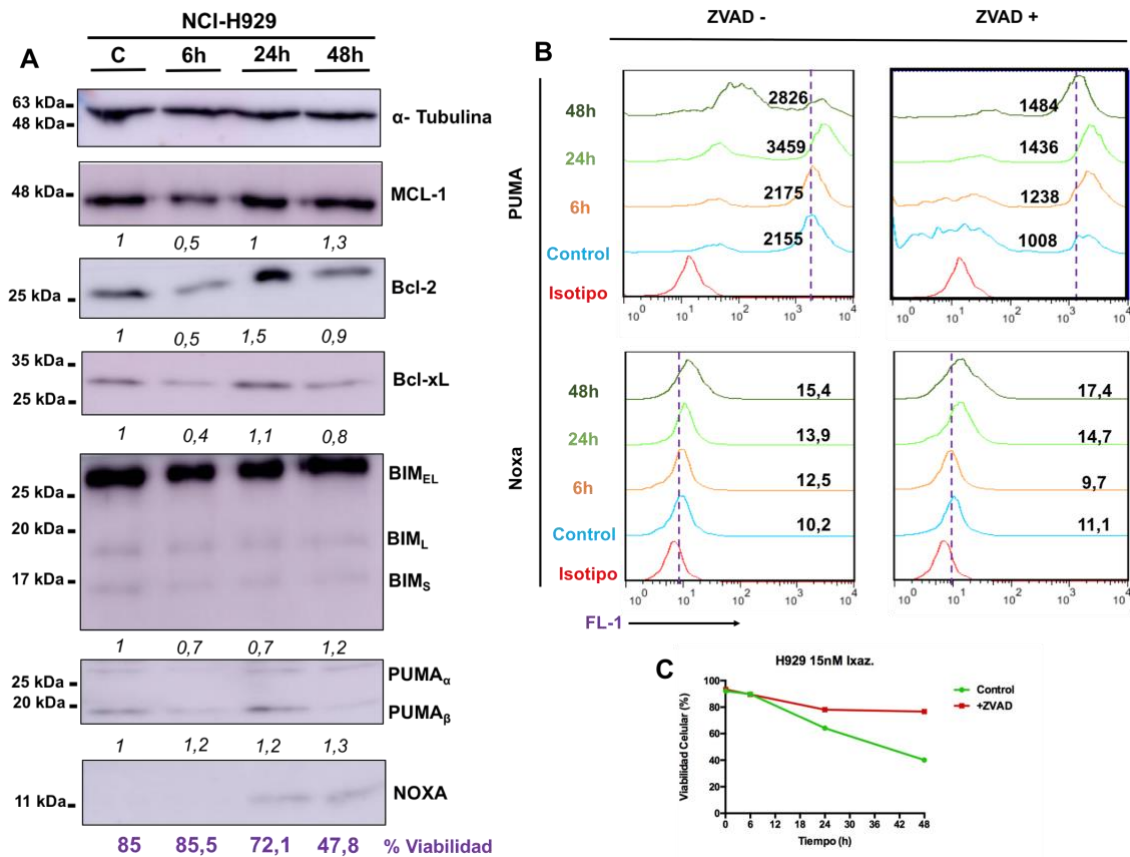


Figura 19: Efecto de Ixazomib en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. En este caso la línea NCI-H929 se incubó con una concentración 15 nM de Ixazomib. Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h (la viabilidad celular para cada tiempo medida con azul Trypan se indica en morado) para el análisis por Western-blot de la expresión de las proteínas Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bim, PUMA y Noxa. Como control de carga se utilizó tubulina. Los números en cursiva indican los valores de expresión de cada proteína respecto al ratio proteína/tubulina obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software ImageJ. En el caso de Noxa como no se aprecia banda en la situación control ni a las 6 h de incubación no se pudo cuantificar el cambio de expresión respecto a la situación control (A). Niveles de expresión obtenidos para las proteínas PUMA y Noxa mediante citometría de flujo. La línea discontinua indica la posición central del pico correspondiente a la situación control (B). Se indican los valores de MFI obtenidos para los picos correspondientes con células PUMA y Noxa positivas en cada una de las situaciones estudiadas y en presencia o ausencia de zVAD. Por último, se muestran las viabilidades celulares obtenidas con 7-AAD en los experimentos de citometría de flujo en presencia (rojo) o ausencia (verde) del inhibidor general de caspasas zVAD (C).

Por tanto, se puede concluir que, en la línea NCI-H929, existe un equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas (Mcl-1, Bcl-X_L y Bcl-2) y pro-apoptóticas (Bim, PUMA y Noxa) a las 24 h de incubación consecuente con una reducción leve de la viabilidad celular. A las 48 h este equilibrio se rompe (evidenciado por la reducción en la viabilidad celular analizada tanto con azul Trypan como por citometría) debido a dos motivos: (I) reducción de los niveles de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X_L) y (II) aumento de las proteínas pro-apoptóticas Bim, y, más notablemente, PUMA y Noxa.

4.5. Análisis de Efectos Sinérgicos entre Ixazomib y otros Fármacos

Actualmente existen multitud de estrategias enfocadas al tratamiento del MM. Muchas de estas estrategias terapéuticas utilizan los PIs como pilar fundamental, y, sobre esta base, se intenta combinar otros fármacos que potencien el efecto antitumoral. En este sentido, la mayoría de estudios básicos se han centrado en combinar PIs (pj. bortezomib y carfilzomib), con otros fármacos tales como los inhibidores de VCP/p97 (pj. DBeQ), e incluso también con glucocorticoides sintéticos (pj. dexametasona) [58]. Sin embargo, la reciente aprobación de Ixazomib para el tratamiento del MM hace que existan muy pocos estudios centrados en dicho fármaco y en su posible acción combinatoria con otros. Por tanto, se procedió al análisis básico de la muerte inducida por Ixazomib en combinación con otros fármacos. Concretamente se evaluaron las posibles sinergias entre Ixazomib con DBeQ, CB-5083 y cloroquina.

4.5.1. Estudio del posible efecto sinérgico entre Ixazomib e inhibidores de VCP/p97 (DBeQ y CB-5083)

La inducción de apoptosis en células tumorales podría producirse con la administración de un único fármaco. Sin embargo, si la combinación de dos fármacos conlleva un efecto sinérgico, sería posible la administración de bajas dosis de cada uno de ellos, lográndose un mayor efecto terapéutico y con una disminución de los efectos adversos. Por ello, es fundamental el estudio de actuaciones sinérgicas entre fármacos para el tratamiento del MM.

Como ya se ha comentado anteriormente, VCP/p97 es una proteína de la familia AAA que participa en el proceso de degradación asociado al ER, a través del sistema ubiquitina-proteasoma, uniéndose directa o indirectamente a moléculas marcadas con ubiquitina y favoreciendo su transferencia al sistema de degradación asociado al proteasoma 26S [41-42]. Se han identificado varios inhibidores de la actividad ATPasa de VCP/p97, entre los que destacan DBeQ que inhibe de manera reversible a VCP/p97 e induce estrés en el ER, y CB-5083 que desempeña la misma función que DBeQ pero de manera mucho más selectiva [41]. Estudios previos de nuestro laboratorio ya habían determinado la concentración óptima de DBeQ (2,5 μM) para la evaluación de posibles sinergias con otros fármacos, sin embargo, esto no ocurría con el inhibidor CB-5083. Por tanto, se evaluó la sensibilidad de las líneas de mieloma a la acción del inhibidor CB-5083. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 20**. Las concentraciones de Ixazomib utilizadas fueron las mismas que las empleadas en experimentos anteriores: 25 nM en el caso de las líneas U266 y MM.1S y 15 nM en el caso de NCI-H929. Una vez identificadas las concentraciones óptimas de CB-5083 (1 μM en la línea U266, 0,9 μM en el caso de MM.1S y 0,3 μM en el caso de NCI-H929) se procedió al análisis de posibles sinergias entre Ixazomib y los inhibidores de VCP/p97. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figuras 21 y 22**.

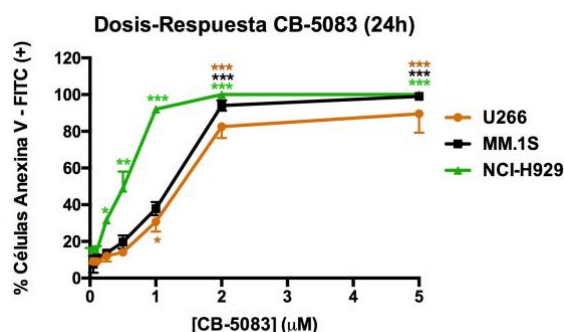


Figura 20: Análisis de la apoptosis inducida por CB-5083 en líneas de MM humano. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h a concentraciones crecientes de CB-5083 (0 – 5 μM). Se analizó la apoptosis por la exposición de la PS mediante el marcaje con Anexina V – FITC. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control.

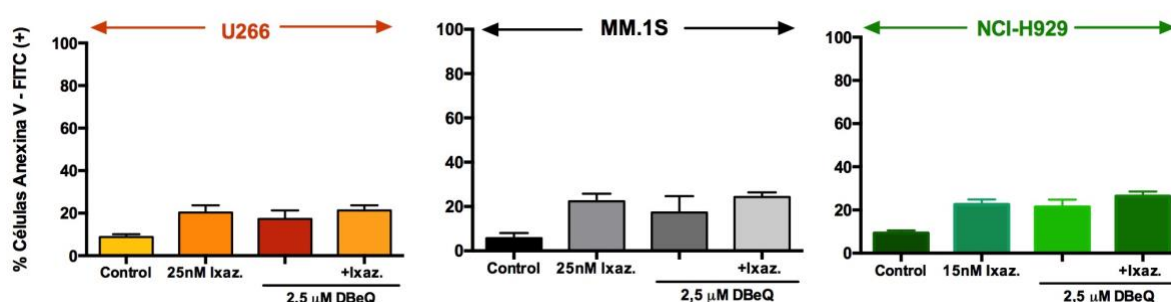


Figura 21: Efecto de la combinación de Ixazomib y DBeQ. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h con Ixazomib a las concentraciones indicadas. Todas las líneas se incubaron con $2,5 \mu M$ de DBeQ. Tras 24 h de incubación se cuantificó por citometría de flujo mediante Anexina V – FITC. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control para los fármacos individuales y respecto a la acción de los fármacos individuales en la situación de combinación.

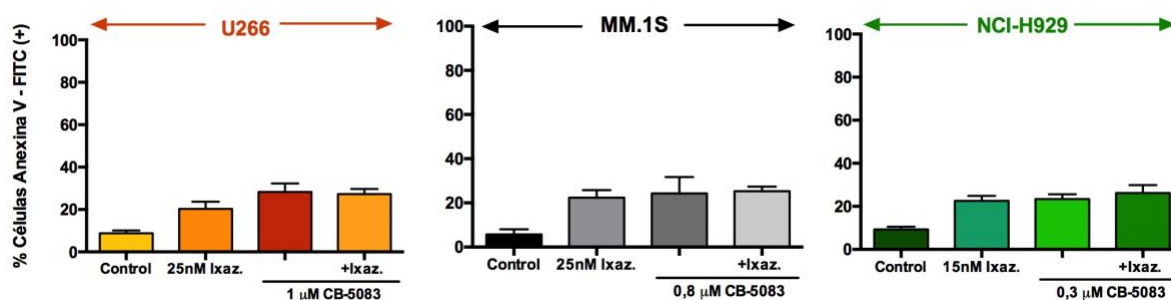


Figura 22: Efecto de la combinación de Ixazomib y CB-5083. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h con Ixazomib a las concentraciones indicadas. Además, se evaluó la posible sinergia de Ixazomib con CB-5083 $1 \mu M$ en el caso de U266, $0,8 \mu M$ en el caso de MM.1S y $0,3 \mu M$ en el caso de la línea NCI-H929. Tras 24 h de incubación se cuantificó por citometría de flujo mediante Anexina V – FITC. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control para los fármacos individuales y respecto a la acción de los fármacos individuales en la situación de combinación.

Para que se consideraran fármacos sinérgicos como mínimo la muerte en combinación debería ser mayor a la suma aritmética de las muertes individuales provocadas por cada uno de los fármacos. Como puede observarse en las *Figuras 21* y *22* no parece existir una sinergia clara entre los inhibidores de VCP/p97 e Ixazomib a diferencia de lo que sí ocurría con otros PIs. Concretamente, estudios previos determinaron una clara sinergia entre el inhibidor de VCP/p97 DBeQ y Carfilzomib en las líneas U266 y MM.1S (resultados obtenidos por nuestro grupo y todavía no publicados) así como entre DBeQ y Bortezomib en la línea U266 [59].

4.5.2. Estudio del posible efecto sinérgico entre Ixazomib y cloroquina

Aunque mayoritariamente la degradación proteica ocurre a nivel de proteasoma, la célula tiene otras alternativas para deshacerse de proteínas que, o bien ya han cumplido su papel, o bien son aberrantes [27]. Como ya se ha comentado en el apartado **1.5**, la autofagia es uno de ellos. Concretamente, la autofagia se trata de un proceso catabólico conservado en organismos eucariotas y esencial para mantener la homeostasis del organismo. En consecuencia, parece interesante realizar un estudio que evalúe la posible sinergia entre fármacos que inhiben la degradación proteica asociada al sistema ubiquitina-proteasoma (Ixazomib) junto con otros que inhiban el proceso autofágico (cloroquina) podría tener un elevado interés, ya que de esta manera se estarían bloqueando dos rutas alternativas de degradación proteica intracelular. Artículos previos ya habían demostrado una clara sinergia entre Carfilzomib y cloroquina en líneas de MM (U266, MM.1S y NCI-H929) [46]. Esta misma sinergia no fue tan clara entre Bortezomib y cloroquina en células de MM [46] pero sí en células de carcinoma hepático [60].

Nuestro laboratorio ya había determinado anteriormente que la concentración óptima de cloroquina para utilizarla en estudios de acción sinérgica entre fármacos era de 20 μ M. Las concentraciones de Ixazomib fueron algo diferentes a las empleadas en los estudios con inhibidores de VCP/p97; concretamente, en la línea U266 se utilizó 30 nM de Ixazomib, en el caso de la línea NCI-H929 se optó por utilizar 25 nM. La línea MM.1S se mantuvo a 25 nM. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 23*.

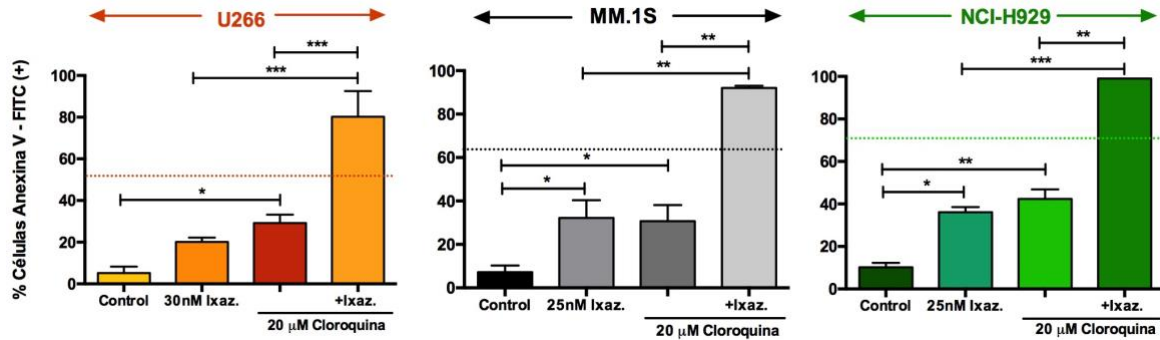


Figura 23: Efecto de la combinación de Ixazomib y cloroquina. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h con Ixazomib 25nM en el caso de MM.1S y NCI-H929 y 30nM en el caso de U266. Además, se evaluó la posible sinergia de Ixazomib con cloroquina 20 μM en el caso de U266, MM.1S y NCI-H929. Tras 24 h de incubación se cuantificó por citometría de flujo mediante Annexina V – FITC. La línea punteada indica la suma de los valores de muerte correspondientes a los fármacos de manera individual. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control para los fármacos individuales y respecto a la acción de los fármacos individuales en la situación de combinación.

Tal y como se observa en la **Figura 23**, los resultados obtenidos indicaron una clara sinergia entre el efecto producido por Ixazomib y la cloroquina en todas las líneas de mieloma estudiadas y que correlaciona con los resultados obtenidos para la combinación entre cloroquina y Carfilzomib [46]. Esta muerte fue especialmente significativa en la línea U266, la cual es bastante resistente a la acción de ambos fármacos de manera individual, sin embargo, cuando estos se combinan parece aumentar notablemente su sensibilidad. Posiblemente el hecho de inhibir dos rutas alternativas de degradación proteica provoque un mayor estrés celular que el que se genera inhibiendo la misma ruta en dos pasos diferentes (precisamente lo que ocurría con los inhibidores de VCP/p97 e Ixazomib).

4.5.2.1. Análisis de la sensibilidad a Ixazomib de la línea MM.1S silenciada en el gen ATG5 (shAtg5 MM.1S)

Anteriormente en nuestro laboratorio se había generado una línea MM.1S silenciada (mediante infección lentiviral) en el gen ATG5 [46], precursor esencial del proceso autofágico [35]. Como se ha explicado en el apartado 1.5, la cloroquina además de inhibir la autofagia en su último paso, puede tener otros efectos celulares tales como inhibir el proteasoma (a muy altas concentraciones), inhibir el proceso de renovación de la membrana plasmática, detener el tráfico vesicular, etc. [60-62]. Por tanto, se decidió evaluar la sensibilidad a Ixazomib de la línea MM.1S silenciada en la proteína ATG5 (shAtg5 MM.1S) en comparación con la línea MM.1S *wild-type*. De esta forma se pudo comprobar si el efecto sinérgico provocado por la cloroquina estaba asociado a la capacidad que ésta presenta de inhibir el proceso autofágico en su último paso, o bien se trataba de un efecto inespecífico que potencia la sinergia entre ambos fármacos cuando éstos se encuentran en combinación.

El efecto del Ixazomib en células de MM.1S *wild-type* y shAtg5 MM.1S se estudió mediante un ensayo dosis-respuesta de tipo MTT. Éste se realizó a dos tiempos (24 y 48 h) y concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50 nM). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24**.

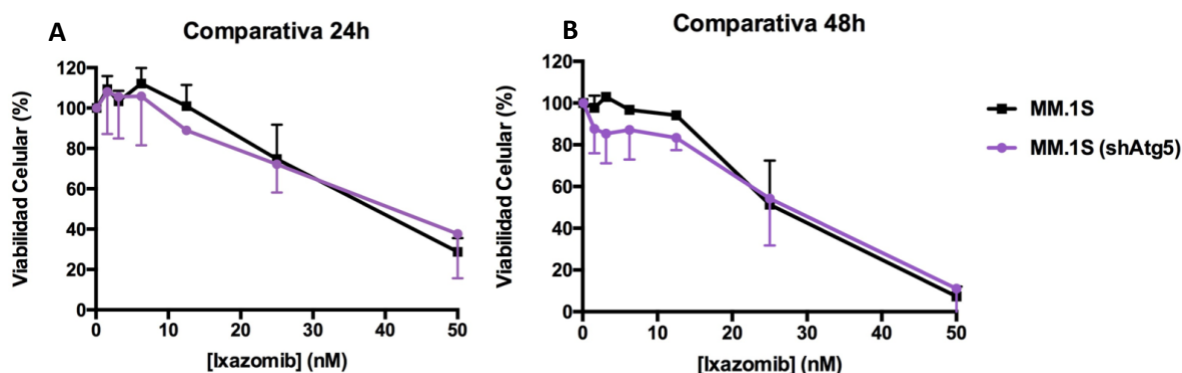


Figura 24: Determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con Ixazomib. Las células MM.1S *wild-type* y shAtg5 MM.1S se sembraron a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se trataron a concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50 nM). A las 24 y 48 h se analizó la viabilidad celular por el método de MTT (A)-(B). Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó entre la línea shAtg5 MM.1S y la línea MM.1S *wild-type* para cada una de las concentraciones estudiadas.

Tal y como queda reflejado en la **Figura 24**, la sensibilidad de la línea MM.1S *wild-type* y la línea shAtg5 MM.1S es bastante parecida, además los IC₅₀ para cada una de las líneas son muy similares. Para confirmar este resultado se realizó un experimento de dosis-respuesta (24 h) mediante citometría de flujo que permite cuantificar directamente la muerte celular. Esta vez el marcaje se realizó con Anexina V - APC y no Anexina V – FITC como en el resto de casos, ya que el vector responsable del silenciamiento del gen *ATG5* (pGIPZ, descripción completa en la **Figura A4** del **Anexo IV**) codifica también para la proteína GFP (GFP: *Green Fluorescence Protein*) y ésta emite en el mismo canal de fluorescencia que lo hace el fluoróforo FITC. Los resultados quedan expuestos en la **Figura 25**.

Al igual que ocurría con el ensayo de MTT (**Figura 24**) la sensibilidad obtenida mediante citometría de flujo para la línea *wild-type* y la línea silenciada en la proteína *ATG5* es bastante similar ya que no existieron diferencias significativas entre ambas líneas para ninguna de las concentraciones estudiadas (**Figura 25**). Este resultado concuerda con los datos obtenidos para el estudio de Carfilzomib en las mismas líneas (MM.1S *wild-type* y silenciada en *ATG5*) donde incluso existía una mayor sensibilidad de la versión MM.1S *wild-type* frente a la silenciada en *ATG5* [46].

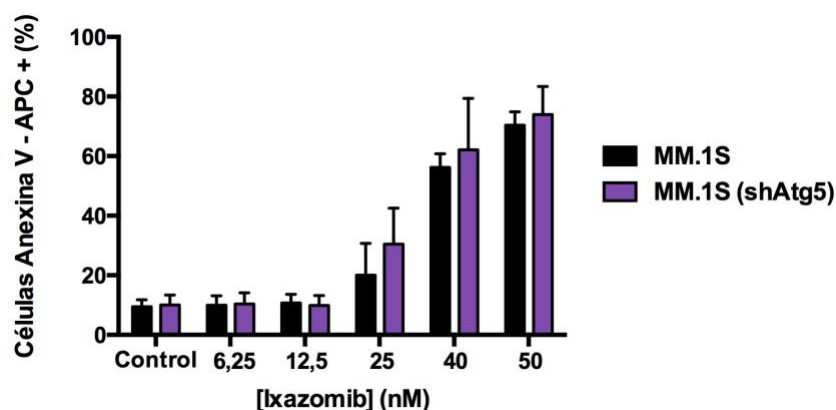


Figura 25: Análisis de la apoptosis inducida por Ixazomib en células MM.1S wild-type y shAtg5 MM.1S. Las células se sembraron a $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y se incubaron durante 24 h a concentraciones crecientes de Ixazomib (0 – 50nM). Se analizó la apoptosis por la exposición de PS mediante el marcaje con Anexina V – APC. Los resultados son la media \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó entre la línea shAtg5 MM.1S y la línea MM.1S wild-type para cada una de las concentraciones estudiadas.

En conclusión, el hecho de que una línea deficiente en un gen precursor de autofagia presente una sensibilidad frente a Ixazomib muy semejante a una línea *wild-type* indica que, el efecto sinérgico entre Ixazomib y cloroquina, no está relacionado con la capacidad de ésta de inhibir la autofagia, sino de otros posibles efectos que la cloroquina pueda desarrollar a nivel celular, y que junto a la inhibición del proteasoma, favorezcan la entrada en apoptosis de las células. Por tanto, se requieren de estudios más avanzados que intenten dilucidar el mecanismo por el cual el uso combinado de Ixazomib y cloroquina favorecen la muerte celular en células de MM.

5. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos, y a falta de estudios complementarios que los confirmen, se ha podido avanzar en el **estudio del mecanismo básico de inducción de apoptosis desarrollado por el inhibidor del proteasoma Ixazomib** en varias líneas de mieloma humano. Las conclusiones que se pueden extraer del presente Trabajo Fin de Máster quedan recogidas en las siguientes líneas:

1. Ixazomib posee un **efecto citotóxico dosis-dependiente** causante de la inducción de apoptosis en las líneas celulares de mieloma U266, MM.1S y NCI-H929.
2. En las líneas MM.1S y NCI-H929 Ixazomib es capaz de **parar el ciclo celular** en las **fases G2/M** provocando como consecuencia una reducción en la capacidad proliferativa de las células.
3. El tratamiento de las células con Ixazomib acaba provocando, a lo largo del tiempo, la **activación específica de la caspasa 3** o caspasa ejecutora, responsable del proceso apoptótico.

4. En todas las líneas celulares estudiadas el tratamiento con Ixazomib indujo **cambios en los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2** sugiriendo su posible implicación en el mecanismo de inducción de apoptosis desarrollado por éste.
 5. A pesar de que tanto **Ixazomib** como los **inhibidores de VCP/p97** son fármacos adecuados para el tratamiento del MM de manera individual, **no parece existir una sinergia clara** entre ambos que permita utilizarlos de manera combinada.
 6. La combinación de **Ixazomib** y **cloroquina** podría ser utilizada como una **estrategia terapéutica de combinación** para el tratamiento del MM.
 7. El efecto sinérgico entre Ixazomib y cloroquina **no parece estar relacionado con la capacidad de ésta última de inhibir el proceso autofágico**.
-

1. Ixazomib has a dose-dependent cytotoxic effect that causes the induction of apoptosis in myeloma cell lines U266, MM.1S and NCI-H929.
2. In MM.1S and NCI-H929 cell lines, Ixazomib is able to stop the cell cycle in G2/M phases causing a reduction in cells' proliferative capacity.
3. Treatment of cells with Ixazomib lead to the time-dependent specific activation of caspase 3, responsible of apoptotic process.
4. In all the cell lines studied, treatment with Ixazomib induced protein expression changes of the main Bcl-2 family members, suggesting their possible involvement in the mechanism of apoptosis induced by Ixazomib.
5. Although both Ixazomib and VCP/p97 inhibitors are suitable drugs for MM treatment *per se*, their combination does not produce a clear cytotoxic synergic effect.
6. Combination of Ixazomib and chloroquine could be used as an improved therapeutic strategy against MM.
7. Synergistic effect between Ixazomib and chloroquine could be independent of the ability of chloroquine to inhibit autophagy.

6. Bibliografía

- [1] S. K. Kumar *et al.*, “Multiple myeloma,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, pp. 1–20, 2017.
- [2] R. A. Kyle and S. V. Rajkumar, “Multiple Myeloma,” *Blood*, vol. 111, no. 6, pp. 2962–2972, 2008.
- [3] S. Greenstein *et al.*, “Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells,” *Exp. Hematol.*, vol. 31, no. 4, pp. 271–282, 2003.
- [4] B. Catalgol, “Proteasome and cancer,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 109, pp. 277–293, 2012.
- [5] N. W. C. J. van de Donk, T. Mutis, P. J. Poddighe, H. M. Lokhorst, and S. Zweegman, “Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, pp. 110–122, 2016.
- [6] B. Muz, R. N. Ghazarian, M. Ou, M. J. Luderer, H. D. Kusdono, and A. K. Azab, “Spotlight on ixazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma,” *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 10, pp. 217–226, 2016.
- [7] S. Gandolfi, J. P. Laubach, T. Hideshima, D. Chauhan, K. C. Anderson, and P. G. Richardson, “The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 36, no. 4, pp. 561–584, 2017.
- [8] J. S. Damiano, A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, A. A. Shtil, and W. S. Dalton, “Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines,” *Blood*, vol. 93, no. 5, pp. 1658–67, 1999.
- [9] J. A. Sterling and M. R. Reagan, “Soluble and Cell – Cell-Mediated Drivers of Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma,” vol. 9, no. May, pp. 1–7, 2018.
- [10] C. Correia *et al.*, “Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 7, pp. 1658–1671, 2015.
- [11] G. Ichim and S. W. G. Tait, “A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 8, pp. 539–548, 2016.
- [12] A. H. W. A. A. R. Currie, J. F. R. KERR*, “Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics,” *J. Intern. Med.*, vol. 258, no. 6, pp. 479–517, 1972.
- [13] H. Dai, X. W. Meng, and S. H. Kaufmann, “Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics,” *F1000Research*, vol. 5, no. 0, p. 2804, 2016.
- [14] D. De Miguel *et al.*, “Liposomes decorated with Apo2L/TRAIL overcome chemoresistance of human hematologic tumor cells,” *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 3, pp. 893–904, 2013.
- [15] A. Strasser, “The role of BH3-only proteins in the immune system,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 189–200, 2005.
- [16] M. Giam, D. C. S. Huang, and P. Bouillet, “BH3-only proteins and their roles in programmed cell death,” *Oncogene*, vol. 27, no. S1, pp. S128–S136, 2008.
- [17] A. R. D. Delbridge, S. Grabow, A. Strasser, and D. L. Vaux, “Thirty years of BCL-2: Translating cell death discoveries into novel cancer therapies,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 99–109, 2016.
- [18] J. Li and J. Yuan, “Caspases in apoptosis and beyond,” *Oncogene*, vol. 27, no. 48, pp. 6194–6206, 2008.
- [19] A. B. Parrish, C. D. Freel, and S. Kornbluth, “Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function,” pp. 1–24, 2016.
- [20] H. H. Park, Y.-C. Lo, S.-C. Lin, L. Wang, J. K. Yang, and H. Wu, “The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 561–586, 2007.
- [21] T. H. Jang, S. H. Kim, J. H. Jeong, S. Kim, Y. G. Kim, and H. H. Park, “Crystal structure of caspase recruiting domain (CARD) of apoptosis repressor with CARD (ARC) and its implication in inhibition of apoptosis,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–9, 2015.
- [22] J. R. Friedman and J. Nunnari, “Mitochondrial form and function,” *Nature*, vol. 505, no. 7483,

- pp. 335–343, 2014.
- [23] P. Fernández-Silva, M. L. Peleato, A. Pérez-Martos, R. Acín-Pérez, and J. A. Enriquez, “Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes,” *Mol. Cell*, pp. 529–539, 2008.
- [24] D. L. Vaux, “Apoptogenic factors released from mitochondria,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 4, pp. 546–550, 2011.
- [25] M. Hassan, H. Watari, A. Abualmaaty, Y. Ohba, and N. Sakuragi, “Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer,” vol. 2014, 2014.
- [26] L. M. Sedger and M. F. McDermott, “TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 453–472, 2014.
- [27] G. A. Collins and A. L. Goldberg, “The Logic of the 26S Proteasome,” *Cell*, vol. 169, no. 5, pp. 792–806, 2017.
- [28] D. Vucic, V. M. Dixit, and I. E. Wertz, “Ubiquitylation in apoptosis: A post-translational modification at the edge of life and death,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 7, pp. 439–452, 2011.
- [29] A. M. Ruschak, M. Slassi, L. E. Kay, and A. D. Schimmer, “Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 13, pp. 1007–1017, 2011.
- [30] N. Vigneron and B. J. Van den Eynde, “Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex,” *Biomolecules*, vol. 4, no. 4, pp. 994–1025, 2014.
- [31] M. J. Kunjappu and M. Hochstrasser, “Assembly of the 20S proteasome,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 1, pp. 2–12, 2014.
- [32] D. A. Bota, D. Alexandru, S. T. Keir, D. Bigner, J. Vredenburgh, and H. S. Friedman, “Proteasome inhibition with bortezomib induces cell death in GBM stem-like cells and temozolomide-resistant glioma cell lines, but stimulates GBM stem-like cells’ VEGF production and angiogenesis,” *J. Neurosurg.*, vol. 119, no. 6, pp. 1415–1423, 2013.
- [33] B. B. Hasinoff, “Progress curve analysis of the kinetics of slow-binding anticancer drug inhibitors of the 20S proteasome,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 639, no. January, pp. 52–58, 2018.
- [34] M. Offidani, L. Corvatta, P. Caraffa, S. Gentili, L. Maracci, and P. Leoni, “An evidence-based review of ixazomib citrate and its potential in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma,” *Onco. Targets. Ther.*, p. 1793, 2014.
- [35] N. Mizushima and M. Komatsu, “Autophagy: Renovation of cells and tissues,” *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 728–741, 2011.
- [36] P. A. Jaeger and T. W. Coray, “All-you-can-eat: Autophagy in neurodegeneration and neuroprotection,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 4, no. 1, 2009.
- [37] Z. Sha, H. M. Schnell, K. Ruoff, and A. Goldberg, “Rapid induction of p62 and GABARAPL1 upon proteasome inhibition promotes survival before autophagy activation,” *J. Cell Biol.*, vol. 217, no. 5, pp. 1757–1776, 2018.
- [38] F. M. Menzies, A. Fleming, and D. C. Rubinsztein, “Compromised autophagy and neurodegenerative diseases,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 16, no. 6, pp. 345–357, 2015.
- [39] A. Van Der Vaart, M. Mari, and F. Reggiori, “A picky eater: Exploring the mechanisms of selective autophagy in Human Pathologies,” *Traffic*, vol. 9, no. 3, pp. 281–289, 2008.
- [40] L. Verschooten *et al.*, “Autophagy Inhibitor Chloroquine Enhanced the Cell Death Inducing Effect of the Flavonoid Luteolin in Metastatic Squamous Cell Carcinoma Cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–11, 2012.
- [41] R. Le Moigne *et al.*, “The p97 inhibitor CB-5083 is a unique disrupter of protein homeostasis in models of Multiple Myeloma,” *Mol. Cancer Ther.*, p. molcanther.0233.2017, 2017.
- [42] L. Stach and P. S. Freemont, “The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool,” *Biochem. J.*, vol. 474, no. 17, pp. 2953–2976, 2017.
- [43] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J Immunol Met*, vol. 65, pp. 55–63, 1983.
- [44] F. Denizot and R. Lang, “Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability,” *J. Immunol. Methods*, vol. 89, pp. 271–277, 1986.

- [45] D. Chauhan *et al.*, “In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, no. 16, pp. 5311–5321, 2011.
- [46] V. Jarauta Azcona, “Interrelaciones entre apoptosis y autofagia. Aplicación al tratamiento de células de mieloma con el inhibidor del proteasoma carfilzomib.,” Universidad de Zaragoza, 2015.
- [47] P. Balsas, N. López-Royuela, P. Galán-Malo, A. Anel, I. Marzo, and J. Naval, “Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 5, pp. 804–812, 2009.
- [48] D. J. Kuhn *et al.*, “Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma,” *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3281–3290, 2007.
- [49] V. Jarauta *et al.*, “Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo,” *Cancer Lett.*, vol. 382, no. 1, pp. 1–10, 2016.
- [50] T. B. Shabaneh *et al.*, “Molecular Basis of Differential Sensitivity of Myeloma Cells to Clinically Relevant Bolus Treatment with Bortezomib,” *PLoS One*, vol. 8, no. 2, pp. 10–13, 2013.
- [51] C. Bertoli, J. M. Skotheim, and R. A. M. De Bruin, “Control of cell cycle transcription during G1 and S phases,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 518–528, 2013.
- [52] N. Rastogi and D. P. Mishra, “Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors,” *Cell Div*, vol. 7, no. 1, p. 26, 2012.
- [53] P. Balsas, P. Galán-Malo, I. Marzo, and J. Naval, “Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM β 5 overexpression and polyploidy,” *Leuk. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 212–218, 2012.
- [54] M. Fricker, J. O’Prey, A. M. Tolkovsky, and K. M. Ryan, “Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability,” *Cell Death Dis.*, vol. 1, no. 7, pp. 1–9, 2010.
- [55] B. A. Callus *et al.*, “Triggering of Apoptosis by Puma Is Determined by the Threshold Set by Prosurvival Bcl-2 Family Proteins,” *J. Mol. Biol.*, vol. 384, no. 2, pp. 313–323, 2008.
- [56] C. G. Concannon *et al.*, “Apoptosis induced by proteasome inhibition in cancer cells: Predominant role of the p53/PUMA pathway,” *Oncogene*, vol. 26, no. 12, pp. 1681–1692, 2007.
- [57] J. Z. Qin *et al.*, “Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 14, pp. 6282–6293, 2005.
- [58] M. A. Dimopoulos *et al.*, “Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): And randomised, phase 3, open-label, multicentre study,” *Lancet Oncol.*, vol. 17, no. 1, pp. 27–38, 2016.
- [59] H. W. Auner *et al.*, “Combined Inhibition of p97 and the Proteasome Causes Lethal Disruption of the Secretory Apparatus in Multiple Myeloma Cells,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. 1–11, 2013.
- [60] B. Hui *et al.*, “Proteasome inhibitor interacts synergistically with autophagy inhibitor to suppress proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma,” *Cancer*, vol. 118, no. 22, pp. 5560–5571, 2012.
- [61] D. Plantone and T. Koudriavtseva, “Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious , Immune , Neoplastic , and Neurological Diseases : A Mini-Review,” *Clin. Drug Investig.*, pp. 1–19, 2018.
- [62] J. Zhou, J. Yi, N. Hu, A. L. J. George, and K. T. Murray, “Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes,” *Circ. Res.*, vol. 87, no. 1, pp. 33–38, 2000.