



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Muerte inmunogénica inducida por fármacos antitumorales en células de mieloma múltiple

Immunogenic cell death induced by cancer chemotherapy in multiple myeloma cells

Autora:

Beatriz Nafría Jiménez

Directores:

Isabel Marzo Rubio

Alfonso Serrano del Valle

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias

2016/2017



Universidad
Zaragoza

Dra. Isabel Marzo Rubio, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y D. Alfonso Serrano del Valle, Investigador del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Muerte inmunogénica inducida por fármacos antitumorales en células de mieloma múltiple” ha sido realizado por Beatriz Nafría Jiménez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza bajo nuestra dirección, que reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado y que cumple los objetivos recogidos en las Directrices de TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Junio 2017

Fdo: Isabel Marzo Rubio

Fdo: Alfonso Serrano del Valle

Agradecimientos

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a hacer posible la realización de este trabajo fin de grado.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora Isabel Marzo Rubio, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella y por todo lo que he podido aprender con y de ella. Gracias por la acertada orientación, la ayuda y el apoyo mostrados, sin los cuales hubiera sido mucho más difícil haber llevado a cabo este proyecto.

También quiero agradecer la ayuda de Alfonso Serrano, por su inestimable ayuda y enseñanzas, confiando en mí en todo momento. Ante las dificultades que se han ido presentando, siempre ha estado dispuesto a dedicarme su tiempo, su paciencia y transmitirme todo su conocimiento. Muchas gracias, has sido todo un amigo.

Asimismo, tengo que dar las gracias a todos los compañeros del grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”, por abrirme las puertas de su experiencia y facilitar el ambiente de trabajo. Gracias a Óscar Gonzalo y Joaquín Marco por su colaboración durante mi estancia.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos, especialmente a mi hermana y mis biotecnólogas *ladys*, el cariño y apoyo mostrado siempre y, especialmente, en este año.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN/ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Mieloma múltiple humano	2
1.1.1 Tratamiento del mieloma múltiple	2
1.2 Muerte celular inmunogénica	2
1.2.1 Patrones moleculares asociados al daño celular	3
1.2.1.1 Secreción de ATP	4
1.2.1.2 Liberación de HMGB1	4
1.2.1.3 Exposición de calreticulina	4
1.3 El retículo endoplasmático como diana terapéutica en mieloma múltiple	5
1.3.1 Sensibilidad al estrés en el retículo endoplasmático en el mieloma múltiple	5
1.3.2 Inductores de estrés en el retículo endoplasmático	5
1.3.2.1 Inhibidores del proteasoma	5
1.3.2.2 Inhibidores de VCP/p97	6
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Cultivos celulares	8
3.1.1 Líneas celulares y mantenimiento de cultivos	8
3.1.2 Contaje y determinación de la viabilidad celular	8
3.1.3 Detección de micoplasmas	8
3.2 Ensayos de citotoxicidad	8
3.2.1 Condiciones celulares	8
3.2.2 Cuantificación de la apoptosis mediante marcaje con anexina V-DY634	8
3.3 Análisis de la exposición de calreticulina en la membrana plasmática	9
3.4 Análisis de la expresión de proteínas mediante <i>Western blot</i>	10
3.4.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares	10
3.4.2 Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS/PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa	10
3.4.3 Análisis de proteínas por <i>Western blot</i>	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1 Evaluación de la citotoxicidad de DBeQ	11
4.2 Análisis de la combinación de DBeQ y carfilzomib	12
4.2.1 Estudio del posible efecto sinérgico entre DBeQ y carfilzomib	12
4.2.2 Análisis en el tiempo de la sinergia entre DBeQ y carfilzomib	13
4.2.3 Estudio del tipo de muerte celular inducida por DBeQ y carfilzomib	14
4.2.4 Combinación de DBeQ con alisertib	15
4.3 Estudio de la posible inducción de muerte celular inmunogénica	16
4.3.1 Estudio de la exposición de calreticulina en el tiempo	16
4.3.2 Evaluación de la muerte inmunogénica inducida por carfilzomib y DBeQ	18
4.3.2.1 Dependencia del nivel de estrés basal en la exposición de calreticulina	20
4.4 Análisis de expresión de eIF2 α fosforilada y CHOP por <i>Western blot</i>	21
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	23
6. BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXOS	

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos moleculares y celulares de la muerte celular inmunogénica.....	1
Figura 2. Citotoxicidad de DBeQ en líneas celulares de MM, curva dosis-respuesta a 24 horas ..	11
Figura 3. Efecto de la combinación de DBeQ y carfilzomib	13
Figura 4. Curvas tiempo-respuesta (<i>time course</i>) de citotoxicidad	13
Figura 5. Estudio del tipo de muerte celular. Efecto del inhibidor de caspasas ZVAD-FMK sobre la muerte inducida por DBeQ y carfilzomib	15
Figura 6. Efecto de la combinación de DBeQ y alisertib	16
Figura 7. Exposición de calreticulina en el tiempo (<i>time course</i>), en la línea celular U266	17
Figura 8. Exposición de calreticulina en el tiempo (<i>time course</i>), en la línea celular MM.1S	17
Figura 9. Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular U266	18
Figura 10. Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular MM.1S, nivel de estrés basal bajo	19
Figura 11. Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular MM.1S, nivel de estrés basal alto	20
Figura 12. Histogramas representativos del análisis de expresión de calreticulina en la línea celular MM.1S	20
Figura 13. Expresión de eIF2 α fosforilada y CHOP, tras la incubación durante 24 horas con DBeQ y carfilzomib	22

LISTADO DE ABREVIATURAS

7-AAD: 7-aminoactinomicina D	IFN: Interferón
ABB: Buffer de unión a anexina V	IL: Interleuquina
APC: Células presentadoras de antígeno	IMiDs: Fármacos inmunomoduladores
ATP: Adenosín trifosfato	MM: Mieloma múltiple
CFZ: Carfilzomib	PBS: Buffer fosfato salino
CHOP: Factor pro-apoptótico CCAAT con homología C/EBP	PERK: RNA quinasa PKR-like asociada al retículo endoplasmático
CRT: Calreticulina	PI: Inhibidores del proteasoma
CTL: Linfocitos T citotóxicos	PS: Fosfatidilserina
DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño celular	RAGE: Receptor para productos finales de glicosilación avanzada
eIF2 α : Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α	RE: Retículo endoplasmático
ERAD: Degradación asociada al retículo endoplasmático	SD: Desviación estándar
HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo caja 1	SDS: Dodecil sulfato de sodio
HSP: Proteína de choque térmico	SFB: Suero fetal bovino
ICD: Muerte celular inmunogénica	TLR: Receptor de tipo toll
	UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas
	ZVAD-FMK: Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona

RESUMEN

El mieloma múltiple humano es un cáncer hematológico caracterizado por una proliferación maligna de células plasmáticas. Aunque las nuevas terapias han mejorado significativamente la respuesta de los pacientes con mieloma múltiple, sigue siendo una enfermedad incurable.

Recientemente, ha emergido el concepto de muerte celular inmunogénica como un tipo de muerte celular regulada que induce la activación del sistema inmune, en la que tienen un papel fundamental diversos patrones moleculares asociados al daño celular. Entre ellos se encuentra la exposición de calreticulina en la membrana plasmática. Además, en la emisión de este factor inmunogénico desempeña una acción clave el estrés en el retículo endoplasmático, activando la “respuesta a proteínas mal plegadas”.

Es por ello, que se ha planteado la hipótesis de que compuestos inductores de estrés en el retículo podrían combinarse con fármacos habituales en la terapia antitumoral para inducir muerte celular inmunogénica. En el caso del mieloma múltiple, los inhibidores del proteasoma como bortezomib y carfilzomib presentan gran interés terapéutico. De esta manera, si se inhibe la ruta de degradación proteica llevada a cabo por el proteasoma, se produce un acúmulo de proteínas mal plegadas, induciendo dicho estrés y la posible muerte celular inmunogénica. Además, para potenciar este fenómeno, se podrían combinar con otros inductores de estrés, como DBeQ.

En este trabajo se ha evaluado el efecto citotóxico y la capacidad inmunogénica, medida por la exposición de calreticulina, de carfilzomib y su combinación con DBeQ, en líneas celulares de mieloma múltiple. Los resultados muestran que tanto DBeQ como carfilzomib desencadenan muerte por apoptosis, de forma dependiente del tiempo, observándose un efecto sinérgico al combinarlos en las líneas celulares U266 y MM.1S. Asimismo, en función del estado celular basal, carfilzomib y su combinación con DBeQ inducen la exposición de calreticulina en la línea celular MM.1S.

ABSTRACT

Multiple myeloma is a type of hematological cancer characterized by proliferation of malignant plasma cells. Although new therapies have improved significantly patient's response, it is still an incurable disease.

Recently, immunogenic cell death has emerged as a new type of regulated cell death that elicits immune system activation, in which several cell death pathogen-associated molecular patterns play a vital role. Among them, it's important to stand out calreticulin exposure (on the plasma membrane) an essential signal required in immunogenic cell death. Moreover, endoplasmic reticulum stress is strongly involved in the emission of this immunogenic factor by activating the unfolded protein response.

Therefore, it has been raised the hypothesis that endoplasmic reticulum stress inducing compounds, could be combined with drugs used to treat this malignancy, in order to induce immunogenic cell death. In this particular case, proteasome inhibitors such as bortezomib and carfilzomib have shown great therapeutic interest. Inhibition of the proteasome negatively impact on the protein degradation pathway. This event, leads to the accumulation of unfolded proteins, inducing the subsequent stress and immunogenic cell death. Furthermore, to potentiate this phenomenon, these drugs could be combined with other stress inducing compounds such as DBeQ.

On this Final Degree Dissertation, we have evaluated the cytotoxic effect and the immunogenic potential, measured by calreticulin exposure, of carfilzomib and DBeQ (alone or in combination) in multiple myeloma cell lines. Our results indicate that both DBeQ and carfilzomib trigger cell death by apoptosis in a time dependent manner. Moreover, the combination of these two drugs elicits a synergic effect on U266 and MM.1S cell lines. Furthermore, depending on the basal cell status, carfilzomib and its combination with DBeQ induce calreticulin exposure on the MM1S cell line.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mieloma múltiple humano

El mieloma múltiple (MM) humano, también conocido como enfermedad de Kahler, es un cáncer hematológico caracterizado por una proliferación maligna de células B plasmáticas, procedentes de un solo clon, y su consiguiente expansión y hacinamiento en la médula ósea ^[1]. En este microambiente, las células de MM establecen gran número de interacciones con proteínas de la matriz extracelular y células del estroma, constituyendo un entorno óptimo para inducir dicha proliferación, migración y resistencia a la muerte celular por apoptosis. Por tanto, para conseguir una mayor eficacia a la hora de aplicar un tratamiento, es necesario conocer los mecanismos moleculares específicos de este tumor maligno.

Respecto a la fisiopatología, esta neoplasia de células B plasmáticas principalmente acarrea: destrucción ósea, hipercalcemia, insuficiencia de la médula ósea, anemia, predisposición a infecciones y disfunción neurológica. Se considera que dentro de los factores etiológicos, los cuales aún no se conocen con precisión, se encuentran la exposición a radiaciones ionizantes así como a contaminantes ambientales (pesticidas o herbicidas) y una estimulación antigénica crónica ^[2].

Este tipo de cáncer representa, aproximadamente, el 1% de todos los tumores y el 10% de las neoplasias hematológicas ^[2]. Hoy en día sigue siendo una enfermedad incurable.

1.1.1 Tratamiento del mieloma múltiple

Por muchos años, la combinación de los agentes quimioterapéuticos melfalán y prednisona ha constituido el tratamiento estándar y todavía se utilizan en personas de avanzada edad ^[2]. Reservado a pacientes jóvenes y con buen pronóstico se encuentra el trasplante autólogo de células madre (ASCT).

En la última década, se han introducido nuevas terapias y nuevos fármacos, como los inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib) y los fármacos inmunomoduladores (IMiDs). Estos últimos están formados por la talidomida y sus derivados (lenalidomida y pomalidomida), presentando actividades pro-apoptóticas, anti-angiogénicas o pro-eritropoyéticas. La entrada de estas terapias ha mejorado significativamente la respuesta de los pacientes con mieloma múltiple, reflejándose en un incremento de la supervivencia media inferior a 3 años a principios de siglo, hasta 6-7 años actualmente ^[3]. Sin embargo, un número significativo de ellos sufren recaídas y continúa siendo imprescindible el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

1.2 Muerte celular inmunogénica

Nuestro sistema inmune es capaz de eliminar las células que están muriendo en el organismo. Al contrario de la necrosis, definida por la ruptura de la membrana plasmática y la subsiguiente respuesta inflamatoria *in vivo*, históricamente se ha considerado que la apoptosis era un tipo de muerte celular no inflamatoria y no inmunogénica debido a que las alteraciones apoptóticas de la superficie celular facilitan una rápida fagocitosis. La apoptosis se caracteriza por la reducción del volumen celular, la condensación y fragmentación del núcleo, la formación de burbujas en la membrana y, finalmente, de cuerpos apoptóticos.

En los últimos años, ha emergido el concepto de muerte celular inmunogénica (ICD, “*Immunogenic cell death*”). Se trata de un tipo de muerte celular que estimula una respuesta inmune contra antígenos asociados a la muerte celular, en particular aquellos derivados de células cancerosas ^[4]. Por tanto, aunque la apoptosis como proceso fisiológico implicado en el desarrollo (post-)embrionario y en la homeostasis tisular falla invariablemente en atraer la rama adaptativa del sistema inmune, estímulos específicos pueden promover esta variante inmunogénica de muerte celular regulada ^[5]. En comparación, la ICD también presenta características morfológicas apoptóticas y es dependiente de la actividad de caspasas.

En 2005, Kroemer y colaboradores evidenciaron por primera vez esta noción: Células cancerosas (CT26 de carcinoma colorrectal murino y MCA205 de fibrosarcoma murino) tratadas con doxorubicina (antraciclina empleada en el tratamiento de carcinomas), inducían en ratones inmunocompetentes singénicos una respuesta inmune protectora contra la administración posterior de células tumorales vivas del mismo tipo, en ausencia de adyuvante [6]. Posteriormente, se ha descubierto que otra serie de fármacos ya utilizados en clínica, entre los que destacan mitoxantrona, bleomicina, oxaliplatino, ciclofosfamida y bortezomib, también presentan este potencial inmunogénico.

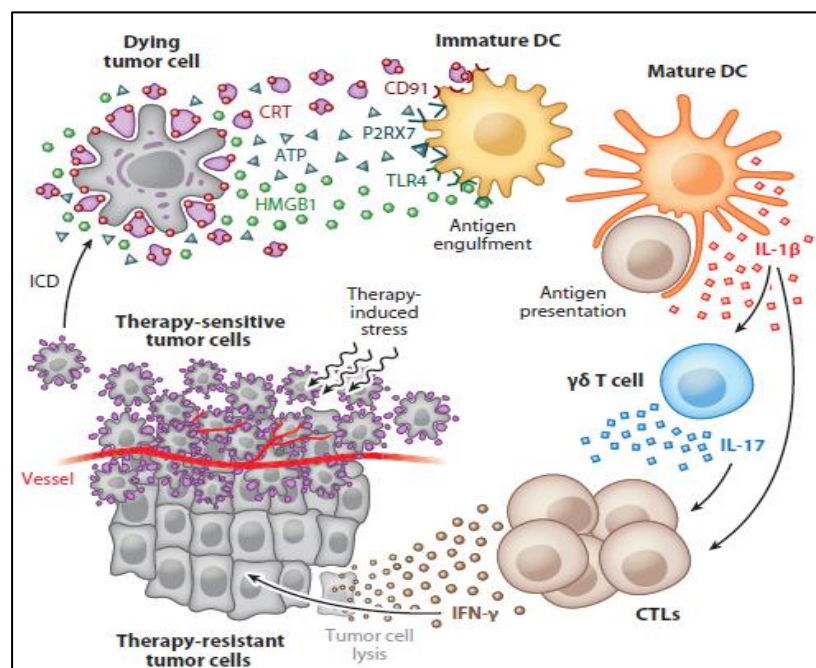
1.2.1 Patrones moleculares asociados al daño celular

De acuerdo con los modelos actuales, las características inmunogénicas de la ICD están mediadas principalmente por patrones moleculares asociados al daño celular (DAMPs, “*Damage Associated Molecular Patterns*”) [4,5]. Estos DAMPs son moléculas que en condiciones fisiológicas no son accesibles para el sistema inmune pero que si se liberan o exponen en respuesta a estrés o muerte celular ejercerán potentes efectos inmunoestimuladores [7,8].

La exposición de calreticulina (CRT) en la membrana plasmática, la secreción de ATP y la liberación de HMGB1 (proteína de alta movilidad del grupo caja 1), son tres DAMPs a los que se ha atribuido un papel esencial en el potencial inmunogénico de prácticamente todos los inductores de ICD [4]. Asimismo, han sido identificados otros DAMPs que contribuyen a la inmunogenicidad de la muerte celular en determinados escenarios, como, por ejemplo: citoquinas inmunoestimuladoras (IFN- α), chaperonas de la familia de la proteína de choque térmico (HSP70, HSP90), productos mitocondriales y de degradación de la matriz extracelular (fragmentos de heparán sulfato) [4,7,9].

De manera que, las células que sucumben a ICD experimentan cambios específicos en su superficie celular y emiten una combinación de los factores inmunogénicos mencionados, de acuerdo a un patrón espacio-temporalmente definido [7]. La unión de los tres principales DAMPs a sus receptores (CD91, P2RX7 y TLR4) estimula a las células presentadoras de antígeno (APC, “*Antigen-presenting cells*”) para capturar, procesar y presentar los antígenos tumorales. Todo este proceso resulta en una potente respuesta inmune mediada por IFN- γ y vía granzima-perforina (dependiente de IL-1- β e IL-17) implicando tanto a las células T $\gamma\delta$ como a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) [4]. Algunos CTLs adquieren un fenotipo de memoria, estableciéndose una protección inmunológica de larga duración, así como un microambiente propicio para que se inicie la respuesta inmune específica tumoral (**Figura 1**).

Figura 1. Mecanismos moleculares y celulares de la muerte celular inmunogénica. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. *Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy*. Annual Review of Immunology. 2013;31(1):51–72



De esta manera, las células cancerosas en proceso de muerte pueden actuar como una vacuna que estimula una respuesta inmune específica del tumor, la cual a su vez controlará a las células cancerosas residuales.

1.2.1.1 Secreción de ATP

El ATP es uno de los metabolitos intracelulares más abundantes, pero también un importante mensajero modulador de la supervivencia, diferenciación y proliferación celular. Respecto a la secreción de ATP por las células que sucumben a ICD, ocurre mediante diversos mecanismos inducidos por estrés, siendo imprescindible la tenencia de una maquinaria de autofagia intacta ^[4]. Este ATP extracelular actúa como señal de activación de la fagocitosis, constituyendo un punto crítico para que el sistema inmune perciba la muerte celular como inmunogénica en el contexto de la quimioterapia antitumoral ^[8].

1.2.1.2 Liberación de HMGB1

Respecto a la proteína no-histona HMGB1, además de su papel estructural y regulador de la transcripción en el núcleo (pues se une al DNA y a los nucleosomas), en el medio extracelular media potentes efectos pro-inflamatorios al unirse a varios receptores de la superficie de células inmunes, como TLR2, TLR4 y RAGE ^[9]. La maquinaria molecular que subyace a la liberación de HMGB1 como DAMP todavía no ha sido aclarada con detalle; sin embargo, se conoce que requiere la permeabilización tanto de la membrana nuclear como plasmática ^[5].

1.2.1.3 Exposición de calreticulina

La exposición de calreticulina en la superficie externa de la membrana plasmática es uno de los principales marcadores de las células apoptóticas inmunogénicas. La calreticulina (CRT) es una proteína altamente conservada, de 46 kDa ^[10], localizada en condiciones homeostáticas principalmente en el lumen del retículo endoplasmático (RE), donde actúa como chaperona molecular y moduladora de la homeostasis del calcio. Asimismo, se pueden detectar bajas cantidades de CRT en otros compartimentos, como el citosol, el núcleo, y en la superficie de algunos tipos celulares (ecto-CRT), sobre todo en los derivados del linaje mieloide ^[7].

En cuanto a su exposición en el mecanismo de ICD, diversos estudios proponen que en la mayoría de casos es un evento pre-apoptótico, precediendo a la exposición de fosfatidilserina (PS) y a otros signos morfológicos característicos de la apoptosis ^[4,7,9,10,11,12]. Esta ecto-CRT actúa como una potente señal para que las APC fagociten las fracciones de las células tumorales en proceso de muerte. De este modo, un proceso tolerogénico como es la muerte celular se transformaría en inmunogénico, lo que contribuiría a una mayor eficiencia de la quimioterapia antitumoral ^[11].

Asimismo, de acuerdo a los ensayos disponibles, es ampliamente conocido el hecho de que el estrés en el RE provocado por agentes quimioterapéuticos participa en la vía de exposición de CRT ^[4,7,12,13,14]. En respuesta a dicho estrés, el retículo endoplasmático activa una vía de señalización compleja, la llamada “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR, “*Unfolded Protein Response*”).

En concreto, la vía de señalización mediada por la RNA quinasa *PKR-like* asociada al RE (PERK) juega un importante papel en la exposición de CRT. El proceso por el que tendría lugar sería el siguiente: la activación temprana de PERK conduce a la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α (eIF2 α), en el residuo Serina 51, desencadenándose la activación parcial pre-apoptótica de la caspasa 8. Esta caspasa procesa la proteína Bap31 (proteína del RE que activa la apoptosis mitocondrial), activándose así una ruta que culmina en el transporte anterógrado de CRT y su exocitosis dependiente del complejo proteico SNARE. Finalmente, termina con la exposición de esta CRT en la superficie celular ^[15,16] (Véase *Anexo 1*).

1.3 El retículo endoplasmático como diana terapéutica en mieloma múltiple

1.3.1 Sensibilidad al estrés en el retículo endoplasmático en el mieloma múltiple

Las células plasmáticas transformadas en el mieloma múltiple secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas monoclonales, siendo característica la proteína M, detectable en suero y orina de pacientes. Por ello, requieren un RE bien desarrollado, la expansión del aparato secretor y la producción de proteínas chaperonas para asegurar la correcta traducción y plegamiento de las inmunoglobulinas ^[17].

En este aspecto, la vía UPR desempeña un papel clave en la homeostasis de las células plasmáticas, garantizando el correcto plegamiento de las proteínas producidas. Uno de los mecanismos empleados es el aumento del proceso de degradación de proteínas asociado al retículo endoplasmático (ERAD, “*ER-associated degradation*”) ^[18]. De este modo, aquellas proteínas que no pueden volver a ser plegadas correctamente en el RE, son transportadas al citosol donde serán degradadas por el proteasoma.

El sistema UPR está mediado por tres proteínas transmembrana del RE: la enzima con requerimiento de inositol 1 (IRE1), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) y la RNA quinasa PKR-like asociada al RE (PERK), mencionada en el apartado anterior.

En concreto, ante la presencia de proteínas mal plegadas, PERK dimeriza y se activa por autofosforilación, actuando como quinasa de eIF2 α , lo que conduce a una represión global de la traducción de proteínas. Sería una respuesta eficaz a corto plazo al problema de estrés en el RE. Sin embargo, PERK también promueve la transcripción del factor activador de transcripción 4 (ATF4), el cual induce la transcripción del factor pro-apoptótico CCAAT con homología C/EBP (CHOP, también denominado GADD153) ^[19].

En conclusión, el principal objetivo de la vía UPR es restaurar la homeostasis del RE promoviendo la supervivencia. Pero, si las células experimentan una señalización crónica de esta vía UPR, debido a un estrés prolongado, o se produce un fallo en esta respuesta, acabarán sufriendo activación de caspasas y muerte celular por apoptosis.

1.3.2 Inductores de estrés en el retículo endoplasmático

1.3.2.1 Inhibidores del proteasoma

El proteasoma 26S es un complejo enzimático con actividad proteasa, localizado en el citoplasma y en el núcleo de todas las células eucariotas ^[20]. Una de sus funciones es la degradación de manera controlada de muchas proteínas implicadas en mecanismos de regulación, que ya no son necesarias para la célula o que tienen que ser eliminadas tras un estímulo concreto. Además, otra función fundamental que presenta es la degradación de proteínas mutadas, desnaturalizadas o plegadas de forma incorrecta.

Por lo tanto, la inhibición de la actividad del proteasoma resulta en la detención del ciclo celular y la inducción de una cascada apoptótica, resultado de la rápida acumulación de proteínas dentro de la célula. Respecto al mieloma múltiple, cuyas células plasmáticas malignas producen grandes cantidades proteicas, la inhibición de este complejo enzimático se ha convertido en una diana terapéutica ampliamente estudiada para su tratamiento.

Los inhibidores del proteasoma (PI) más prometedores son los ácidos borónicos, pues son los más potentes y extremadamente selectivos para el proteasoma ^[21]. Dentro de esta clase de compuestos, se encuentra bortezomib (PS-341, Velcade[®]). Es el primer inhibidor (reversible) del proteasoma aprobado por la FDA, actualmente empleado en clínica para el tratamiento del MM refractario y el linfoma de las células del manto ^[22]. Sin embargo, algunos pacientes no responden a la terapia con bortezomib, por lo que se han desarrollado nuevos inhibidores del proteasoma, entre los que destaca carfilzomib (PR-171).

Carfilzomib es eficaz en células resistentes a bortezomib y es más selectivo en la inhibición, pues presenta menos dianas fuera del proteasoma, suponiendo menos efectos secundarios [23]. Se trata de un tetrapéptido basado en una epoxicetona, análogo de la epoxomicina producida naturalmente por actinomicetos [24]. Carfilzomib inhibe irreversiblemente la actividad del proteasoma, uniéndose a su subunidad $\beta 5$ [23,24]. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III, aunque la FDA ha concedido su uso para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple que han recibido al menos dos tratamientos previos (con bortezomib y un IMiD) y que muestren una progresión de la enfermedad en los siguientes 60 días de la finalización de la última terapia [25].

Varios estudios sugieren que la muerte inducida por bortezomib y carfilzomib en células de mieloma múltiple puede atribuirse al estrés prolongado que se generaría al acumularse gran cantidad de inmunoglobulinas mal plegadas dentro del RE [17,26,27]. Este estrés en el RE conduciría a la fosforilación de eIF2 α por la quinasa PERK y a la activación del factor de transcripción pro-apoptótico CHOP, de manera que, si esta respuesta se prolonga en el tiempo se desencadenaría muerte celular.

Por último, pero no menos importante, cabe destacar que datos preliminares indican que estos inhibidores del proteasoma, bortezomib y carfilzomib, inducen muerte celular inmunogénica en células de mieloma múltiple [5,10,28,29].

1.3.2.2 Inhibidores de VCP/p97

En la ruta de degradación vía proteasoma, se requiere que las proteínas mal plegadas se exporten al citosol, donde se localiza este complejo enzimático, y sean marcadas mediante la conjugación con ubiquitina. En este proceso interviene la ATPasa citosólica p97.

p97 (también denominada VCP - “*Valosin-containing protein*”) es una proteína hexamérica de la familia AAA (ATPasas asociadas a diversas actividades celulares). Estas enzimas emplean la energía de la hidrólisis del ATP para modificar estructuralmente diferentes sustratos [30].

Esta proteína p97 media diversas funciones celulares, incluyendo el proceso de degradación asociada al retículo endoplasmático, a través del sistema ubiquitina-proteasoma. El modelo general, propuesto por diversos estudios, indica que p97 se une, directa o indirectamente, a moléculas con ubiquitina, y facilita su transferencia al proteasoma 26S para la posterior degradación proteica [19,31].

De modo que, esta ATPasa citosólica es esencial en la homeostasis proteica celular, estando estrechamente relacionada con el proteasoma, y la degradación de proteínas asociada al RE. Por ello, la inhibición de p97 ha emergido como una nueva estrategia en el tratamiento del cáncer, siendo especialmente importante en las neoplasias malignas altamente secretoras, como el mieloma múltiple.

Se han identificado varios inhibidores de la actividad ATPasa de p97, entre los que destaca DBE-Q. DBE-Q inhibe de manera reversible a p97, induciendo estrés en el RE y, además, DBE-Q regula positivamente la activación de CHOP [19,32]. Todo ello resultaría en una respuesta de estrés en el RE letal.

A pesar de la efectividad terapéutica de los inhibidores del proteasoma en el tratamiento del mieloma múltiple, como se ha comentado anteriormente, la resistencia a estos fármacos continúa siendo un problema. Los mecanismos subyacentes a esta resistencia todavía no se conocen por completo; sin embargo, de forma general, se ha asociado con una suspensión incompleta del proceso de degradación de proteínas asociado al RE y la activación de vías alternativas de degradación proteica, como la autofagia [19,24].

Por lo tanto, con el objetivo de superar la limitación de las resistencias a los inhibidores del proteasoma, una posible aproximación terapéutica en el mieloma múltiple podría ser la combinación de estos inhibidores del proteasoma con inhibidores de la actividad ATPasa de p97.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

En este trabajo fin de grado se pretende contribuir a los conocimientos actuales de los mecanismos de muerte celular inmunogénica (ICD), inducida por fármacos antitumorales, en líneas celulares de mieloma múltiple humano.

En el tratamiento del mieloma múltiple, en los últimos años se han introducido nuevos agentes quimioterapéuticos logrando una notable mejora en la supervivencia media; sin embargo, sigue habiendo un elevado porcentaje de pacientes con mal pronóstico.

En este punto es donde destacan los éxitos recientes de la inmunoterapia en el cáncer. En particular, el grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer” ha descrito recientemente que el inhibidor del proteasoma carfilzomib induce muerte celular inmunogénica en células de mieloma múltiple [28,29]. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende el ahondamiento en este mecanismo.

Teniendo en cuenta esto y que, los ensayos actuales indican que la emisión de las señales características de la ICD depende de la inducción de estrés en el retículo endoplasmático (RE), en este trabajo también se ha estudiado la combinación de inhibidores del proteasoma con otros fármacos que induzcan estrés en el RE. De manera que, dicha combinación serviría para transformar modelos de muerte tolerogénica en muerte inmunogénica. En particular, se estudia la combinación de carfilzomib con DBeQ.

Actualmente, el enfoque *gold-standard* para evaluar la capacidad de un fármaco para inducir ICD se basa en ensayos de vacunación de ratones con células tratadas con los inductores a estudiar [6]. Sin embargo, este tipo de ensayos resulta incompatible con *screenings* a gran escala.

Como alternativa, se han desarrollado varios métodos que permiten el seguimiento de fenómenos asociados a ICD *in vitro*. En este aspecto, ya se ha comentado que uno de los DAMPs fundamentales es la exposición de calreticulina en la cara exterior de la membrana plasmática. Además, datos previos indican que es uno de los marcadores que mejor correlaciona con los efectos observados de ICD *in vivo* [33]. Por lo que, basándonos en todos los conocimientos descritos, se plantea la monitorización de la exposición de calreticulina mediante citometría de flujo para evaluar si las drogas empleadas inducen o no la emisión de este DAMP.

En base a todos los antecedentes expuestos, en este trabajo de fin de grado se plantean los siguientes objetivos:

- I. Evaluar la citotoxicidad de los fármacos carfilzomib y DBeQ en líneas celulares de mieloma múltiple.
- II. Estudiar la posibilidad de efecto sinérgico entre carfilzomib y DBeQ en líneas celulares de mieloma múltiple.
- III. Analizar la exposición de calreticulina, considerándose uno de los principales marcadores de la muerte celular inmunogénica, y su relación con la inducción de estrés en el retículo endoplasmático.
- IV. Analizar la expresión de proteínas implicadas en el estrés del retículo endoplasmático.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Líneas celulares y mantenimiento de cultivos

En este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares establecidas de mieloma múltiple humano: RPMI 8226, U266 y MM.1S, todas ellas disponibles en la colección de líneas del grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”.

En todos los casos, las líneas celulares se cultivaron en el medio de cultivo RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) de Gibco™-Invitrogen, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos (estreptomicina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml). Todas las manipulaciones celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical (*Telstar Bio-II-A/P*), con material previamente esterilizado.

Rutinariamente, los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado (*Heraeus Cell*) a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. Cada 3-4 días, se realizaron pasajes de las líneas celulares, quedando a una densidad celular de 3· 10⁵ células/ml. Además, la morfología celular y la evolución de los cultivos se evaluaron mediante observación en un microscopio invertido (*Nikon*).

3.1.2 Contaje y determinación de la viabilidad celular

Tanto la viabilidad celular como la densidad celular de los cultivos se determinaron mediante contaje con azul Trypan (*Sigma*). Se trata de un colorante vital, capaz de penetrar únicamente en las células cuya membrana plasmática esté dañada (no viables) y teñirlas de color azul, permitiendo su diferenciación de las células viables y apoptóticas que, al no sufrir desestructuración de la membrana, no se tiñen.

Para ello, se siguió el procedimiento descrito en anteriores trabajos^[21,29]. En todos los experimentos realizados, los cultivos celulares presentaron una viabilidad superior al 90%.

3.1.3 Detección de micoplasmas

La detección de micoplasmas se realizó, periódicamente, mediante el kit “*Mycoplasma Gel Detection*” (*Biotools*), siguiendo las instrucciones del fabricante. El método se basa en la detección mediante PCR del material genético de estos microorganismos, tan habituales en laboratorios de cultivos celulares ya que son resistentes a los antibióticos que contiene el medio de cultivo y algunas especies forman parte de la piel y la flora normal de las vías respiratorias humanas. En ningún caso se detectó la presencia de estas bacterias contaminantes.

3.2 Ensayos de citotoxicidad

3.2.1 Condiciones celulares

En cada experimento, se utilizaron placas de 6, 12 ó 24 pocillos en función de los puntos a estudiar. En cada pocillo se sembraron 500 µl de las suspensiones celulares: RPMI 8226 a 2· 10⁵ cél/ml, U266 y MM.1S a 3· 10⁵ cél/ml. Luego, se añadieron los volúmenes adecuados de cada fármaco a estudiar para conseguir las concentraciones finales deseadas, indicadas en el apartado 4. *Resultados y discusión*. En todos los ensayos, se utilizaron como control negativo células sin la adición de ningún fármaco.

3.2.2 Cuantificación de la apoptosis mediante marcaje con anexina V-DY634

La fosfatidilserina (PS) es un tipo de fosfolípido de membrana que se localiza en la capa interna de la membrana plasmática en las células viables y que, cuando comienza el proceso de apoptosis, es expuesta a la capa externa. Por tanto, la localización de PS es uno de los métodos para la detección de la apoptosis en estadios tempranos. Para ello, se emplea anexina V, que es una proteína de la familia de las anexinas capaz de unirse específicamente a la PS, en una reacción dependiente de calcio.

En este trabajo, se ha empleado anexina V acoplada al fluoróforo DY634 ($\lambda_{abs} = 634$ nm, $\lambda_{emis} = 658$ nm), permitiendo la posterior evaluación de la apoptosis mediante citometría de flujo. Para realizar el marcaje con anexina V, el contenido de los pocillos control y tratados se recogieron en tubos de citometría y se centrifugaron a 233xg durante un minuto. Se descartó el sobrenadante y el pellet de cada tubo se resuspendió en 100 μ l de una disolución ABB 1X (*Annexin Binding Buffer*, cuya composición es: Hepes/NaOH 10 mM pH 7,4; NaCl 140 mM y CaCl₂ 2,5 mM). Asimismo, por tubo se añadieron 4 μ l de anexina V-DY634. A continuación, los tubos se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 minutos y, tras la adición de 200 μ L de ABB 1X por tubo, se analizaron los resultados por citometría de flujo.

En algunos ensayos (véase 4. *Resultados y discusión*), se hizo un doble marcaje de anexina V-DY634 con 7-aminoactinomicina D (7-AAD, $\lambda_{abs} = 488$ nm, $\lambda_{emis} = 647$ nm). El 7-AAD es un compuesto fluorescente que presenta afinidad por las regiones de bases guanina y citosina del DNA. Se trata de un colorante vital, capaz de penetrar en células en necrosis y fases tardías de apoptosis, mientras que en las células viables o apoptóticas en fase temprana su permeabilidad es mucho menor. Para ello, tras los 20 minutos de incubación con anexina V-DY634, a cada muestra se añadió 1 μ l de 7-AAD y se analizó en el citómetro de flujo.

Para el análisis, se utilizó el citómetro de flujo FACScalibur™ (*Becton-Dickinson*), el cual presenta 4 canales de detección o fotodetectores (FL), además del FSC y SSC. En este caso, el marcaje con anexina V-DY634 se analizó por aumento de fluorescencia emitida en el canal FL4 Rojo (661±8nm) y la permeabilidad a 7-AAD por la fluorescencia emitida en el canal de detección FL3 Naranja (670 nm). Los datos se analizaron utilizando los softwares *Cell Quest Pro* y *FlowJo 7.6.1*.

3.3 Análisis de la exposición de calreticulina en la membrana plasmática

Para analizar la inducción de muerte celular inmunogénica por la exposición de calreticulina (CRT), las líneas celulares se cultivaron a una densidad celular de $3 \cdot 10^5$ cél/ml, en presencia de los distintos fármacos a estudiar. Tras el tiempo de incubación, se recogieron las células tratadas y sin tratar (control) y se lavaron con PBS con 5% de SFB (para bloquear las posibles interacciones inespecíficas).

Cada muestra se dividió en 3 tubos de citómetro, cada uno con 10^5 cél/ml. En un tubo, se realizó el marcaje con anexina V-DY634, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. En el segundo tubo, se añadieron 50 μ l de PBS con 5% de SFB y 1 μ g de anti-CRT (anticuerpo monoclonal de ratón marcado con el fluoróforo DyLight™-488 (*Enzo*)). En el tercer tubo, se añadieron 50 μ l de PBS con 5% de SFB y 1 μ g del control de isotipo (inmunoglobulina G1 de ratón-DyLight™-488 (*ThermoFisher*)). En este tipo de análisis fue necesario utilizar un control de isotipo para determinar la posible unión inespecífica del anticuerpo anti-CRT en cuestión y nos permitió establecer el punto de corte o valor umbral por encima del cual nuestro marcaje era específico y por tanto positivo.

Las muestras se incubaron 30 minutos en oscuridad a 4°C. En este punto, cabe destacar que se realizaron varias pruebas: en algunos casos, tras el marcaje con los anticuerpos, las células se lavaron con PBS con 5% de SFB; mientras que, en otros casos, no se realizaron los lavados. Así, se comprobó que la mejor opción era no realizar ningún lavado. De esta manera, no se obtuvieron señales inespecíficas y además se evitaba la posible pérdida del marcaje al lavar (ya que la unión de calreticulina a la membrana plasmática es lábil). Asimismo, se realizó un marcaje con 7-AAD para diferenciar las células con la membrana plasmática intacta de las que la tenían comprometida. Así, la señal obtenida con el anticuerpo anti-CRT corresponde solamente con la calreticulina expuesta en la membrana plasmática (ecto-CRT), descartando la del interior celular. Por ello, tras la incubación con los anticuerpos mencionados, se añadió 1 μ l de 7-AAD por tubo, y se analizaron por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por el fluoróforo DyLight™-488 se analizó en el canal FL1 Verde (530±15nm).

3.4 Análisis de la expresión de proteínas mediante *Western Blot*

Esta técnica se utilizó para analizar si los niveles de expresión de la proteína eIF2 α fosforilada y del factor de transcripción CHOP variaron, tras la exposición a los fármacos DBeQ y carfilzomib. Este análisis se realizó en las líneas celulares U266 y MM.1S. *Nota: Los componentes de los tampones empleados en este apartado y de geles de electroforesis quedan recogidos en detalle en Anexos 3 y 4.*

3.4.1 Extracción y fraccionamiento de lisados celulares

Se sembraron 2 placas, cada una con $1,2 \cdot 10^6$ cél/pocillo, y se incubaron durante 24 horas con los fármacos a las concentraciones finales indicadas en el apartado 4. *Resultados y discusión.* Tras el tiempo de incubación, las células se recogieron en tubos Falcon y se lavaron 2 veces con PBS (centrifugaciones a 335xg durante 5 minutos). Se trasvasaron a tubos Eppendorf y, tras otra centrifugación, se eliminó el sobrenadante. A continuación, cada muestra se resuspendió en 20 μ L de tampón de lisis 1X, para lisar las células y extraer las proteínas citoplasmáticas. Se incubaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 20800 xg durante 30 minutos a 4°C, quedándonos con los sobrenadantes (donde se encontraban las proteínas citoplasmáticas a analizar), que se guardaron a -20°C hasta su análisis. Cabe destacar que es fundamental trabajar en frío para evitar la acción de las posibles proteasas del medio no inhibidas degraden a temperatura ambiente nuestras proteínas.

3.4.2 Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS/PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa

En primer lugar, se calcularon los volúmenes necesarios de cada extracto para cargar 50 μ g de proteína en cada pocillo en la posterior electroforesis. Para ello, se determinó la cantidad de proteína total de cada muestra mediante el método del ácido bicinónico (BCA; *Micro BCATM Protein Assay Kit, ThermoFisher*). Tras la cuantificación espectrofotométrica de las proteínas y la correspondiente normalización, se añadió tampón de carga concentrado 3X, que entre sus componentes se encuentra el glicerol que aportó la densidad para que las muestras quedaran recogidas en el fondo de los pocillos, y azul de bromofenol como marcador en el frente.

Posteriormente, la separación de proteínas se realizó en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) con un 0,1% del agente desnaturizante dodecil sulfato de sodio (SDS). Cada gel consta de dos regiones (gel concentrador y gel separador), cuya composición y propiedades quedan recogidas en el Anexo 4. Una vez preparados los geles, polimerizados, y dispuestos en las cubetas de electroforesis (*Bio-Rad*), se carga en cada carril 50 μ g de cada extracto. Asimismo, se cargó un marcador de peso molecular (*SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder*). Las condiciones de electroforesis fueron continuas: voltaje de 180 V y amperaje de 20 mA por gel, durante 2 horas, manteniéndose el sistema refrigerado en hielo.

A continuación, las proteínas separadas previamente en el gel de electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para ello, se preparó cada sándwich en tampón de transferencia, colocando un gel y una membrana de nitrocelulosa entre dos papeles Whatman 3M, todo ello del mismo tamaño. En este paso se verificó que la polaridad era la correcta (membrana de nitrocelulosa en el ánodo y gel en el cátodo). La electrotransferencia se realizó en un equipo de transferencia semiseca de *Bio-Rad* a 20 V y 400 mA durante 75 minutos. Finalmente, las membranas se tiñeron con rojo *Ponceau* (0,1% en acético al 5%, *Merck*) para comprobar la eficacia de la transferencia proteica.

3.4.3 Análisis de proteínas por *Western blot*:

Tras eliminar el colorante rojo *Ponceau*, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en tampón B, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Una vez bloqueadas, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón B. A continuación, se añadió el anticuerpo primario específico frente a la proteína deseada.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-eIF2 α fosforilada de conejo (*ThermoFisher*) y un anticuerpo monoclonal anti-CHOP de ratón (*Santa Cruz Biotechnology*). Ambos se diluyeron en tampón B, con 2,5% de leche desnatada en polvo, para incubarse a la concentración recomendada por el proveedor. Se incubaron durante toda la noche a 4 °C en un agitador.

Al día siguiente, se recuperaron los anticuerpos primarios y se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con tampón B. A continuación, se incubaron durante 1 hora y en agitación con el anticuerpo secundario anti-igG (marcado con peroxidasa -HRP- o fosfatasa alcalina -PA- para la posterior detección de las proteínas). Finalizada la incubación, se lavó 3 veces durante 10 minutos con tampón B y se revelaron las membranas mediante quimioluminiscencia. Para ello, se incubaron con los sustratos correspondientes de HRP (durante 2 minutos) y de PA (durante 5 minutos). Luego, cada membrana se colocó en una funda de plástico transparente dentro del *cassette* de relevado. En un cuarto oscuro con iluminación para revelado fotográfico, se colocó una película radiográfica sobre la funda que contenía las membranas y, tras un determinado tiempo de exposición, se reveló mediante inmersión secuencial en el líquido revelador, agua destilada y líquido fijador.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la citotoxicidad de DBeQ

En primer lugar, se determinó la citotoxicidad causada por DBeQ en las líneas celulares RPMI 8226, U266 y MM.1S. El principal objetivo es la selección de una dosis subletal de este inductor de estrés en el retículo endoplasmático, para combinarlo posteriormente con el inhibidor del proteasoma carfilzomib.

Para determinar si DBeQ induce muerte celular, se realizaron curvas dosis-respuesta de las líneas celulares frente a concentraciones crecientes del fármaco, midiéndose la inducción de apoptosis. Para ello, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células con fosfatidilserina externalizada.

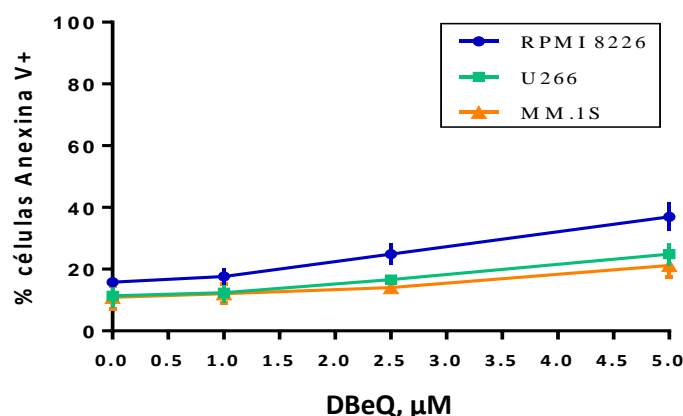


Figura 2. Citotoxicidad de DBeQ en líneas celulares de MM, curva dosis-respuesta a 24 horas. Las células RPMI 8226 se sembraron a una densidad celular de $2 \cdot 10^5$ cél/ml, y las células U266 y MM.1S a $3 \cdot 10^5$ cél/ml, y se dejaron incubando durante 24 horas con diferentes concentraciones de DBeQ (μM). Posteriormente, se determinó la exposición de fosfatidilserina (PS), a través de la unión de anexina V-DY634, y cuantificación mediante citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células anexina V positivas frente a la concentración de DBeQ (μM). Los resultados son la media \pm desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes.

Como se muestra en la **Figura 2**, en todas las líneas celulares estudiadas DBeQ provoca la exposición de fosfatidilserina de forma dependiente de la dosis. Sin embargo, se aprecia que las líneas celulares U266 y MM.1S son más resistentes al efecto citotóxico de DBeQ que las células RPMI 8226. Las concentraciones del fármaco en las que esto se observa más claramente son a 2,5 μM y 5 μM .

Este efecto concuerda con lo observado en el microscopio invertido, pues en las células RPMI 8226 aparecieron cuerpos apoptóticos en la concentración intermedia 2,5 μM de DBeQ; sin embargo, en las células U266 y MM.1S este “burbujeo” celular no se apreció claramente hasta los pocillos con 5 μM .

En conjunto, estos resultados muestran que DBeQ induce apoptosis en las células de mieloma múltiple empleadas, hecho que concuerda con otros estudios previamente realizados [19]. Además, la línea celular RPMI 8226 es más sensible a dicho efecto, en comparación con las otras dos. Por ello, para la posterior combinación con carfilzomib, se eligió una concentración de 2,5 μM de DBeQ en la línea RPMI 8226 mientras que de 5 μM en las líneas celulares U266 y MM.1S.

4.2 Análisis de la combinación de DBeQ y carfilzomib

4.2.1. Estudio del posible efecto sinérgico entre DBeQ y carfilzomib

Cabe comentar que la inducción de muerte celular inmunogénica 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 con potencial inmunogénico para su posible aplicación a la inmunoterapia contra el cáncer, especialmente en el mieloma múltiple pues sigue siendo incurable.

Por lo tanto, una vez caracterizada la sensibilidad a DBeQ, se estudió el posible efecto sinérgico de la combinación de este fármaco con carfilzomib (CFZ). En todos los ensayos de este trabajo, se ha considerado que la combinación de los fármacos actúa de forma sinérgica cuando su efecto inhibitorio combinado es mayor que la suma de los efectos de cada uno por separado.

En función de anteriores resultados del grupo de investigación, inicialmente se escogieron unas concentraciones de 5 nM y 7 nM de CFZ, combinándolas con las dos dosis subtóxicas elegidas de DBeQ. Tras 24 horas de incubación, se cuantificó mediante citometría de flujo la exposición de PS, a través de la unión de anexina V-DY634. Sin embargo, en nuestros resultados, en ninguna de las tres líneas celulares de mieloma múltiple estudiadas se observaron efectos sinérgicos. Las tasas de muerte celular inducidas por CFZ 7 nM fueron muy elevadas. Por ello, al ser tan sensibles a la administración individual de dicho fármaco, la combinación con DBeQ prácticamente no aumentó el efecto citotóxico.

Por lo tanto, estos primeros resultados sugerían que a dosis más bajas de CFZ podría producirse sinergia. Por ello, se decidió cambiar las dosis de CFZ a concentraciones inferiores (2,5 nM y 5 nM).

Cuando analizamos las nuevas dosis (**Figura 3**), las células RPMI 8226 apenas muestran cambios en la muerte celular en ambas combinaciones de CFZ + DBeQ, respecto a los tratamientos con el inhibidor del proteasoma CFZ en solitario. Asimismo, DBeQ ejerce por sí solo bajo efecto citotóxico. Por tanto, a las nuevas concentraciones estudiadas no se percibe un claro efecto sinérgico en las células RPMI 8226. Además, la dispersión de los resultados en esta línea celular (expresada como SD) de nuevo es elevada y no se encuentran en condiciones óptimas de viabilidad, lo que puede llevar a una sensibilización de las células a los estímulos apoptóticos. No obstante, a pesar de estos inconvenientes, en un trabajo previo del grupo también se observaba que las RPMI 8226 eran menos sensibles al inhibidor del proteasoma bortezomib [34].

Respecto a la línea celular U266, la combinación de DBeQ (5 μM) con CFZ (2,5 nM) sugiere un efecto sinérgico. A pesar de la alta dispersión en el punto de CFZ (2,5 nM), su combinación con DBeQ aumenta enormemente su toxicidad (sobrepasándose la correspondiente línea punteada). Por otro lado, en la concentración más elevada de CFZ (5 nM) el porcentaje de muerte celular es ya alto (en torno al 80%), por lo que en el tratamiento combinado prácticamente toda la exposición de fosfatidilserina parece ser debida a la acción de carfilzomib por sí solo. En la línea celular MM.1S se obtienen los mismos resultados que en las células U266.

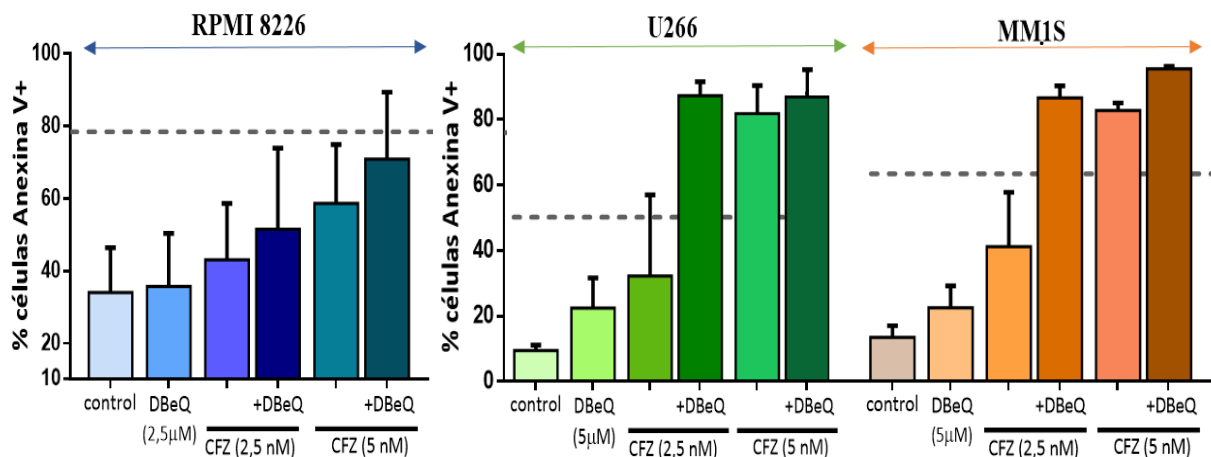


Figura 3. Efecto de la combinación de DBeQ y carfilzomib (CFZ). La línea celular RPMI 8226 se sembró a $2 \cdot 10^5$ cél/ml, y las líneas celulares U266 y MM.1S a $3 \cdot 10^5$ cél/ml. Todas las líneas se trataron con CFZ (2,5 nM y 5 nM), o las respectivas combinaciones con DBeQ (2,5 μM en las células RPMI 8226, y 5 μM en U266 y MM.1S). Tras 24 h de incubación, se cuantificó por citometría de flujo la exposición de PS, a través de la unión de anexina V-DY634. Los resultados son la media \pm SD de 4-5 experimentos independientes. La línea punteada representa la suma de los valores de muerte celular correspondientes a los puntos DBeQ (2,5 μM) y CFZ (2,5nM)

De manera que, en función de estos resultados en la línea celular RPMI 8226, se decidió prescindir de ella en los siguientes experimentos. Sin embargo, en las células U266 y MM.1S sí se apreció un efecto sinérgico claro entre DBeQ (5 μM) y CFZ (2,5 nM), con respecto a la administración individual de los fármacos. Por lo tanto, en estas dos líneas celulares, parece que la inducción de estrés en el retículo endoplasmático por DBeQ influye significativamente en el efecto citotóxico de carfilzomib por sí solo.

Este resultado correlaciona con los observados en un estudio anterior^[18], donde la combinación del otro inhibidor del proteasoma bortezomib, tanto con DBeQ como con Eer1 (Eeyarestatina 1, otro fármaco inductor de estrés en el RE), indujo muerte celular sinérgica en células de MM (concretamente, en la línea celular U266) y en el linfoma de células del manto.

4.2.2 Análisis en el tiempo de la sinergia entre DBeQ y carfilzomib

En vista del efecto sinérgico observado entre DBeQ y carfilzomib, dependiente de la dosis administrada de cada uno de ellos, se estudió si, además, se produce de forma dependiente del tiempo.

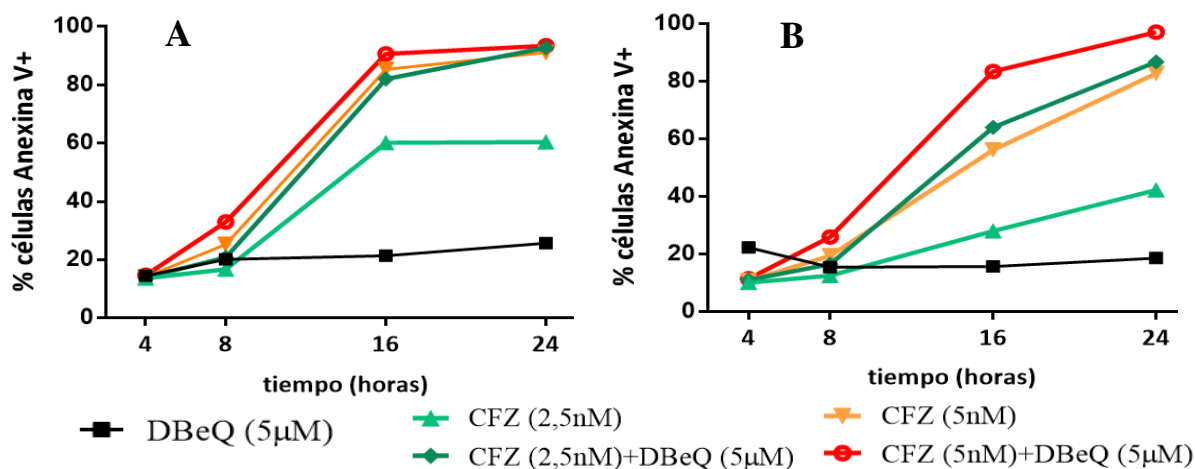


Figura 4. Curvas tiempo-respuesta (time course) de citotoxicidad, (A) en la línea celular U266, (B) en la línea celular MM.1S. Las células U266 y MM.1S se sembraron a una densidad celular de $3 \cdot 10^5$ cél/ml, y se incubaron con las dosis de DBeQ, CFZ o sus respectivas combinaciones, a las concentraciones indicadas en la leyenda. Tras 4, 8, 16 y 24 horas se analizó la exposición de fosfatidilserina mediante marcaje con anexina V-DY634 y análisis por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células anexina V+ frente al tiempo de incubación. n = 1

En la **Figura 4 (A y B)**, podemos apreciar que el efecto citotóxico de DBEq se mantiene más o menos a niveles bajos a lo largo del tiempo en ambas líneas celulares, al contrario que el efecto citotóxico de carfilzomib (CFZ) que va aumentando. Respecto a la concentración de 2,5 nM de CFZ, en la línea celular U266, se observó un efecto citotóxico máximo a las 16 horas de incubación, manteniéndose el mismo nivel elevado hasta las 24 horas. En la línea celular MM.1S, también se observa un aumento del efecto citotóxico de CFZ conforme transcurre el tiempo, alcanzándose el mayor valor a 24 horas. En esta línea celular, la muerte por apoptosis inducida por solo CFZ es menor que en las células U266.

En cuanto a los efectos de la combinación CFZ (2,5 nM) + DBEq (5 µM), podemos apreciar que en ambas líneas celulares hasta las primeras 8 horas no aumenta prácticamente la citotoxicidad con respecto a la administración individual de los fármacos. Tras 8-16 horas de incubación es cuando, tanto en las células U266 como MM.1S, aumenta más drásticamente la muerte celular por apoptosis, y sigue progresivamente hasta las 24 horas. En estos dos puntos temporales (16 horas y 24 horas), se observa que el efecto citotóxico de la combinación de ambos fármacos es claramente mayor que el de CFZ 2,5nM. Por lo tanto, esto parece indicar que es a tiempos largos cuando los dos fármacos actúan de manera sinérgica, potenciando mutuamente su efecto citotóxico.

Por otro lado, en ambas líneas celulares y en la mayoría de puntos temporales estudiados, la línea que representa el efecto de CFZ (5 nM) + DBEq (5 µM) se encuentra próxima o superpuesta a la línea de CFZ (5nM). Por lo tanto, en esta combinación con una alta dosis de CFZ, prácticamente toda la exposición de fosfatidilserina parece ser debida a la acción de CFZ por sí solo, hecho ya observado en anteriores experimentos a 24 horas (**Figura 3**). En resumen, se sugiere que el efecto sinérgico entre DBEq y carfilzomib aumenta conforme transcurre el tiempo, obteniéndose los mayores valores de citotoxicidad a tiempos largos de incubación (en torno a 24 horas).

4.2.3 Estudio del tipo de muerte celular inducida por DBEq y carfilzomib

Una vez observado que la combinación de ambos fármacos (a determinadas concentraciones) induce sinergia, se procedió a estudiar el mecanismo de muerte celular que tiene lugar. En concreto, se estudió la participación de las caspasas (cisteín-proteasas con especificidad de aspártico) ya que son las principales responsables de las modificaciones morfológicas y bioquímicas presentes en la apoptosis. Para ello, se utilizó el inhibidor general de caspasas Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (ZVAD-FMK).

Como se muestra en la **Figura 5**, en el marcaje doble con anexina V-DY634 y 7-AAD se distinguen 4 tipos de poblaciones celulares. En primer lugar, las células viables son negativas tanto para anexinaV como para 7-AAD (AnnexV⁻/7-AAD⁻). En cuando a las células AnnexV⁺, se diferencian 2 poblaciones en función del marcaje con 7-AAD. Por un lado, las AnnexV⁺/7-AAD⁻ corresponden con células en etapas tempranas de apoptosis. Por otro lado, las células AnnexV⁺/7-AAD⁺ representarían células necróticas o en estadios más avanzados de apoptosis. Por último, la población AnnexV⁻/7-AAD⁺ también podrían considerarse como células necróticas.

En todos los casos, los resultados (**Figura 5**) muestran que en las células tratadas con los respectivos fármacos y con ZVAD-FMK, la población doble negativa (AnnexV⁻/7-AAD⁻) es mayor con respecto a las tratadas sin el inhibidor. Así, estos datos indican que las caspasas están implicadas en la muerte celular inducida por DBEq y CFZ. Esto se corresponde con artículos anteriores, en los que se demostraba la implicación de las caspasas en la muerte inducida tanto por DBEq como por CFZ ^[23,32].

Cabe destacar que el efecto protector de ZVAD-FMK depende de la línea celular estudiada, pues se observa una protección prácticamente completa en la línea celular U266, mientras que en las células MM.1S es menor. Estos resultados coinciden con datos previos del grupo, en los que, del mismo modo, el inhibidor de caspasas presentaba un comportamiento distinto en cada línea celular ^[28].

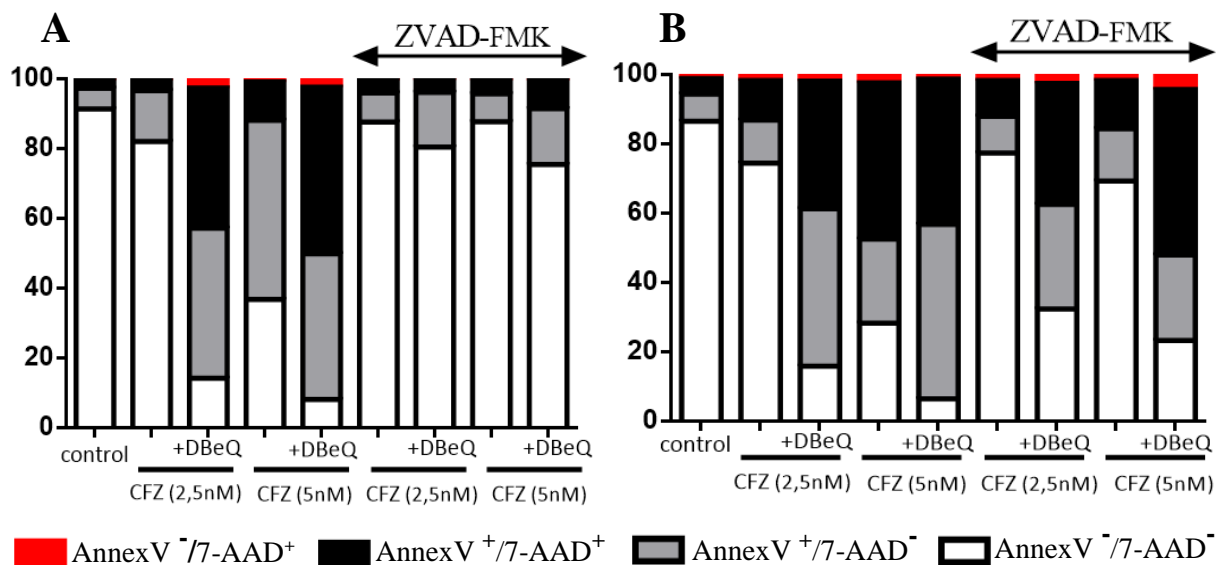


Figura 5. Estudio del tipo de muerte celular. Efecto del inhibidor de caspasas ZVAD-FMK sobre la muerte inducida por DBeQ y carfilzomib, (A) en células U266, (B) en células MM.1S. Las líneas celulares U266 y MM.1S se sembraron a una densidad celular de $3 \cdot 10^5$ cél/ml. Una hora antes de adicionar ambos fármacos, se pre-incubaron con ZVAD-FMK (50 μ M). Transcurrido dicho tiempo, se incubaron con DBeQ (5 μ M) y CFZ (2,5 nM y 5 nM), o sus respectivas combinaciones. Tras 24 horas, se cuantificó mediante citometría de flujo el marcaje de anexina V-DY634 y 7-AAD. Los resultados son la media de 2 experimentos independientes, en el caso de la línea celular U266, y de 3 experimentos independientes, en el caso de la línea celular MM.1S.

En ambas líneas celulares (**Figura 5**) se aprecia que la población de células AnnexV⁻/7-AAD⁺ es muy reducida, lo que de nuevo sugiere que el principal tipo de muerte celular es por apoptosis. Sin embargo, cuando las caspasas están inhibidas podría inducirse una muerte independiente de caspasas, como parece que ocurre en el caso de la línea celular MM.1S (ya que ZVAD-FMK solo protege parcialmente). No obstante, dado que este método no nos permite distinguir entre los tipos de muerte alternativos a la apoptosis, sería necesario la realización de ensayos adicionales para identificar el mecanismo de muerte celular desencadenado.

4.2.4 Combinación de DBeQ con alisertib

Con el objetivo de estudiar si la inducción del efecto sinérgico observado entre DBeQ y carfilzomib es específica de la acción de los inhibidores del proteasoma, se realizó el mismo ensayo de citotoxicidad, pero combinando DBeQ con alisertib.

Alisertib (MLN8237) es un inhibidor de la serín/treonín quinasa Aurora A, la cual desempeña un importante papel en la división celular. Concretamente, durante la mitosis, esta enzima se localiza principalmente en los centrosomas donde regula su maduración así como la formación del huso mitótico^[35]. De esta manera, el mecanismo por el que ejerciera citotoxicidad sería totalmente distinto al de los inhibidores del proteasoma. Dado que se trata de un fármaco que afecta a la mitosis celular, además de ejercer un bloqueo sobre este paso, es necesario medir la citotoxicidad a tiempos largos para poder ver un efecto sobre las células. Por ello se realizaron los ensayos tanto a 24 horas como a 48 horas.

Las concentraciones empleadas de alisertib se eligieron en función de curvas dosis-respuesta previamente realizadas. Dado que la línea celular MM.1S presentaba mayor sensibilidad a este fármaco, en estas células se utilizó menor concentración de alisertib (25 nM), con respecto a las células U266 (alisertib 50 nM). En ambos casos, se trata de dosis subletales con el objetivo de poder ver si hay efecto sinérgico.

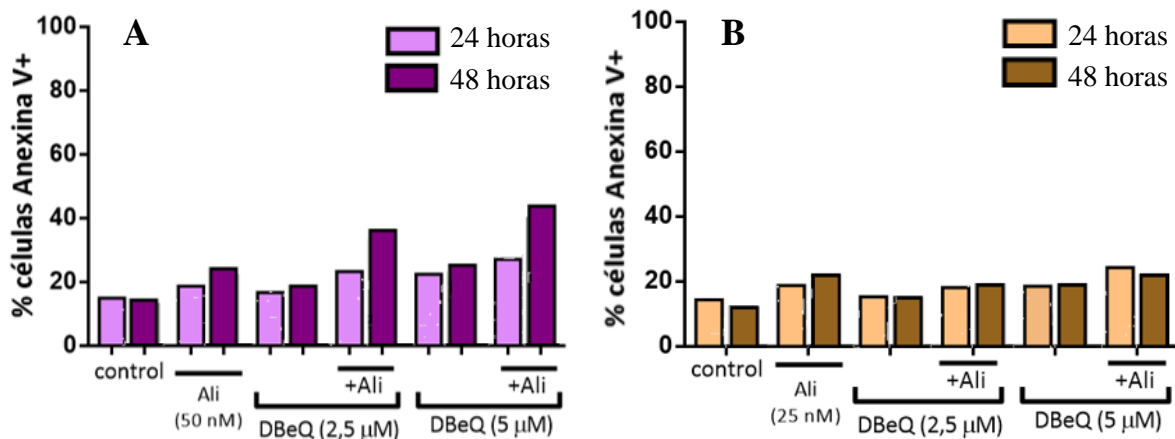


Figura 6. Efecto de la combinación de DBeQ y alisertib (Ali). (A) En la línea celular U266, (B) En la línea celular MM.1S. Las células U266 y MM.1S se sembraron a $3 \cdot 10^5$ cél/ml. Ambas líneas celulares se incubaron con DBeQ (2,5 μ M y 5 μ M), con alisertib (50 nM en las células U266 y 25 nM en las células MM.1S), y sus combinaciones. Se realizó el estudio tras 24 horas y tras 48 horas de incubación (véase leyenda). Mediante citometría de flujo se cuantificó la exposición de fosfatidilserina, a través de la unión de anexina V-DY634. n = 1

En la **Figura 6** se observa que, tras 24 horas de incubación, el efecto citotóxico tanto de alisertib como de DBeQ es bajo y no se produce sinergia en ninguna de las condiciones ensayadas ni en ninguna de las dos líneas celulares. Tras 48 horas de incubación, la administración de solo alisertib ó de solo DBeQ tampoco aumenta el porcentaje de células muertas respecto al control, en ningún caso. Respecto a la combinación de ambos fármacos, a las 48 horas, en las células MM.1S (**Figura 6B**) no supuso apenas incremento de la muerte celular, mientras que en las células U266 (**Figura 6A**) aparece un pequeño aumento. Sin embargo, la variación es baja, por lo que con esta combinación DBeQ y alisertib no se consigue potenciar significativamente el efecto citotóxico, al menos en las condiciones estudiadas.

Por lo tanto, todos estos resultados sugerirían que la inducción del efecto sinérgico depende del mecanismo de acción de los fármacos empleados y que el efecto potenciado por el DBeQ podría ser específico de los inhibidores del proteasoma.

4.3 Estudio de la posible inducción de muerte celular inmunogénica

La muerte celular inmunogénica (ICD) se describe como un tipo de muerte celular regulada que induce la activación del sistema inmune. En este aspecto, ya se ha comentado que la exposición de calreticulina (ecto-CRT) en la cara exterior de la membrana plasmática es uno de los principales patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) [4,7,11]. Por ello, analizamos la exposición de CRT en las células de mieloma múltiple tratadas con los fármacos y combinaciones empleados en los apartados anteriores.

Asimismo, teniendo en cuenta que el estrés en el RE participa en la vía de exposición de CRT [4,7,12,13,14], también se analizó la posible inducción de ICD con la combinación de carfilzomib y DBeQ.

4.3.1 Estudio de la exposición de calreticulina en el tiempo

Diversos estudios proponen que, en la mayoría de casos, la exposición de CRT es un evento pre-apoptótico, precediendo a la exposición de la fosfatidilserina (PS) y a otros signos morfológicos característicos de la apoptosis [4,7,9,10,11,12]. De manera que, con el fin de confirmar este hecho en nuestro modelo, se realizó una curva tiempo-respuesta (*time course*) en las líneas celulares U266 y MM.1S. Para ello, las células U266 y MM.1S se trataron con DBeQ (2,5 μ M), carfilzomib (5 nM), así como con sus respectivas combinaciones. Además, se incluyó un control positivo con bortezomib (Brt, 10 nM) [9,11,29]. Tras 2, 4, 8 y 24 horas de incubación, se recogieron las células y se analizó por citometría de flujo la exposición de CRT y la muerte celular con anexina V-DY634.

Asimismo, se realizó un marcaje con 7-AAD para diferenciar las células con la membrana plasmática intacta de las que la tenían comprometida. Así, se analizaron los niveles de ecto-CRT únicamente en las células 7-AAD negativas, para poder medir específicamente la CRT expuesta en la membrana (ecto-CRT), descartando la del interior celular. En el Anexo 6 se muestra con más detalle el análisis que se llevó a cabo, representándose el dot-plot (FSC vs 7-AAD) y el histograma de la expresión de CRT, de algunos de los puntos estudiados.

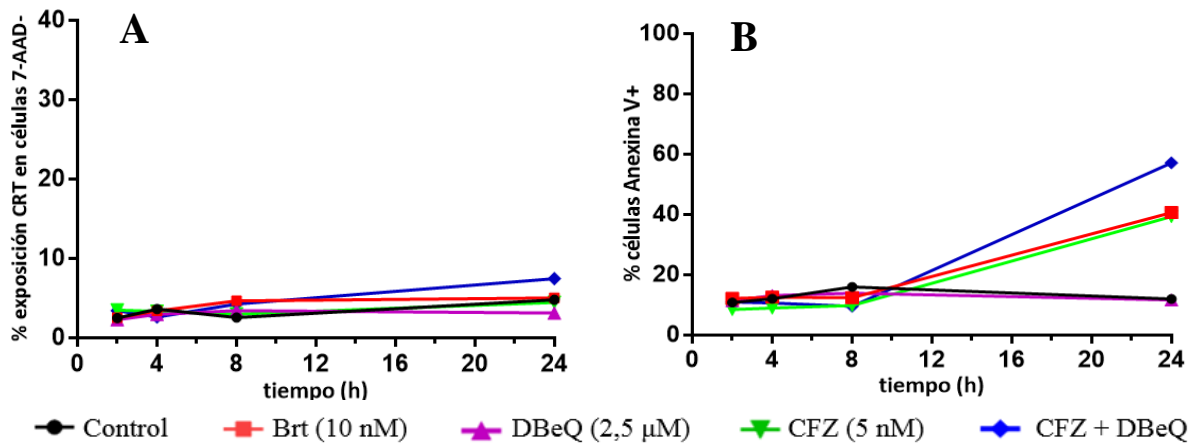


Figura 7. (A) Exposición de calreticulina (CRT) en el tiempo (*time course*), en la línea celular U266. Además, (B) se midió la muerte celular por la exposición de fosfatidilserina con anexina V-DY634. Las células U266 se sembraron a $3 \cdot 10^5$ cél/ml y se incubaron con las dosis de DBeQ, CFZ o su combinación, a las concentraciones indicadas en la leyenda. Como control positivo se utilizó bortezomib (Brt, 10 nM). Tras 2, 4, 8 y 24 horas se analizó la exposición de CRT en la membrana plasmática, siguiendo el procedimiento del apartado 3.3 de *Materiales y Métodos*. Se seleccionaron únicamente las células 7-AAD negativas. n = 1

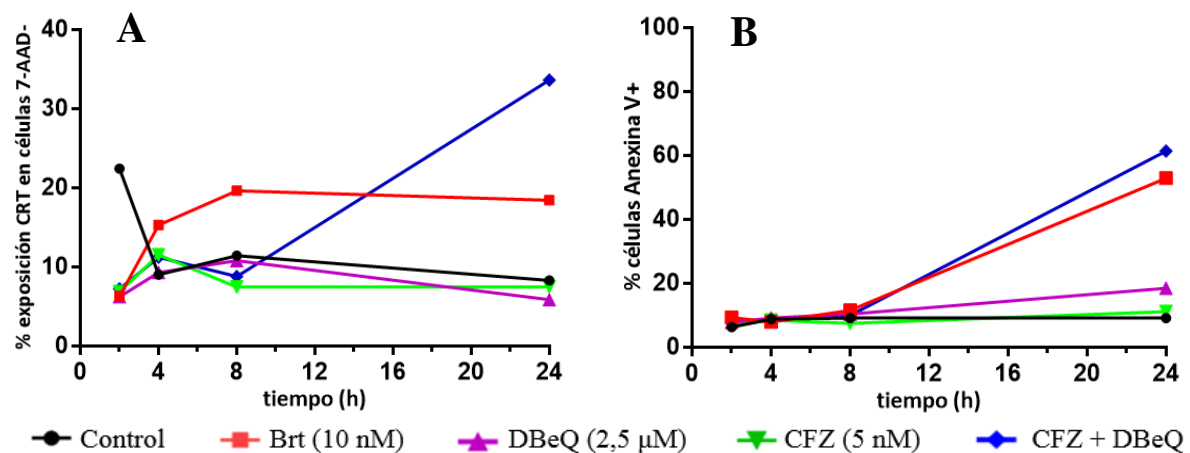


Figura 8. (A) Exposición de calreticulina (CRT) en el tiempo (*time course*), en la línea celular MM.1S. Además, (B) se midió la muerte celular por la exposición de fosfatidilserina con anexina V-DY634. Las células MM.1S se sembraron a $3 \cdot 10^5$ cél/ml y se incubaron con las dosis de DBeQ, CFZ o su combinación, a las concentraciones indicadas en la leyenda. Como control positivo se utilizó bortezomib (Brt, 10 nM). Tras 2, 4, 8 y 24 horas se analizó la exposición de CRT en la membrana plasmática, siguiendo el procedimiento del apartado 3.3 de *Materiales y Métodos*. n = 1

Como se muestra en las **Figuras 7A** y **8A**, tras la administración de DBeQ o CFZ por sí solos, no se induce la exposición de CRT de manera relevante en los tiempos analizados en ninguna de las dos líneas celulares. En comparación, al combinarse CFZ + DBeQ se observa que aumenta la exposición de CRT tras tiempos largos de incubación con ambos fármacos (sobre todo entre 16-24 horas), superando a la obtenida con el control positivo (bortezomib). Por lo tanto, estos datos sugieren que el tratamiento combinado con CFZ y DBeQ induce la exposición de CRT y, además, que esto ocurre principalmente a tiempos largos de incubación, siendo este efecto más pronunciado en la línea celular MM.1S.

Asimismo, estos resultados (**Figuras 7A y 8A**) pueden relacionarse con los efectos citotóxicos producidos por ambos fármacos (**Figuras 7B y 8B**, respectivamente). En ambas líneas celulares, podemos apreciar que la citotoxicidad de la administración individual de DBeQ o CFZ es mucho menor a la causada por su combinación. Además, esta muerte celular por apoptosis inducida por la combinación de CFZ y DBeQ aumenta drásticamente a partir de 8 horas de incubación, es decir, a largos tiempos.

Por lo tanto, a la vista de todos los resultados obtenidos (**Figuras 7 y 8**), se sugiere que la exposición de CRT ocurre de manera paralela a la muerte celular por apoptosis, ya que ambos eventos tuvieron lugar a tiempos largos. Esta hipótesis diverge con lo propuesto por diversos estudios que, como ya se ha comentado, afirman que la exposición de CRT es un evento pre-apoptótico [5,36]. Sin embargo, debe tenerse cuenta que la mayoría de esos estudios corresponden a un modelo celular distinto (cáncer de colon murino), mientras que en este trabajo el modelo celular empleado han sido líneas celulares humanas de mieloma múltiple (cáncer hematológico). No obstante, también hay que tener en cuenta que los resultados presentados corresponden a un único experimento, por lo que habría que realizar un número adecuado de repeticiones para obtener datos estadísticamente válidos que permitieran obtener conclusiones.

4.3.2 Evaluación de la muerte inmunogénica inducida por carfilzomib y DBeQ

Una vez observado que la combinación CFZ + DBeQ aumenta la exposición de calreticulina a tiempos largos, se procedió a analizar de forma más detallada este fenómeno tras 16 horas de incubación. Este tiempo nos permite observar el aumento de la exposición de calreticulina, evitando que la muerte celular sea demasiado elevada para poder analizar un número adecuado de células 7-AAD⁻.

Para ello, las líneas celulares U266 y MM.1S se trataron con las mismas condiciones del experimento anterior (DBeQ 2,5 μ M, CFZ 5 nM o su combinación). También se estudió la concentración de 7 nM de carfilzomib, puesto que a esta dosis el grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer” observó recientemente que inducía exposición de calreticulina [28,29]. Además, se incluyeron un control negativo con mitomicina c (10 μ g/ml) y un control positivo con bortezomib (Brt, 10 nM), ya que se ha descrito que mitomicina c no induce la exposición de CRT, mientras que este efecto sí se observa con bortezomib [11].

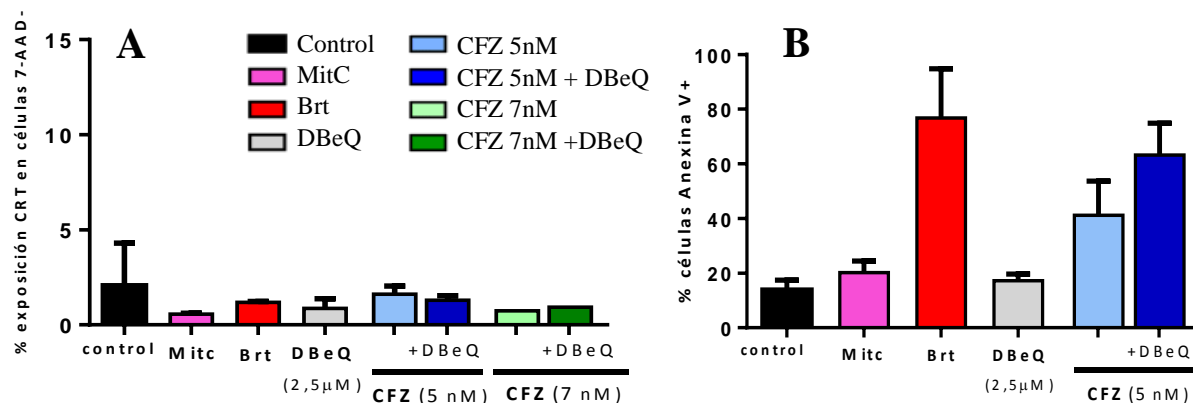


Figura 9. (A) Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular U266, (B) análisis de la muerte celular por exposición de fosfatidilserina con anexina V-DY634. Las células U266 se sembraron a $3 \cdot 10^5$ cél/ml en presencia de DBeQ, carfilzomib (CFZ) o la combinación de ambos, a las concentraciones señaladas. Como control negativo de muerte inmunogénica se utilizó mitomicina c (Mitc, 10 μ g/ml), y como control positivo bortezomib (Brt, 10 nM). Tras 16 h de incubación se analizó la exposición de PS y la integridad de la membrana plasmática mediante marcaje con Anexina V-DY634 y 7-AAD, respectivamente. Los resultados son las medias \pm SD de 1-2 experimentos independientes. El análisis de ecto-CRT en células totales queda recogido en *Anexo 7*.

Cuando analizamos las células 7-AAD⁻ negativas, en la línea celular U266 (**Figura 9A**), no se visualizan cambios en los niveles de exposición de CRT en la membrana plasmática en ninguno de los puntos tratados con los fármacos, con respecto al control.

Incluso en bortezomib (control positivo) tampoco se observa un aumento de exposición de CRT. Además, es posible descartar que dichos fármacos no hayan causado ningún efecto sobre las células ya que se observa elevada citotoxicidad en el marcaje con anexina V-DY634 (**Figura 9B**).

A pesar de que estos datos concuerdan con el *time course* de exposición de CRT (**Figuras 7A y 8A**), estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente en el grupo “Apoptosis, Inmunidad y Cáncer”, que indicaron que tanto bortezomib como carfilzomib aumentaban los niveles de ecto-CRT en la línea de mieloma múltiple U266. Por ello, dada la elevada variabilidad intrínseca observada en estas líneas celulares, se requeriría la confirmación posterior mediante la realización de nuevos experimentos independientes en las mismas condiciones.

Con respecto a la línea celular MM.1S (**Figuras 10 y 11**), se observan dos tendencias en función de los niveles de estrés basal. Para la siguiente discusión, debe recordarse que el estrés en el retículo endoplasmático (RE) participa en la vía de exposición de CRT [4,7,12,13,14].

Por un lado, cuando las células MM.1S presentan un nivel de estrés basal bajo (**Figura 10A**), con baja ecto-CRT basal, permite observar el aumento de la exposición de CRT tras el tratamiento con los distintos fármacos. Además, se observa que bortezomib (control positivo) ha inducido la exposición de CRT en la membrana en estas células de MM, coincidiendo con los datos de estudios anteriores [5,10,28]. Por su parte, DBeQ solo no indujo exposición de CRT en la membrana plasmática, obteniéndose niveles semejantes al control. También se visualiza que en las combinaciones (CFZ 5nM +DBeQ; CFZ 7nM +DBeQ) se alcanzan niveles superiores de exposición de CRT, con respecto a las dosis individuales de CFZ (5 nM y 7 nM). De hecho, la combinación de ambos fármacos iguala, o ligeramente supera, a la exposición de CRT obtenida con el control positivo (bortezomib). Además, se observa que los fármacos ejercieron su efecto citotóxico, tal y como muestra el marcaje con anexina V-DY634. En este caso, los datos sugieren que el tratamiento con carfilzomib, y sobre todo la combinación de carfilzomib con DBeQ, induce muerte celular inmunogénica, basándonos en la exposición de CRT.

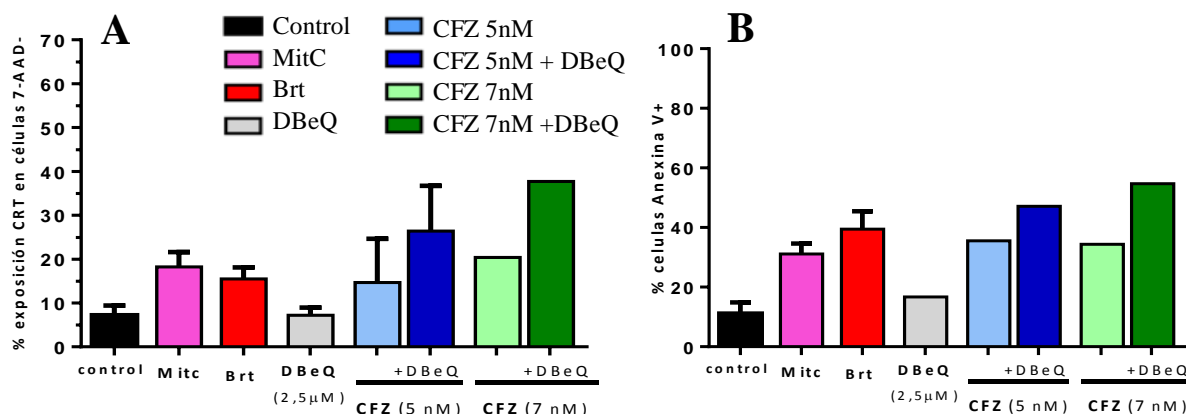


Figura 10. (A) Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular MM.1S, nivel de estrés basal bajo. (B) Análisis de la muerte celular por exposición de fosfatidilserina con anexina V-DY634.

Figuras 10 y 11: Las células MM.1S se sembraron a $3 \cdot 10^5$ cél/ml en presencia de DBeQ (2,5 μM), carfilzomib (CFZ 5nM y 7 nM), o la combinación de ambos. Como control negativo de muerte inmunogénica se utilizó mitomicina c (Mitc, 10 μg/ml), y como control positivo bortezomib (Brt, 10 nM). Tras 16 horas de incubación se analizó la exposición de CRT en la membrana plasmática, seleccionando únicamente las células 7-AAD negativas. Los resultados son las medias \pm SD de 2-3 experimentos independientes. El análisis de ecto-CRT en células totales queda recogido en *Anexo 7*.

Por otro lado, cuando las células MM.1S presentan un elevado nivel de estrés basal (**Figura 11A**), con elevada ecto-CRT basal, aunque se induzca farmacológicamente estrés en el RE de estas células, no exponen mayores niveles de calreticulina. A pesar de que no se observa efecto sobre este DAMP, los fármacos sí provocaron una elevada muerte celular (**Figura 11B**).

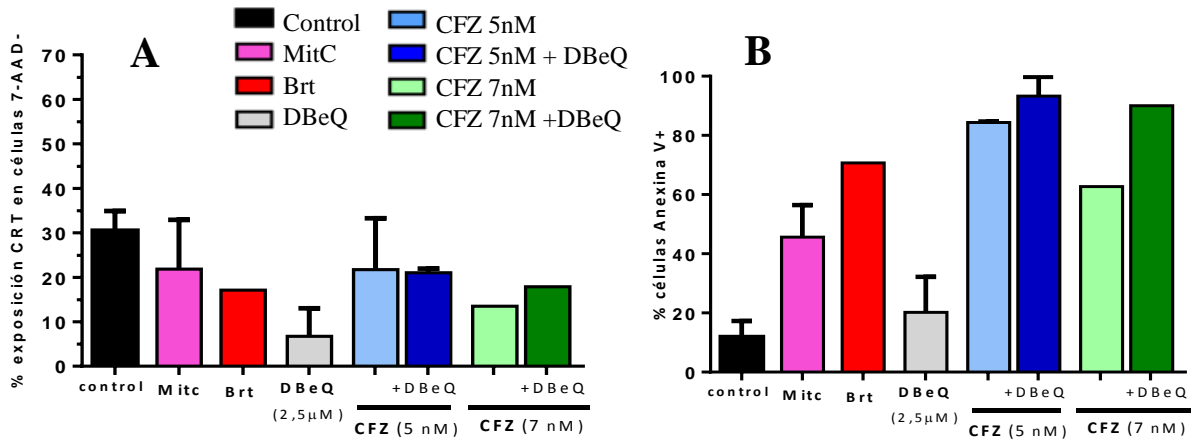


Figura 11. (A) Evaluación de la muerte celular inmunogénica en la línea celular MM.1S, nivel de estrés basal alto. (B) Análisis de la muerte celular por exposición de fosfatidilserina con anexina V-DY634.

Respecto al elevado nivel de exposición de CRT con la mitomicina c (control negativo), una posible explicación es que dado las células de MM son más sensibles a alteraciones en el RE, aunque la mitomicina c no afecte de manera directa, puede que otro estrés celular adicional potencie dicho estrés en el RE y la consecuente exposición de CRT. Además, los datos publicados preceden mayoritariamente de la línea de ratón CT26 [5,36], siendo probable que las células de mieloma múltiple humano presenten un comportamiento diferente.

Por todo ello, los resultados en la línea celular MM.1S sugieren que, a pesar de provocar un efecto citotóxico con ambos fármacos, el nivel de estrés basal influye en la exposición de calreticulina.

4.3.2.1 Dependencia del nivel de estrés basal en la exposición de calreticulina

A continuación, se muestran dos histogramas representativos de las dos tendencias obtenidas en la exposición de calreticulina en la línea celular MM.1S.

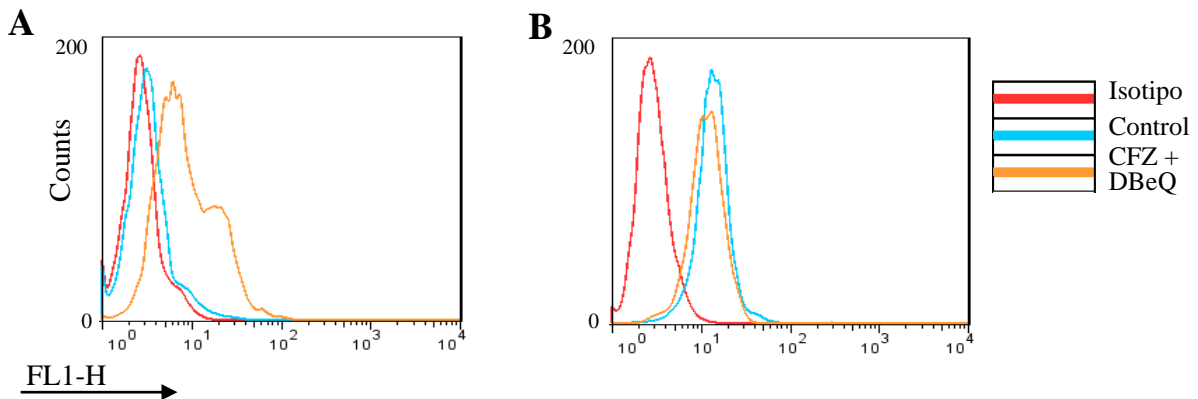


Figura 12. Histogramas representativos del análisis de expresión de calreticulina (CRT) en la línea celular MM.1S. (A) En células con bajo porcentaje de exposición basal de CRT. (B) En células con alto porcentaje de exposición basal de CRT. Las células MM.1S se sembraron a una densidad celular de $3 \cdot 10^5$ cél/ml. Se trataron con CFZ (5 nM) +DBeQ (2,5 μM). Tras 16 horas de incubación, tanto en las células tratadas como no tratadas, se analizó la exposición de CRT en la membrana plasmática con el anticuerpo anti-CRT-DyLight™-488, cuantificándose la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo (canal FL1). Se seleccionaron únicamente las células 7-AAD negativas. Se representa el número de eventos frente a la intensidad de fluorescencia del fluoróforo DyLight™-488. La línea roja corresponde con el control de isotipo, que nos sirve para determinar la posible unión inespecífica del anticuerpo anti-CRT, permitiéndonos establecer el punto de corte o valor umbral por encima del cual el marcaje es específico y por tanto positivo. La línea azul corresponde a las células sin tratar y la naranja a las células tratadas con CFZ (5 nM) +DBeQ (2,5 μM).

En ambos casos, **Figuras 12A y 12B**, se observa que el marcaje con el anticuerpo anti-CRT da valores de fluorescencia mayores que en el control de isotipo, lo cual indica que la especificidad de nuestro marcaje anti-CRT es alta.

El análisis de la **Figura 12A**, muestra que el pico correspondiente al control (células sin tratar) se localiza en una intensidad de fluorescencia próxima a la del isotipo y, por lo tanto, presenta un bajo marcaje basal. Como se ha comentado anteriormente, esto permite observar un desplazamiento del pico hacia mayores intensidades de fluorescencia cuando las células se tratan con CFZ (5nM) + DBEq (2,5 μ M), induciéndoles estrés. Además, cabe destacar la aparición de una subpoblación en las células tratadas, con mayor marcaje de ecto-CRT.

Por otro lado, en el análisis de la **Figura 12B**, se observa que tanto el pico de las células sin tratar como el pico de las células tratadas muestran valores elevados y similares. Por ello, en este caso, las células en situación basal se encuentran con mayor estrés y presentan un mayor marcaje de ecto-CRT. Esta situación no nos permite ver el aumento de la exposición de calreticulina en las células tratadas con respecto a las células sin tratadas (control). De hecho, en estas células control parece que se ha alcanzado el máximo de exposición de calreticulina si lo comparamos con la intensidad de fluorescencia observada en las células tratadas de la **Figura 12A**.

Todo lo expuesto anteriormente sugiere que la exposición de calreticulina es variable. Dicha variabilidad puede estar influenciada por el estrés basal de las células. De esta manera, cuando en situación basal las células están demasiado estresadas, éstas llegan al máximo nivel de exposición de calreticulina y, por lo tanto, no permiten ver diferencias con el tratamiento. Por lo tanto, el estado de estrés basal de las células parece ser determinante en la cuantificación de este DAMP. Recientemente, se ha descrito que pacientes con leucemia mieloide aguda (otra neoplasia hematológica) presentaban niveles basales elevados y heterogéneos de exposición de calreticulina, con respecto a pacientes sanos. Además, se observaba que dicho DAMP no aumentó tras el tratamiento con quimioterapia ^[37]. Esta observación sugeriría que la emisión de DAMPs, como consecuencia del elevado nivel de estrés basal, probablemente es debida al propio proceso de transformación maligna, el cual conlleva una sobrecarga de la mayoría de los procesos celulares (incluyendo la síntesis de proteínas y su plegamiento).

A la vista de todos estos resultados, para comprobar si esto también sucede en el caso del mieloma múltiple, sería interesante estudiar la expresión basal de calreticulina en células plasmáticas tanto de pacientes enfermos como de pacientes sanos. Dado que el número de células plasmáticas en médula ósea en una situación normal es bajo, esto conllevaría una dificultad intrínseca. Una aproximación más factible sería medir los niveles de ecto-CRT en linfocitos B (que pertenecen al mismo linaje celular).

4.4 Análisis de expresión de eIF2 α fosforilada y CHOP por *Western Blot*

El carfilzomib y DBEq afectan a etapas clave de la homeostasis proteica celular, produciendo estrés en el principal orgánulo que controla este proceso, el retículo endoplasmático. Como se ha comentado anteriormente, en respuesta a dicho estrés, el retículo endoplasmático activa la vía UPR. En este proceso desempeña un papel clave la fosforilación de eIF2 α por la quinasa PERK y la activación del factor de transcripción pro-apoptótico CHOP. Para determinar si estos eventos tienen lugar en presencia de carfilzomib y DBEq, examinamos los niveles de eIF2 α fosforilado (p-eIF2 α) y de CHOP, en las líneas celulares U266 y MM.1S, a través de la técnica *Western blot*.

En la línea celular U266 (**Figura 13A**), con DBEq 2,5 μ M se observa un ligero aumento del nivel de p-eIF2 α respecto al control. Este resultado concuerda con estudios previos, que indican que DBEq induce estrés en el RE, activándose la vía UPR y, en consecuencia, fosforilándose eIF2 α ^[19,27]. Sin embargo, estos niveles de expresión no aumentan con la concentración de DBEq, por lo que es posible que ya se haya alcanzado el máximo nivel de fosforilación con la menor dosis de DBEq.

En cuanto a la expresión de p-eIF2 α en las células MM.1S (**Figura 13B**), en el caso de DBeQ 2,5 μ M también se observa un aumento, siendo mayor que en el caso de las células U266.

Respecto al tratamiento con solo CFZ, se observa que el nivel de expresión de p-eIF2 α parece aumentar ligeramente. Por último, en la combinación de CFZ (5 nM) +DBeQ (2,5 μ M), la inducción de la fosforilación de eIF2 α es mayor respecto al tratamiento individual de CFZ, alcanzándose los elevados niveles mostrados en el caso de DBeQ.

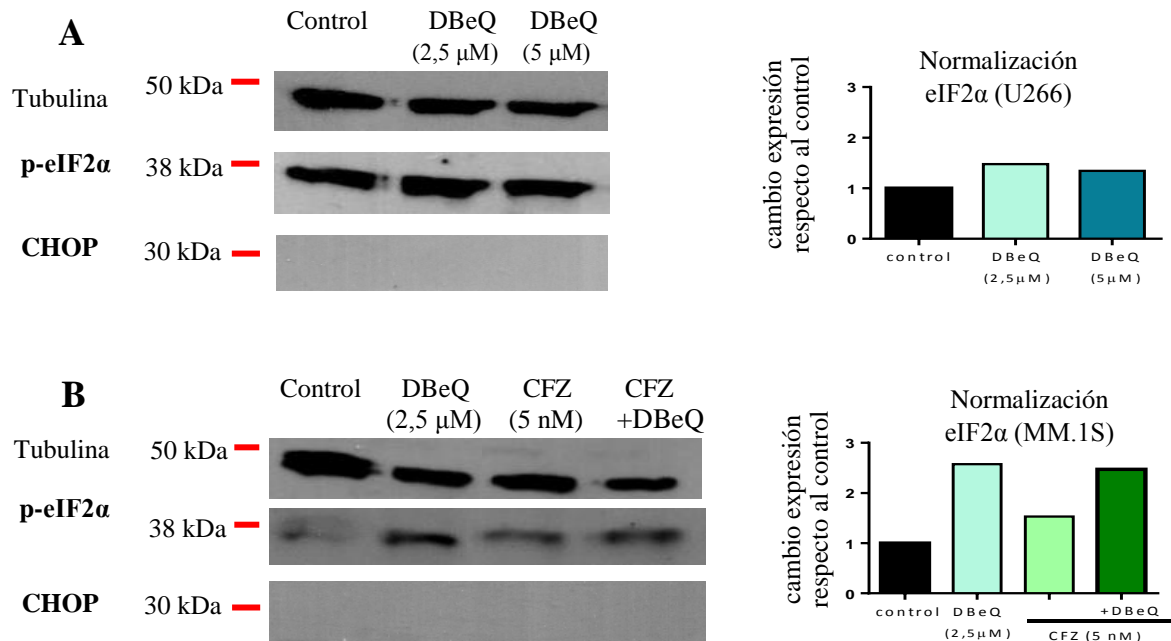


Figura 13. Expresión de eIF2 α fosforilada y CHOP, tras la incubación durante 24 horas con DBeQ y carfilzomib. (A) en la línea celular U266, (B) en la línea celular MM.1S Se siguió el protocolo explicado en el apartado 3.4 de Materiales y métodos. En ambos casos, como control de carga se utilizó un anticuerpo específico frente a tubulina, que nos permite diferenciar si hay sobreexpresión de las proteínas respecto al control, o si el aumento del grosor de la banda es debido a que se cargó más cantidad de proteína en ese pocillo. El peso molecular de las bandas obtenidas se comparó con el marcador de peso molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*), para poder determinar si el anticuerpo ha reconocido específicamente a la proteína de interés. Los valores se normalizaron respecto al ratio tubulina/p-eIF2 α obtenido en las muestras “control”, para ello se utilizó el software *ImageJ*.

En cuanto al análisis de la expresión de CHOP, en ninguna de las líneas celulares se observaron bandas en las condiciones estudiadas, tras 24 horas de incubación. Para comprobar si el anticuerpo realmente funciona, se podría utilizar un control positivo que induzca la expresión de CHOP, como la tunicamicina^[27]. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con otros estudios en los que la expresión de CHOP se inducía a tiempos cortos (4-6 horas) tras la administración del otro inhibidor del proteasoma bortezomib, mientras que a 24 horas los niveles eran prácticamente inapreciables (al igual que en el control).

Todos estos resultados sugieren que estos carfilzomib y DBeQ inducen estrés en el RE, cuantificado como el aumento de p-eIF2 α . Dicho estrés parece ser menor en la línea celular U266 que en las células MM.1S, lo cual correlaciona con la menor exposición de CRT observada en la primera de estas líneas celulares. Es posible que esta línea celular U266 sea más resistente al estrés en el retículo endoplasmático.

5. CONCLUSIONES

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

- I. DBeQ y carfilzomib, así como su combinación, inducen muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de mieloma múltiple RPMI 8226, U266 y MM.1S. El efecto citotóxico de estos fármacos aumenta con el tiempo y varía según la línea celular estudiada.
- II. La combinación de DBeQ con carfilzomib parece inducir un efecto sinérgico en las líneas celulares U266 y MM.1S, pero no en el caso de las células RPMI 8226. Este efecto sinérgico no se observa en la combinación de DBeQ con alisertib. Por ello, la sinergia parece ser específica de carfilzomib.
- III. Las caspasas intervienen en la muerte celular inducida por DBeQ y carfilzomib en las líneas celulares U266 y MM.1S.
- IV. En la línea celular U266 no se induce la exposición de calreticulina bajo ninguna de las condiciones estudiadas, mientras que dicha exposición con el tratamiento es variable y dependiente del estrés celular basal en la línea celular MM.1S.
- V. La exposición de calreticulina parece ocurrir de manera paralela a la muerte por apoptosis.
- VI. Los niveles de eIF2 α fosforilada aumentan con el tratamiento de DBeQ y carfilzomib, así como su combinación, en la línea celular MM.1S. En la línea celular U266 sólo se ha podido observar aumento en el caso de DBeQ.

CONCLUSIONS

The following conclusions may be drawn out from this work:

- I. DBeQ and carfilzomib, as well as their combination, trigger cell death by apoptosis in multiple myeloma RPMI 8226, U266 and MM.1S cell lines. This cytotoxic effect increases in a time dependent manner and varies with the cell line studied.
- II. The combination of DBeQ with carfilzomib elicits a synergic effect on U266 and MM.1S cell lines, but not in the case of RPMI 8226 cells. However, this synergic effect is not observed in the combination of DBeQ with alisertib. Therefore, synergy appears to be specific for carfilzomib.
- III. Caspases are involved in cell death induced by DBeQ and carfilzomib in U266 and MM.1S cell lines.
- IV. Calreticulin exposure is not induced under any experimental setting in U266 cell line, whereas in MM.1S cells the aforementioned exposure varies with treatment and it depends on the basal cell status.
- V. Calreticulin exposure appears to occur in a parallel way to apoptotic cell death.
- VI. Phosphorylated eIF2 α levels increase with DBeQ and carfilzomib treatment along with their combination in MM.1S cell line. However, in U266 cell line this increase was only observed with DBeQ treatment.

6. BIBLIOGRAFÍA

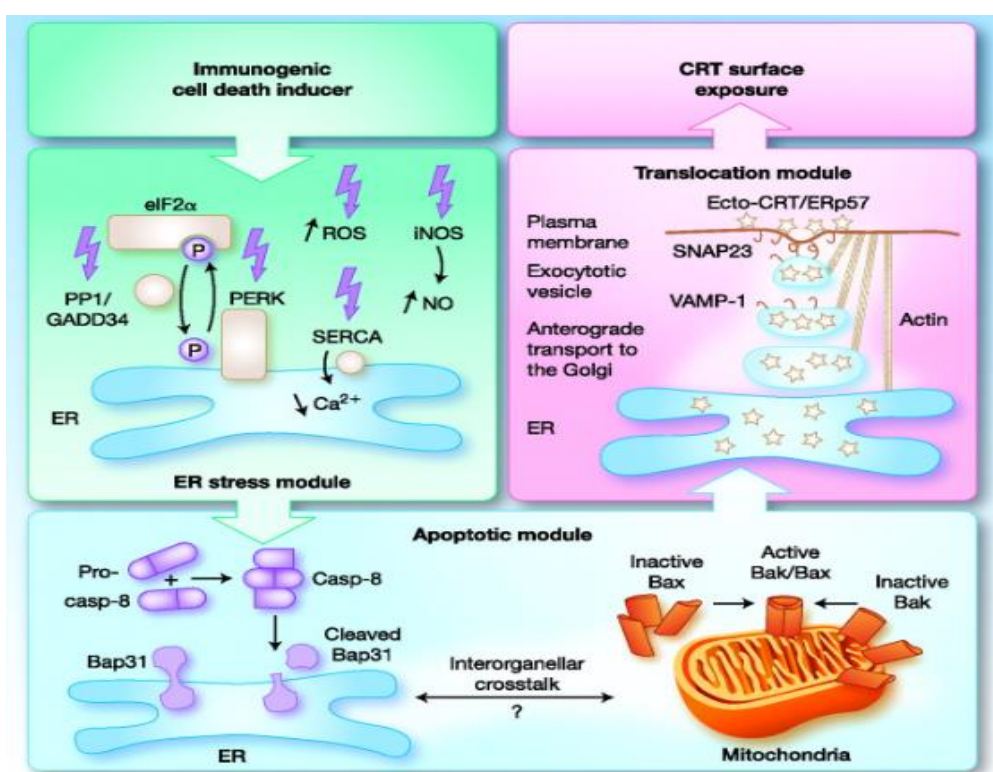
- [1]. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. *Multiple myeloma*. The Lancet. 2015; 385(9983):2197–208.
- [2]. Rajkumar SV. *Treatment of multiple myeloma*. Nat Rev Clin Oncol. 2011; 8(8):479–91.
- [3]. Avet-Loiseau H. *Ultra High-Risk Myeloma*, Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2010;489–493.
- [4]. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. *Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy*. Annual Review of Immunology. 2013;31(1):51–72.
- [5]. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death*. Oncoimmunology. 2014;3(9).
- [6]. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. J Exp Med. 2005;202(12):1691–701.
- [7]. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, et al. *Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy*. Cancer Metastasis Rev. 2011;30(1):61–9.
- [8]. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. *Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword*. Oncogene. 2016;35(46):5931–41.
- [9]. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. *Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy*. Nat Rev Cancer. 2012;12(12):860–75.
- [10]. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2010;1805(1):53–71.
- [11]. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med. 2007;13(1):54–61.
- [12]. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund A-C, et al. *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. EMBO J. 2009;28(5):578–90.
- [13]. M. Schroder, R.J. Kaufman, *The mammalian unfolded protein response*, Annu. Rev. Biochem. 2005;74:739–789.
- [14]. Verfaillie T, Garg AD, Agostinis P. *Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer*. Cancer Letters. 2013;332(2):249–64.
- [15]. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. *Immunogenic Tumor Cell Death for Optimal Anticancer Therapy: The Calreticulin Exposure Pathway*. Clin Cancer Res. 2010;16(12):3100–4.
- [16]. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, et al. *Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress*. Oncogene. 2011;30(10):1147–58.
- [17]. Kubiczikova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. *Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma*. J Cell Mol Med. 2014;18(6):947–61.
- [18]. Auner HW, Moody AM, Ward TH, Kraus M, et al. *Combined Inhibition of p97 and the Proteasome Causes Lethal Disruption of the Secretory Apparatus in Multiple Myeloma Cells*. PLoS One. 2013;8(9).
- [19]. Vekaria PH, Home T, Weir S, Schoenen FJ, Rao R. *Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer*. Front Oncol. 2016;6.

- [20]. Glickman MH, Ciechanover A. *The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction*. *Physiological Reviews*. 2002;82(2):373–428.
- [21]. Balsas Clavería, Patricia. *Mecanismo de la muerte inducida por el inhibidor del proteasoma bortezomib en células de mieloma. Efecto de su combinación con Apo2L/Trail y melfalán*. Tesis doctoral (2011). Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.
- [22]. Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, et al. *Nonproteasomal Targets of the Proteasome Inhibitors Bortezomib and Carfilzomib: a Link to Clinical Adverse Events*. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2734–43.
- [23]. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. *Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma*. *Blood*. 2007;110(9):3281–90.
- [24]. Auner HW, Cenci S. *Recent advances and future directions in targeting the secretory apparatus in multiple myeloma*. *Br J Haematol*. 2015;168(1):14–25.
- [25]. Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, Kane RC et al. *U.S. Food and Drug Administration Approval: Carfilzomib for the Treatment of Multiple Myeloma*. *Clin Cancer Res*. 2013;19(17):4559–63.
- [26]. White-Gilbertson S, Hua Y, Liu B. *The role of endoplasmic reticulum stress in maintaining and targeting multiple myeloma: a double-edged sword of adaptation and apoptosis*. *Front Genet*. 2013;4.
- [27]. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. *Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells*. *Blood*. 2006;107(12):4907–16.
- [28]. Jarauta V, Jaime P, Gonzalo O, Miguel D de, Ramírez-Labrada A, Martínez-Lostao L, et al. *Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo*. *Cancer Letters*. 2016;382(1):1–10.
- [29]. Jarauta Azcona, Vidal. *Interrelaciones entre apoptosis y autofagia. Aplicación al tratamiento de células de mieloma con el inhibidor del proteasoma carfilzomib*. Tesis doctoral (2015). Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.
- [30] Meyer H, Wehl CC. *The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis*. *J Cell Sci*. 2014;127(18):3877–83.
- [31]. Meyer H, Bug M, Bremer S. *Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system*. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):117–23.
- [32]. Chou T-F, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, et al. *Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):4834–9.
- [33]. Jaime Sánchez, Paula. *Inmunogenicidad de la muerte celular mediada por linfocitos T citotóxicos en inmunidad tumoral*. Tesis doctoral (2017). Universidad de Zaragoza.
- [34]. Balsas P, López-Royuela N, Galán-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J. *Cooperation between Apo2L/TRAIL and bortezomib in multiple myeloma apoptosis*. *Biochemical Pharmacology*. 2009 Mar 1;77(5):804–12.
- [35]. Keen N, Taylor S. *Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents*. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(12):927–36.
- [36]. Garg AD, Galluzzi L, Apetoh L, Baert T, Birge RB, Bravo-San Pedro JM, et al. *Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death*. *Front Immunol*. 2015;6.
- [37]. Fucikova J, Truxova I, Hensler M, Becht E, Kasikova L, Moserova I, et al. *Calreticulin exposure by malignant blasts correlates with robust anticancer immunity and improved clinical outcome in AML patients*. *Blood*. 2016;128(26):3113–24.

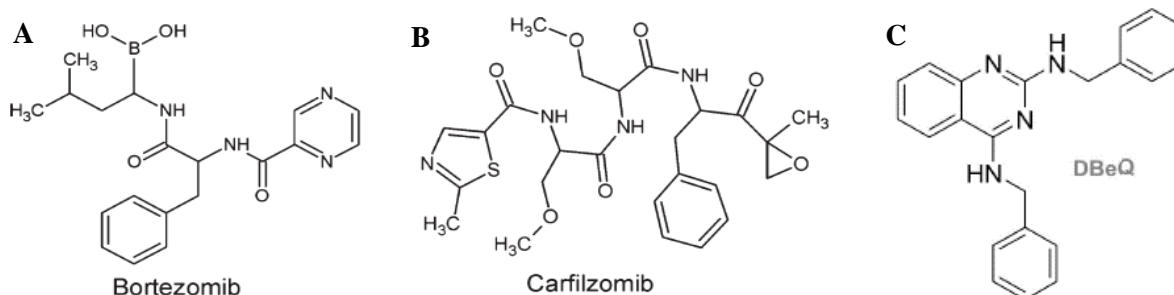
ANEXOS

Anexo 1. Exposición de calreticulina ^[15].

Tres módulos participan en la exposición de calreticulina (CRT), de manera jerárquica, en respuesta a los inductores de muerte celular inmunogénica. En el módulo de estrés en el RE están implicados: la fosforilación de eIF2 α debido a la activación de PERK (o la inhibición del complejo PP1/GADD34), la producción de ROS y la posible inhibición de la bomba SERCA. En el módulo apoptótico están implicadas: la escisión apical de la caspasa-8 y la activación de las proteínas Bax y Bak de la familia Bcl-2, las cuales podrían mediar una comunicación entre el RE y las mitocondrias. Sin embargo, no es del todo conocido en qué ubicación subcelular Bax y Bak influyen en la vía de exposición CRT. En el módulo de translocación de CRT desde el RE al aparato de Golgi están implicados diversos reordenamientos del citoesqueleto de actina. Finalmente, VAMP1 (vesícula asociada al complejo SNARE) media la fusión con la membrana plasmática, permitiendo que la CRT llegue a la superficie de la célula.



Anexo 2. Estructura molecular de los inhibidores del proteasoma bortezomib (A) y carfilzomib (B), y del inductor de estrés en el retículo endoplasmático, DBeQ (C).



Anexo 3. Composición de los tampones empleados en el análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

Extracción y fraccionamiento de lisados celulares	
Tampón de lisis 1X	Tritón-X-100 al 1% (v/v) Tris/HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM leupeptina 10 µg/ml glicerol 10% (v/v).
Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) (SDS/PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa	
Tampón de carga concentrado 3X	Tris/HCl 150 mM pH 7,4, molibdato de sodio 0,3 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, fluoruro de sodio 30 mM glicerol 30% (v/v), 2-β-mercaptoetanol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,06 % (p/v), SDS 3%
Tampón de transferencia	Tris (hidroximetil)aminometano 25mM, glicina 192mM, SDS al 0,1 %, pH 8,3 y metanol al 20 % (v/v)
Análisis de proteínas por Western blot:	
Tampón B	Tris/HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 0,12 M, Tween-20 al 0,1% (p/v) y tómerosal en PBS pH 7,4

Anexo 4. Composición química del gel concentrador y gel separador de los geles de poli(acrilamida) al 12 % con SDS (SDS/PAGE)

	Gel concentrador (<i>stacking</i>)	Gel separador (<i>resolving</i>)
Acrilamida/bisacrilamida	2 %	12 %
Tris-HCl	125 mM, pH 6,8	370 mM pH 8,8
Persulfato de amonio	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,01 %	0,01 %
SDS	0,1 %	0,1 %

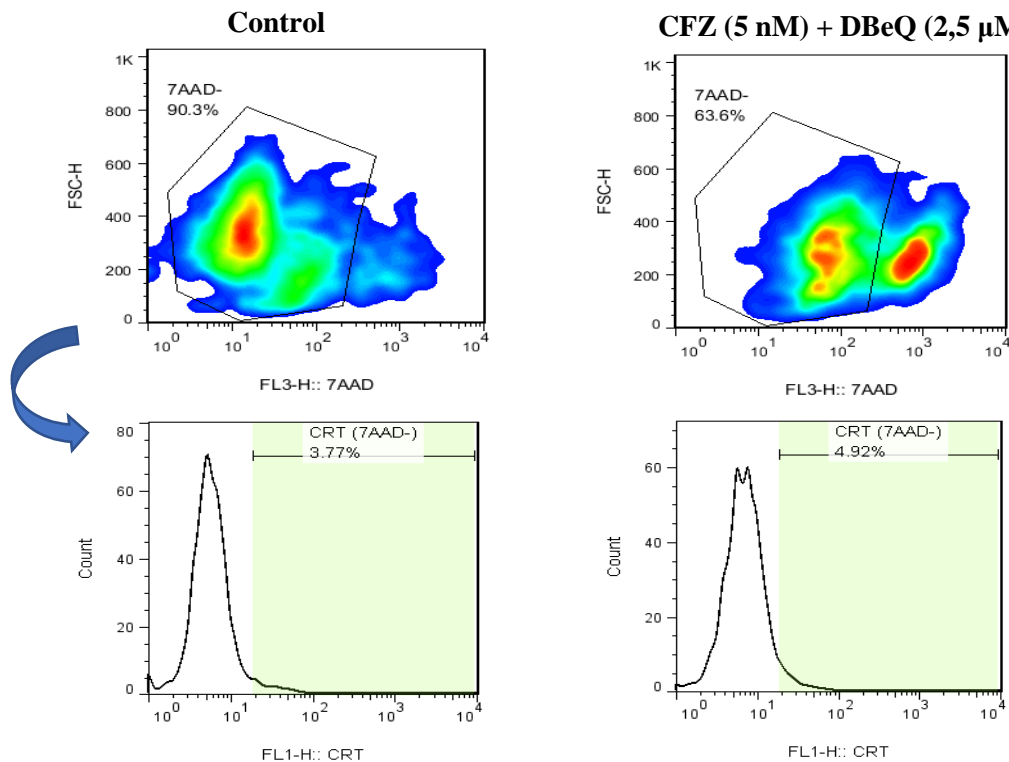
En este sistema discontinuo, la muestra pasa primero por el gel concentrador (*stacking*) que provoca el apilamiento de las proteínas, concentrándolas electroforéticamente en una banda delgada antes de pasar al gel separador (*resolving*), incrementando con esto la resolución de la electroforesis. Por tanto, si se suprimiera el gel concentrador podría haber problemas de menor resolución (bandas más difusas) y posibles falseados, pues podría haber diferencias de distancia en las condiciones de salida del pocillo.

Anexo 5. Tabla resumen de los anticuerpos empleados en el Western blot. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en tampón B, con 2,5% de leche desnatada en polvo, para incubarse a la concentración recomendada por el proveedor.

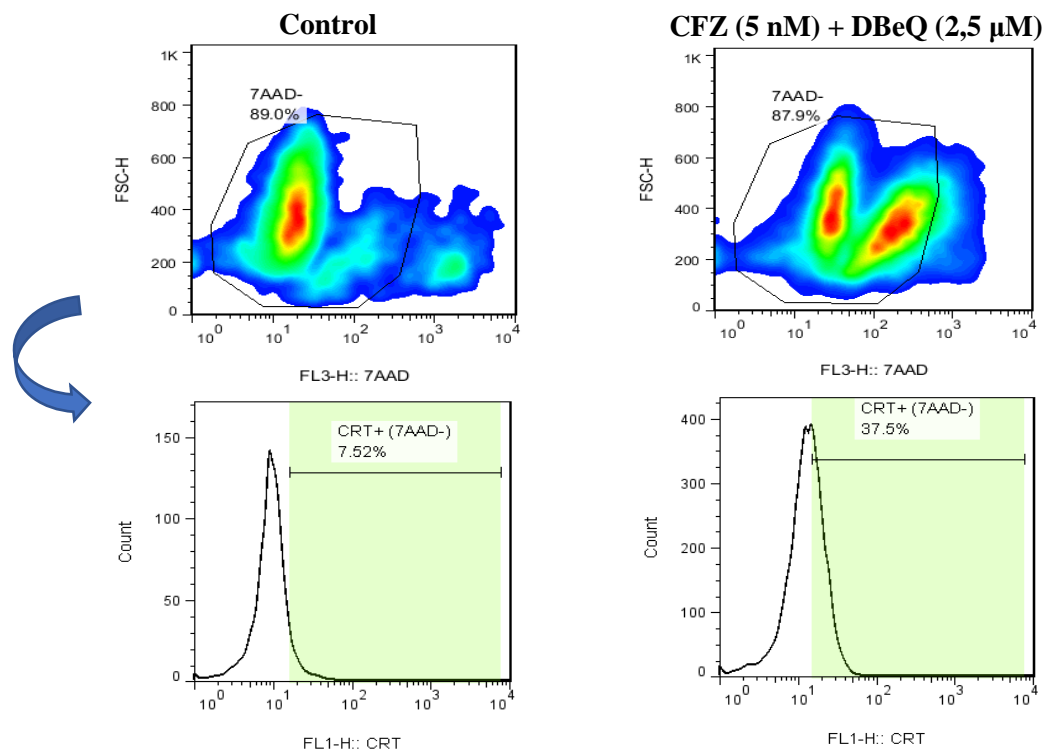
Anticuerpo primario	Proveedor	Especie	Tipo	Anticuerpo secundario
eIF2α fosforilada	<i>ThermoFisher</i>	Conejo	Monoclonal	IgG anti-conejo HRP
CHOP	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Ratón	Monoclonal	IgG anti-ratón PA

Anexo 6. Estudio de la exposición de calreticulina en el tiempo.

(A) Línea celular U266. Arriba se representa el dot-plot (FSC frente 7-AAD) obtenido a 24 h de incubación.

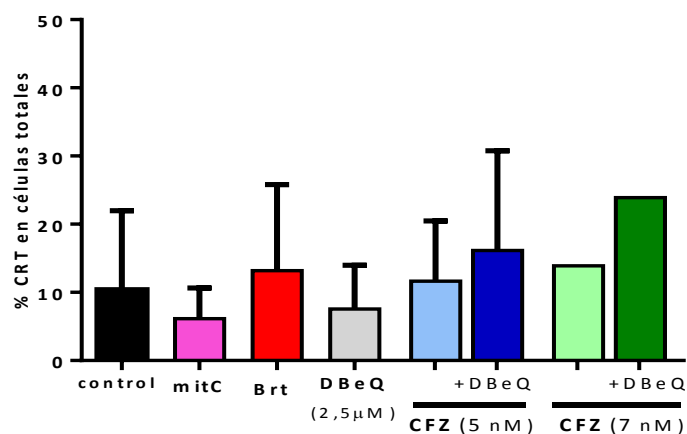


(B) Línea celular MM.1S. Arriba se representa el dot-plot (FSC frente 7-AAD) a 24 h de incubación.

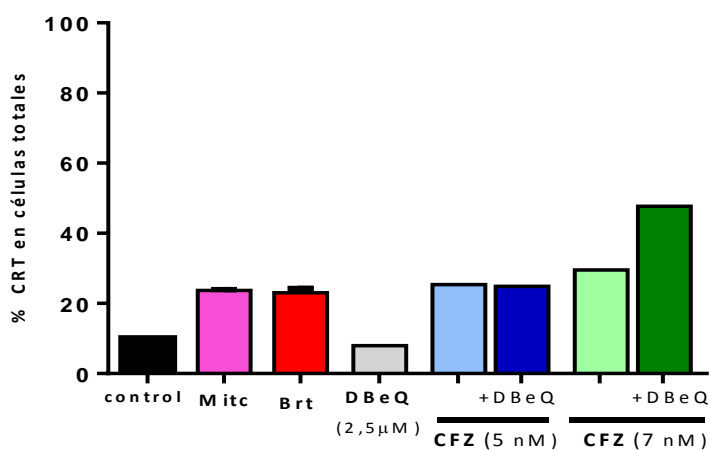


Se observa que en función del marcaje con 7-ADD se distinguen 3 poblaciones: la de mayor marcaje positivo para 7-AAD son las que tienen la membrana plasmática rota, la población intermedia son las células apoptóticas que todavía presentan la membrana plasmática intacta y aquellas 7-AAD negativas presentarán la membrana intacta (viables). En cada caso, **se seleccionó la población de células 7-AAD negativas como aquellas que presentaban marcaje intermedio, y se representó el histograma.** El punto de corte por encima del cual el marcaje es específico y por tanto positivo para ecto-CRT se determinó con el control de isotipo (<1% CRT).

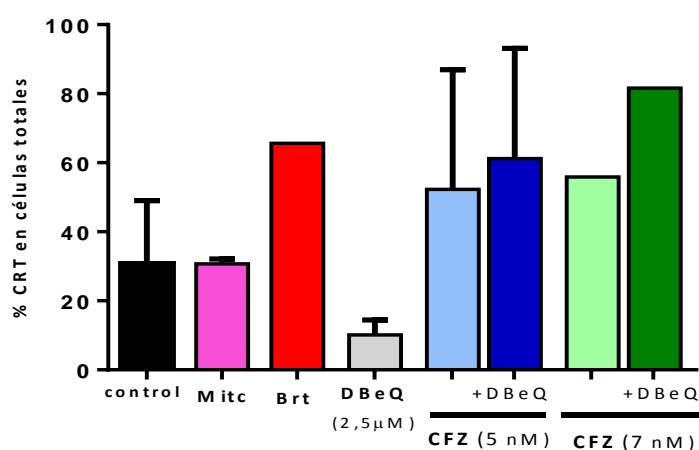
Anexo 7. Análisis de la exposición de ecto-CRT en células totales.



A. Exposición de ecto-CRT en células totales, línea celular U266



B. Exposición de ecto-CRT en células totales, línea celular MM.1S (nivel de estrés basal bajo)



C. Exposición de ecto-CRT en células totales, línea celular MM.1S (nivel de estrés basal alto)