



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por Dinaciclib en células de mieloma múltiple

Mechanism of dinaciclib-induced cell death in multiple myeloma cells

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora

Alba García Murillo

Directores

Isabel Marzo Rubio

José Javier Naval Iraberri

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza

Año 2018



Universidad
Zaragoza

D. Isabel Marzo Rubio, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. José Javier Naval Iraberri, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado “Estudio del mecanismo de muerte celular inducida por Dinaciclib en células de mieloma múltiple” ha sido realizado por Alba García Murillo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones requeridas para ser presentado como Trabajo Fin de Grado (TFG), ya que cumple los objetivos recogidos en las directrices del TFG en el grado en Biotecnología.

Zaragoza, Junio 2018

Fdo: Isabel Marzo Rubio

Fdo: José Javier Naval Iraberri

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Isabel Marzo y Javier Naval la oportunidad de realizar este trabajo, bajo su tutela, en el grupo de investigación “Inmunidad, cáncer y células madre”. Gracias por el apoyo y los conocimientos aportados así como por el buen trato recibido.

También he de agradecer a Nelia Jiménez, por la ayuda prestada, y al resto de miembros del laboratorio por el compañerismo demostrado y la creación de un ambiente de trabajo inmejorable.

ÍNDICE

0. RESUMEN/ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Mieloma múltiple	3
1.2 Tratamiento	3
1.3 Dinaciclib	4
1.4 Apoptosis o muerte celular programada.....	5
1.5 Proteínas de la familia Bcl-2	5
1.6 BH3 miméticos.....	7
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1 Cultivos celulares	8
3.2 Determinación de la proliferación celular: ensayo de reducción del MTT	8
3.3 Citometría de flujo	9
3.3.1 Determinación de la translocación de fosfatidilserina.....	9
3.3.2 Análisis del ciclo celular	9
3.3.3 Análisis de datos.....	10
3.4 Análisis de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 mediante Western Blotting ...	10
3.4.1 Extracción de proteínas y fraccionamiento de lisados celulares totales.....	10
3.4.2 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF.....	10
3.4.3 Análisis de proteínas por Western Blotting.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1 La combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 inhibe la proliferación en las líneas de mieloma múltiple humano	11
4.2 La combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 provoca muerte celular por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple humano	13
4.3 Efecto del dinaciclib sobre el ciclo celular.....	16
4.4 Análisis de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en presencia de dinaciclib	18
4.5 Discusión general	21
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	22
6. BIBLIOGRAFÍA.....	23

ANEXOS

0. RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer hematológico que se caracteriza por la proliferación maligna de las células B plasmáticas que se expanden y acumulan en la médula ósea. A pesar de los avances realizados en el último par de décadas en el tratamiento de esta enfermedad, el MM sigue siendo incurable.

El estudio de la biología de las células plasmáticas tumorales ha puesto de manifiesto que la desregulación del ciclo celular permite el desarrollo del cáncer. Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) regulan el progreso a través de las etapas del ciclo por lo que se han desarrollado fármacos, como el dinaciclib, que inhiben las CDKs e inducen la apoptosis.

En este trabajo fin de grado, se ha analizado el efecto citotóxico mediante el cual el dinaciclib, solo o en combinación con inhibidores de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (claves en la regulación de la supervivencia), induce muerte celular en varias líneas de MM humano. Además, se ha estudiado el efecto del dinaciclib sobre dichas células para determinar en qué fase del ciclo se produce el arresto celular previo a la muerte celular. Por último, se ha examinado como influye el dinaciclib en la expresión de varias proteínas de la familia Bcl-2.

Los resultados obtenidos indican que el arresto celular se produce en la fase S o G₂/M, según la línea celular, y sugieren que el mecanismo mediante el cual el dinaciclib induce apoptosis consiste en reducir la expresión de Mcl-1 para que proteínas proapoptóticas, como Bim y Puma, inicien la muerte celular programada. Por otro lado, la combinación de dinaciclib con inhibidores de Mcl-1 y Bcl-X_L muestra que podría ser una futura terapia puesto que, aunque los resultados difieren según la línea celular, presenta efecto sinérgico en las líneas MM1S, U266 y RPMI8226.

0. ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a hematological neoplasm characterized by malignant proliferation of B-cell that expand and accumulate in the bone marrow. In the last two decades, a lot of advances have been achieved in the MM treatment. However, this disease remains incurable.

New information on the biology of MM plasma cells has bring to light that cell cycle deregulation promotes cancer development. Since cyclin-dependent kinases (CDKs) regulate cell cycle progress, novel inhibitors of CDKs, like dinaciclib, have been created in order to induce apoptosis.

In the present Degree thesis, the cytotoxic effect by which dinaciclib, alone as well as combined with inhibitors of the Bcl-2 family of proteins (which have a key role in survival regulation), induces cell death has been analyzed in some human MM cell lines. Moreover, the blocking effect of dinaciclib in the progress of the cell cycle has also been explored in order to determine the phase where the arrest is produced. Finally, the influence of the drug in the expression of some Bcl-2 family proteins has been evaluated.

The results suggest that cell cycle arrest happens in S-phase or G₂/M phase depending on the cell line and point out that the mechanism by which dinaciclib induces cell death consist on cutting down Mcl-1 expression in order to allow pro-apoptotic proteins, such Bim and Puma,

initiate apoptosis. Furthermore, the combination of dinaciclib and the inhibitors of Bcl-X_L and Mcl-1 could be a possible future therapy since, although the results differ depending on the cell line, it presents synergy in the MM1S, U266 and RPMI8226 cell lines.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mieloma múltiple

El mieloma múltiple es el segundo cáncer hematológico más frecuente y se caracteriza por la proliferación maligna, en la médula ósea, de células B plasmáticas que secretan una proteína monoclonal detectable en el suero o en la orina. Entre los síntomas más comunes se encuentran la reabsorción ósea, anemia, hipercalcemia y disfunción renal [1].

En Europa, el mieloma múltiple tiene una incidencia de 6/100000 por año, siendo más común en la raza negra que en la blanca y más frecuente en hombres que en mujeres. La edad media de diagnóstico ronda los 70 años y, aunque en las últimas dos décadas se ha conseguido aumentar la supervivencia media de 3 a 6 años tras el diagnóstico, sigue siendo una enfermedad incurable [1].

Las anomalías genéticas son muy complejas y variadas lo que ocasiona que se trate de una neoplasia muy heterogénea. Son muy comunes la ganancia completa de cromosomas (trisomías) así como las reordenaciones estructurales (delecciones, duplicaciones, translocaciones) o la pérdida completa de cromosomas. Los pacientes con hiperdiploidía son los que mayor supervivencia presentan [2].

1.2 Tratamiento

En las últimas dos décadas, se han producido extraordinarios avances en el tratamiento del mieloma múltiple y se ha conseguido aumentar la curva de supervivencia con respecto a los tratamientos clásicos [3]. Desde la década de los 50 hasta finales de la década de los 90, el tratamiento del mieloma múltiple se basaba en el uso de agentes alquilantes (melfalán, ciclofosfamida), antraciclinas (doxorrubicina), corticosteroides (prednisona, dexametasona) y el trasplante autólogo de células madre [4]. Dicho trasplante no es aplicable a todos los pacientes, de manera que para elegir a los enfermos que se van a tratar con este tipo de terapia se deben tener en cuenta unos criterios tales como la edad (preferiblemente menor de 65 años), la ausencia sustancial de disfunciones del corazón, riñón, pulmones o hígado u otras comorbilidades no controladas como la diabetes [1].

Las mejoras observadas en el tratamiento del mieloma se deben a la información obtenida mediante el estudio de la biología de las células plasmáticas tumorales, así como al mayor conocimiento sobre las rutas metabólicas que las células neoplásicas utilizan para promover su crecimiento. Esto ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción como pueden ser los inhibidores del proteasoma (bortezomib, carfilzomib) o los agentes inmunomoduladores (talidomida, lenalidomida, pomalidomida) [3].

Las células plasmáticas tumorales producen una gran cantidad de inmunoglobulinas (proteína monoclonal o proteína M) y, para el correcto funcionamiento de las células, debe mantenerse la homeostasis del citoplasma. Esto se consigue mediante la ubiquitinación de proteínas y su posterior degradación en el proteasoma. Por tanto, el proteasoma regula la

expresión de proteínas citoplasmáticas y su inhibición provoca el impedimento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas y la acumulación de proteínas desplegadas y ubiquitinadas, entre las cuales se encuentran proteínas pro-apoptóticas. De esta manera se induce la muerte celular [2, 5].

En cuanto a los inmunomoduladores, estos tienen actividad anti-angiogénica y pro-apoptótica siendo su diana molecular la proteína cereblon. Dicha proteína forma parte de un complejo ubiquitin ligasa que regula la expresión de los factores de transcripción Ikaros los cuales son esenciales para el desarrollo del mieloma múltiple [3].

Las nuevas terapias desarrolladas también utilizan anticuerpos monoclonales (Elotuzumab, Daratumumab, Indatuximab), cuya ventaja es el bajo nivel de toxicidad, y fármacos que interfieren en las rutas de desarrollo de la neoplasia. En este último grupo encontramos los inhibidores de la proteína AKT (importante en la proliferación celular y la apoptosis), los inhibidores de la histona deacetilasa (altera la expresión de oncogenes y supresores de tumores), los inhibidores de proteínas de la familia Bcl-2 (proteínas clave en la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca) o inhibidores de CDK entre otros [3, 5].

1.3 Dinaciclib

La progresión a través de las etapas del ciclo celular está regulada por la acción de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) (Figura 1). Las CDK son serin-treonin quinasas que se unen a ciclinas y forman un complejo activo en el que la subunidad reguladora es la ciclina y la subunidad catalítica es la CDK [6]. Este complejo participa en la regulación de la transcripción, la maduración del mRNA y la diferenciación celular [4].

En el mieloma múltiple, las ciclinas D1, D2 y D3 están reguladas positivamente [4], por ello, se han desarrollado inhibidores de las CDK como posibles fármacos para el tratamiento de esta patología. Dinaciclib (SCH727965) es un fármaco potente y de bajo peso molecular que inhibe selectivamente CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9 y se ha descrito que detiene el ciclo en la fase G₀/G₁ [4]. En mieloma, el dinaciclib tiene actividad actuando como agente único pero, además, se ha visto que al inhibir CDK5 potencia la actividad de inhibidores de proteasoma por lo que se podría desarrollar terapias conjuntas de ambos fármacos [7]. Por otra parte, estudios recientes indican que el dinaciclib puede inducir muerte inmunogénica [8].

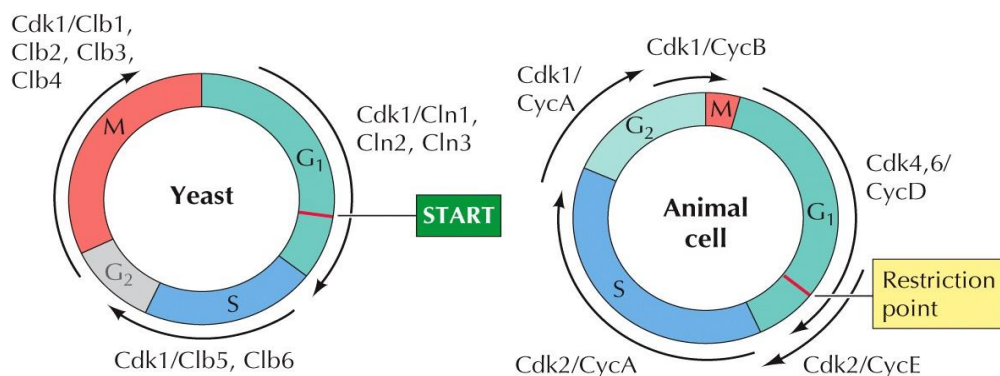


Figura 1. Fases del ciclo celular, ciclinas y CDKs. Imagen tomada de Cooper, G.M. and R.E. Hausman (2016) [9]

1.4 Apoptosis o muerte celular programada

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso biológico mediante el cual las células dañadas que no funcionan bien o que ya no son necesarias se “suicidan” permitiendo, así, la supervivencia y correcto funcionamiento del organismo. La muerte celular supone un conjunto de cambios morfológicos en las células como pueden ser la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA o la formación de burbujas (“blebbings”) en la membrana plasmática. La apoptosis puede ejecutarse mediante dos vías diferentes, la extrínseca y la intrínseca (**Figura 2**) [10].

La vía extrínseca está mediada por los receptores mortales de la familia del receptor del TNF. Cuando los ligandos se unen a sus receptores mortales se activan las caspasas iniciadoras 8 y 10 las cuales activarán a caspasas ejecutoras, como la 3, que llevarán a cabo el desmantelamiento celular [10].

En la vía intrínseca, las proteínas de la familia Bcl-2 tienen un papel fundamental en el control de la permeabilización mitocondrial, que es el evento clave en esta ruta. Esta vía comienza con diferentes tipos de daño celular que provocan la salida de la mitocondria del citocromo c el cual activa el apoptosoma. A continuación, el apoptosoma activa la caspasa iniciadora 9 que conduce a la activación de la caspasa ejecutora 3. Además del citocromo c, también salen de la mitocondria otras proteínas pro-apoptóticas como pueden ser Smac/Diablo o AIF [10].

1.5 Proteínas de la familia Bcl-2

Se han identificado 18 miembros de la familia Bcl-2. Estas proteínas tienen de uno a cuatro dominios de homología Bcl-2 denominados BH1, BH2, BH3 y BH4. En base al número de dominios que tienen y a su capacidad de inhibir o inducir la apoptosis se clasifican en:

- Proteínas antiapoptóticas multidominio: consta de seis miembros (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-W y A1/Bfl1) y tienen los cuatro dominios BH (BH1-BH4). Tienen un dominio transmembrana C-terminal y los dominios BH1-BH3 forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con proteínas solo-BH3 [11].
- Proteínas proapoptóticas multidominio: consta de tres miembros (Bax, Bak y Bok) y tienen los dominios BH1-BH3. Bak y Bax forman un poro en la mitocondria que permite la salida del citocromo c [12].
- Proteínas proapoptóticas solo-BH3: consta de nueve miembros (Bim, Bmf, Puma, Noxa, Bad, Bid, Bcl-X_S, BiNP3 y Hrk) y solo tienen el dominio BH3. Actúan como sensores de daño celular y median la activación de Bax y Bak [12]. Las proteínas solo-BH3 se dividen en activadoras (se unen a proteínas antiapoptóticas y a proapoptóticas multidominio) y sensibilizadoras (solo se unen a proteínas antiapoptóticas) [13].

Alteraciones en el balance de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas se asocian con diversas patologías entre las que se encuentran las enfermedades autoinmunes y el cáncer [14]. Las células tumorales sufren una serie de alteraciones que les confieren resistencia frente al mecanismo de muerte celular programada. Mientras que los genes proapoptóticos sufren una disminución en su expresión, los genes antiapoptóticos se regulan positivamente. El mecanismo más común y eficaz mediante el cual las células tumorales evaden la apoptosis es la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, y es por ello que se han desarrollado varias

estrategias farmacológicas dirigidas contra estas proteínas con el objetivo de potenciar el efecto de los fármacos ya existentes [10].

Las proteínas proapoptóticas Bax y Bak se consideran las proteínas efectoras de la familia ya que, en respuesta a señales de muerte celular, se activan y forman un poro en la mitocondria permitiendo la salida del citocromo c desde el espacio intermembrana hasta el citosol. Una vez en el citosol, el citocromo c interacciona con Apaf-1 que heptameriza formando el apoptosoma. El apoptosoma se unirá y activará la caspasa 9 que iniciará una serie de reacciones proteolíticas que se conocen con el nombre de “cascada de las caspasas” y que llevarán a cabo la desmantelación celular [11].

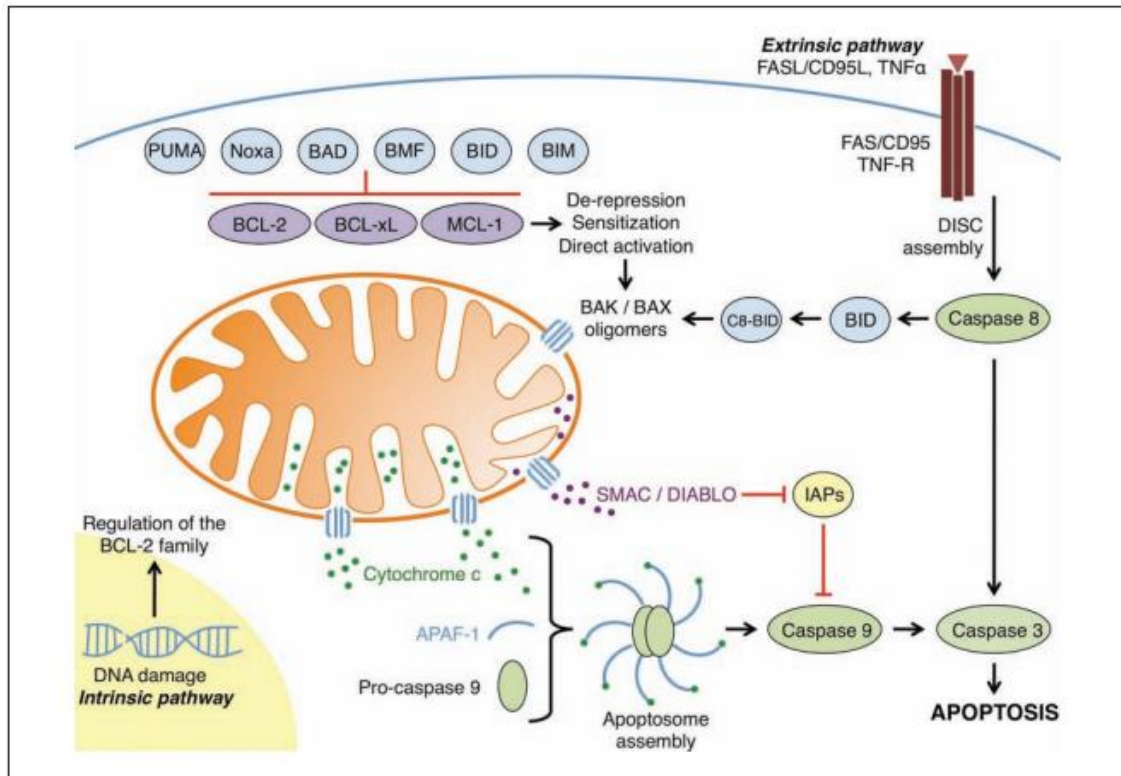


Figura 2. Esquema de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Imagen tomada de Elkholi, R., K.V. Floros, and J.E. Chipuk (2011) [15]

La activación de Bax y Bak depende de las interacciones que se establecen entre las distintas proteínas de la familia Bcl-2. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo se desencadena la apoptosis:

- Modelo directo: Las proteínas solo-BH3 sensibilizadoras desplazan, y dejan libres de su interacción con las antiapoptóticas, a las solo-BH3 activadoras que activan a Bax y Bak [13].
- Modelo indirecto o de desplazamiento: las proteínas solo-BH3 desplazan a Bax y Bak (constitutivamente activas) de su interacción con las proteínas antiapoptóticas, de esta manera Bax y Bak quedan libres y activas en el citosol [13].
- Modelo de inserción en membrana: las proteínas solo-BH3 sensibilizadoras se unen a las antiapoptóticas dejando libres a Bax/Bak y a las solo-BH3 activadoras. Las proteínas solo-BH3 activadoras liberadas activan Bax/Bak y promueven su inserción en la membrana mitocondrial [13].

1.6 BH3 miméticos

Los BH3 miméticos son un nuevo conjunto de agentes antitumorales cuya diana son las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 [16]. Mientras que algunos BH3 miméticos se identificaron mediante screening de bibliotecas de productos naturales, otros se han diseñado computacionalmente [12].

Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 tienen, en su superficie, una cavidad hidrofóbica a la cual se unen los BH3 miméticos. Esta unión conlleva la inhibición de las proteínas antiapoptóticas [16]. Combinar BH3 miméticos con quimioterapia podría incrementar el efecto de los fármacos de manera que se aumentaría la apoptosis y se disminuiría la resistencia a los fármacos que presentan las células tumorales [12].

La sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L y Mcl-1 es una de las estrategias que utilizan muchos tipos de cáncer, incluido el mieloma múltiple, para evadir la apoptosis. Por ello, se han diseñado varios compuestos miméticos de BH3 que inhiben estas proteínas. El inhibidor ABT-737, diseñado computacionalmente, se une a Bcl-X_L pero no a Mcl-1. A partir de este compuesto, se desarrolló el fármaco ABT-199 que solo inhibe a Bcl-2 con la idea de evitar la trombocitopenia que se produce al inhibir a Bcl-X_L, ya que las plaquetas dependen de dicha proteína. Esto ha determinado que ABT-199 sea el primer BH3 mimético aprobado por el FDA para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica [16, 17].

No obstante, la dosis de los inhibidores de Bcl-X_L está limitada por los problemas de trombocitopenia que causa y los inhibidores de Mcl-1 no han presentado mucha eficacia. Por tanto, aunque las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L y Mcl-1 son buenas dianas, se deben desarrollar inhibidores más potentes y eficaces [17].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

A pesar de los avances producidos en las últimas décadas, el mieloma múltiple sigue siendo una enfermedad incurable y se necesitan nuevos fármacos que ayuden a combatirla. Estudios recientes con el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, dinaciclib, han tenido resultados prometedores.

Trabajos anteriores realizados en nuestro departamento han determinado que el dinaciclib produce un arresto del ciclo celular en la fase G₀/G₁ e induce apoptosis en las líneas celulares MM1S, U266 y RPMI8226 [18, 19].

Partiendo de esta base, se pretende analizar el mecanismo de muerte celular inducido por el inhibidor de CDKs dinaciclib en células de mieloma múltiple humanas. Los objetivos planteados son los siguientes:

1. Evaluar la citotoxicidad del fármaco dinaciclib en las líneas de mieloma múltiple humano MM1S, RPMI8226 y U266.
2. Estudiar la posible sinergia del dinaciclib con compuestos miméticos de BH3.
3. Estudiar el papel de las proteínas de la familia Bcl-2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

Para la realización de este trabajo se han empleado las siguientes líneas celulares:

- MM1S: línea de mieloma múltiple humano cuyas células crecen en suspensión aunque también se adhieren ligeramente a la superficie del frasco de cultivo. Se aisló de la sangre periférica de una mujer de raza negra de 42 años [20].
- U266: línea de mieloma múltiple humano cuyas células crecen en suspensión. Se aisló de la sangre periférica de un hombre de 53 años [21].
- RPMI8226: línea de mieloma múltiple humano cuyas células crecen en suspensión. Se aisló de la sangre periférica de un hombre de 61 años [22].

Para cultivar las células se utilizó medio RPMI-1640 (Gibco) con GlutaMax suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL, Sigma). La manipulación de los cultivos se realizó en campana de flujo laminar vertical (Telstar) y todos los materiales de plástico utilizados fueron estériles. Las células se mantuvieron en un incubador termostático (Heraeus Cell) a 37°C en un aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂. Cada 2-3 días se realizaron subcultivos de las tres líneas.

La viabilidad celular así como la densidad fueron determinadas para realizar tanto los subcultivos como los experimentos (para iniciar un experimento la viabilidad debía ser, por lo general, del 90%). El método utilizado para la determinación de estos parámetros fue la tinción con Azul Trypan (Sigma) al 0,4% diluido en NaCl 0,15M. Dicho colorante solo penetra en las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática, por lo que las células muertas adquirirán una coloración azul mientras que las células vivas y las apoptóticas, al mantener su membrana intacta, no se teñirán.

Para realizar el conteo se mezclaron 50 µL de colorante Azul Trypan y 50 µL de la suspensión celular. La mezcla se depositó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio (Optiphot, Nikon). Las fórmulas de la viabilidad y la densidad son las siguientes:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \times 100$$

$$\text{Densidad} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

Siendo 2 el valor del factor de dilución (la mezcla de Azul Trypan y suspensión celular se hizo en proporción 1:1) y 10⁴ el ajuste por el volumen de la cámara de Neubauer.

3.2 Determinación de la proliferación celular: ensayo de reducción del MTT

Se utilizó el método de Mosmann modificado [23] para determinar la proliferación celular tras el tratamiento con dinaciclib, solo o en combinación con inhibidores de Bcl-X_L (A-1155463) y Mcl-1 (A-1210477 y S-63845), *ver la estructura química de los fármacos en el Anexo I*. Dicho método se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) llevada a cabo por deshidrogenasas mitocondriales y del retículo endoplasmático. Solamente las enzimas de las células viables pueden transformar las sales de tetrazolio (solubles y de color amarillo) en cristales de formazán (insolubles y de color

púrpura), de manera que la cantidad de cristales formados será proporcional a la cantidad de células vivas. Este ensayo nos permite, por tanto, analizar la supervivencia y proliferación celular de un cultivo tras el tratamiento con los fármacos anteriormente comentados.

Se sembraron 3×10^4 cél/pocillo en un volumen de 50 μ L, en placas de 96 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadió, al pocillo correspondiente, 50 μ L de medio completo (puntos control), de la dilución de dinaciclib o de la dilución de dinaciclib en combinación con el mimético de BH3 (inhibidor de Bcl-X_L o de Mcl-1). Además, se establecieron pocillos con 100 μ L de medio completo (sin células) como blanco. Se dispusieron cinco pocillos por punto experimental. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se añadió 10 μ L por pocillo de una disolución de MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubó durante 2 horas a 37°C. A continuación, se centrifugaron las placas 20 minutos a 2500 rpm, se eliminaron 50 μ L de sobrenadante y se disolvieron los cristales de formazán añadiendo a cada pocillo 100 μ L de isopropanol en HCl 0,05M y agitando la placa en un agitador de placas (Bioblock). Por último, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA MR5000 (Dynatech). Se utilizaron los programas Excel y GraphPad Prism 5 para analizar los resultados.

3.3 Citometría de flujo

3.3.1 Determinación de la translocación de fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra localizado en la cara citosólica de la membrana plasmática y que, en los primeros estadios de la apoptosis, se transloca a la cara externa de la membrana desencadenando señales que conducen a la fagocitosis de las células por los macrófagos. La anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina. Si, además, marcamos la anexina con un fluoróforo (en nuestro caso alofocianina o APC) podemos determinar mediante citometría de flujo el porcentaje de células muertas.

Este experimento se realizó en placas de 24 pocillos sembrando 500 μ L por pocillo de una suspensión celular que tenía una densidad de 3×10^5 cél/mL (líneas U266 y MM1S) o de 2×10^5 cél/mL (línea RPMI8226). A continuación, se añadió al pocillo correspondiente o bien la dilución que contenía solamente dinaciclib o bien la dilución que contenía dinaciclib en combinación con los miméticos de BH3. Tras incubar las placas durante 24 horas a 37°C, se pasó el contenido de los pocillos a tubos de citómetro y se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μ L de la mezcla de marcaje formada por anexina V-APC y tampón ABB (Annexin Binding Buffer; HEPES/NaOH 10 nM pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM). Los tubos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez pasado el tiempo de incubación, se diluyó el contenido de cada tubo en 200 μ L de ABB y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

3.3.2 Análisis del ciclo celular

Se sembraron, en una placa de 6 pocillos, $1,2 \times 10^6$ células por punto experimental y se trataron con dinaciclib. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se realizaron dos lavados con PBS y se fijaron las células añadiendo, gota a gota y en agitación suave en un vortéx, etanol frío al 70%. Las muestras se guardaron 24 horas a -20°C hasta el momento de realizar el marcaje. Para ello, las células fijadas, se centrifugaron a 4°C y 3000 rpm durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 μ L de la solución yoduro de propidio (PI)/RNasaA (0,5 μ g/mL RNasaA, 20 μ g/mL PI en PBS). Tras incubar, en oscuridad y a temperatura ambiente, durante 20 minutos se procedió al análisis por citometría de flujo.

3.3.3 Análisis de datos

Para los experimentos de citometría de flujo se utilizó el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos obtenidos se analizaron mediante los programas CellQuest Pro y FlowJo 7.6.1.

3.4 Análisis de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 mediante Western Blotting

3.4.1 Extracción de proteínas y fraccionamiento de lisados celulares totales

Se sembraron, en placas de 6 pocillos, 3×10^6 células por punto, se añadió la dilución correspondiente de dinaciclib y se dejaron incubar los tiempos establecidos (4h, 8h y 16h) a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se realizó un conteo para conocer la viabilidad y el número de células totales por punto, se lavaron con PBS y se resuspendieron en el volumen adecuado de tampón lisis (20 μ L de tampón lisis por cada millón de células). El tampón lisis contenía: Tritón-X-100 al 1%; NaCl 150 mM; Tris/HCl 50 mM pH 7,6; glicerol al 10% v/v; EDTA 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; pirofosfato sódico 10 mM; leupeptina 10 μ g/mL; fluoruro de sodio 10 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM.

Una vez añadido el tampón lisis, se incubaron 30 minutos en hielo, se centrifugaron a 4°C y 4000 rpm durante 5 minutos, se pasó el sobrenadante a un eppendorf previamente enfriado y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Se realizó una cuantificación de proteínas totales mediante el ensayo BCA (Thermo Fisher Scientific). Dicho ensayo consiste en realizar una recta patrón partiendo de concentraciones conocidas de la proteína BSA y extrapolar para conocer la concentración de proteína en nuestras muestras.

3.4.2 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF

En primer lugar, se prepararon las muestras para la electroforesis. Para ello, se añadió a los extractos descongelados tampón de carga (un tercio del volumen final) y se completó con agua MiliQ. El tampón de carga contenía Tris/HCl 150 mM pH 7,4; SDS 3%; molibdato de sodio 0,3 mM; pirofosfato sódico 30 mM; fluoruro de sodio 30 mM; glicerol al 30% v/v; azul de bromofenol 0,06% p/v y β -mercaptoetanol 30% v/v. A continuación, se calentaron las muestras a 95°C durante 10 minutos en baño seco (Selecta).

Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS para separar las proteínas en función de su peso molecular. La electroforesis se realizó en geles verticales discontinuos al 12 o al 15% de acrilamida. Dichos geles se dividían en gel concentrador o stacking y gel separador o resolving, la composición de ambos se encuentra recogida en el [Anexo II](#). Tras insertar los geles en la cubeta de electroforesis se añadió tampón de electroforesis (compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,01%) y se cargaron 15 μ L de muestra por carril y 4 μ L de marcador de peso molecular (BlueStar Plus Prestained Protein Marker, Nippongenetics). La electroforesis se realizó a 80V durante los primeros 30 minutos y, después, a 180V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final de gel (aproximadamente 1 hora).

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF previamente activada con metanol. Se utilizó un sistema de transferencia semiseca (BioRad) en el cual se dispuso un montaje tipo sandwich con la membrana y el gel entre papeles de filtro Whatman, todo ello equilibrado en tampón de transferencia con metanol al 20% y asegurándose de que no quedasen burbujas entre el gel y la membrana. El tampón de transferencia contenía Tris/HCl 48 mM, pH 8,3; glicina 39mM; SDS 0,037% y metanol 20%. La electrotransferencia se realizó a 20V durante 75 minutos. Una vez terminada, se comprobó la correcta transferencia de las bandas de proteína con Rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético al 0,05%. Las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en tampón B (Tris/HCl 10 mM, pH 8; NaCl 0,12 M; Tween-20 0,1%, Sigma; timerosal, 0,1 g/L).

3.4.3 Análisis de proteínas por Western Blotting

Una vez bloqueada la membrana, se lavó con tampón B y se incubó con el anticuerpo primario específico contra la proteína que se quería analizar. Dicho anticuerpo se encontraba diluido en una solución que contenía tampón B con 5% de BSA y 0,05% de azida de sodio. Se incubó toda la noche en agitación a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 15, 10 y 5 minutos con tampón B. A continuación, se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario (1,5 µL anticuerpo en 20 mL de leche en polvo al 2,5% disuelta en tampón B) conjugado con peroxidasa. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con tampón B (15, 10 y 5 minutos) y se procedió al revelado de la membrana. Para ello, se incubó durante un minuto con el sustrato quimioluminiscente (ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) y se transfirió a una funda de plástico transparente que se colocó en el equipo de revelado de Western-Blot digital (GE Healthcare). Para analizar las bandas, se utilizó el programa informático Image J.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se encuentran recogidos en el [Anexo III](#).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 La combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 inhibe la proliferación en las líneas de mieloma múltiple humano

En primer lugar, se realizaron ensayos de reducción del MTT para analizar la capacidad de inhibición de la proliferación celular del dinaciclib sobre las líneas celulares MM1S, U266 y RPMI8226. En la [Figura 3](#) se observa que RPMI8226 es la línea celular más sensible con un IC₅₀ de aproximadamente 8 nM. Mientras que MM1S presenta una sensibilidad intermedia (IC₅₀ de 9,5 nM), sería U266 la línea más resistente a este fármaco (IC₅₀ de 12,3 nM). Estos resultados se correlacionan, en general, con los obtenidos en estudios previos realizados en el grupo de investigación. En dichos estudios, el IC₅₀ observado tras tratar las células con dinaciclib es de entre 10 y 12 nM para MM1S y U266 y de 3 nM para la línea RPMI8226 [18, 19]. Por tanto, MM1S y U266 muestran resultados similares y reproducibles en todos los estudios pero RPMI8226, al ser una línea tan inestable, presenta resultados dispares y se necesitaría realizar otro estudio más para poder determinar de manera más exacta el valor del IC₅₀ tras el tratamiento con dinaciclib.

Cabe destacar que, todas las condiciones probadas en U266 así como la línea MM1S tratada solamente con dinaciclíb, a partir de una concentración en torno a 25 nM de dinaciclíb no disminuye (o apenas varía) la viabilidad celular (**Figuras 3.A y 3.B**). Esto podría deberse a una posible subpoblación celular más resistente que necesitaría estar tiempos más largos en contacto con el dinaciclíb. En estudios previos [18], se vio que al tener las células en contacto con el dinaciclíb durante 48 horas la viabilidad celular se reduce prácticamente a 0%.

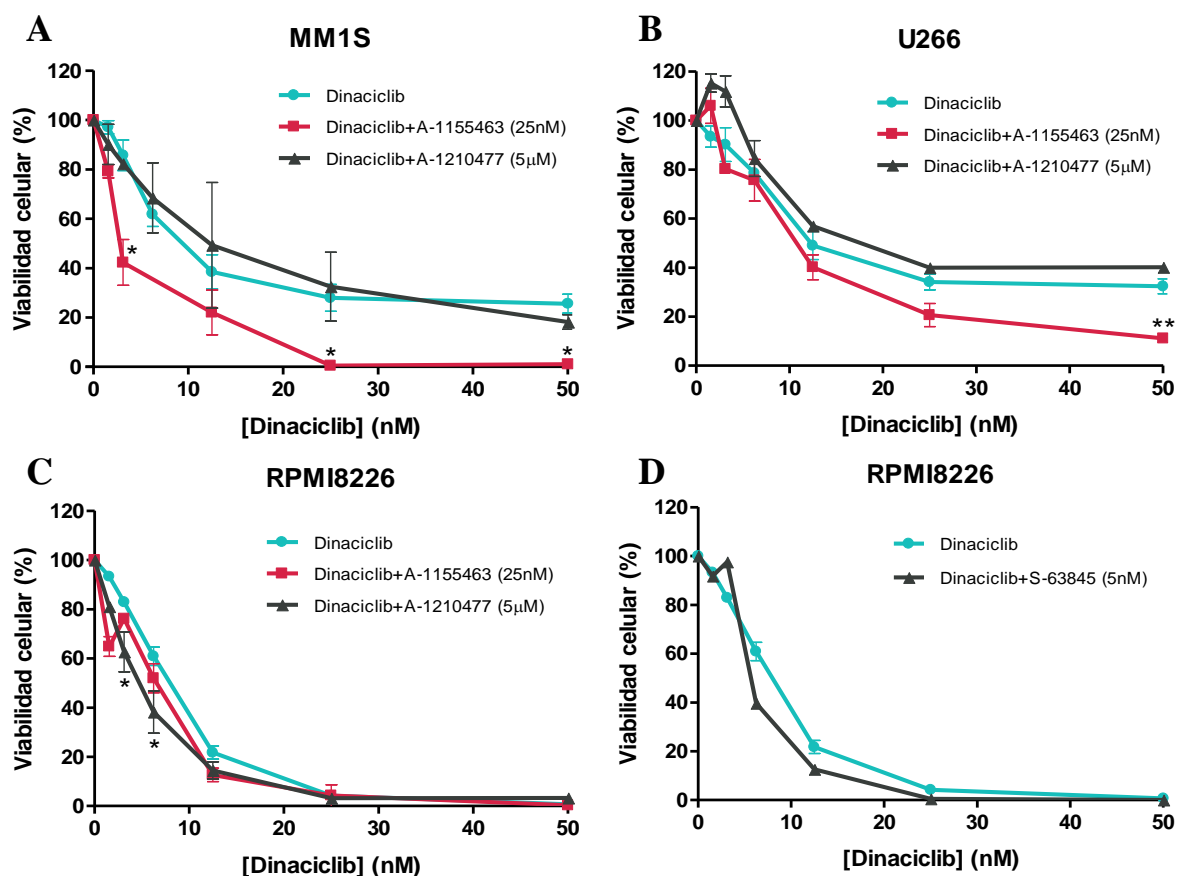


Figura 3. Efecto de la combinación de dinaciclíb y miméticos de BH3 inhibidores de Bcl-X_L (A-1155463) y Mcl-1 (A-1210477 y S-63845) sobre la viabilidad celular de las líneas de mieloma múltiple MM1S (A), U266 (B) y RPMI8226 (C y D). Las células se sembraron a 3x10⁵ cél/mL en medio completo y se incubaron durante 24 horas a concentraciones crecientes de dinaciclíb, solo o en combinación con los miméticos de BH3. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añadió la disolución de MTT y, tras 2 horas de incubación, se midió la absorbancia a 550 nm. Los resultados son la media ±SEM de 4-5 experimentos diferentes.

Además, como se ha comentado anteriormente, las células de mieloma múltiple sobreexpresan Mcl-1 y Bcl-X_L para evadir la apoptosis y aumentar la resistencia a fármacos [12]; por ello, se evaluó la posible sinergia del dinaciclíb con miméticos de BH3.

Se ha visto que las líneas MM1S y RPMI8226 son sensibles a A-1155463 (inhibidor de Bcl-X_L) pero que, por el contrario, la línea U266 necesita tener silenciado Mcl-1 para que el inhibidor de Bcl-X_L pueda aumentar la apoptosis [24]. Dados los buenos resultados de estos, y otros estudios, se decidió probar la combinación de A-1155463 con dinaciclíb. Se observa (**Figura 3.A y 3.B**) que A-1155463 presenta sinergia con dinaciclíb en las líneas celulares MM1S y U266, siendo la primera línea en la que más efecto muestra la combinación de estos

fármacos (IC₅₀ de 4,5 nM). Cabe destacar que, a pesar de que en la línea U266 el dinaciclib y el inhibidor de Bcl-X_L por separado no reducen el número de células viables más allá del 40%, la combinación de ambos consigue disminuir la proliferación en dicha línea. Se observa que la combinación de ambos fármacos, aunque no reduce mucho el IC₅₀ obtenido usando solo dinaciclib, parece aumentar la efectividad a dosis más altas (50 nM) del inhibidor de CDKs de manera que el dinaciclib solo no consigue reducir la viabilidad más allá del 40% pero la combinación de dinaciclib e inhibidor de Bcl-X_L reduce la viabilidad hasta, aproximadamente un 10% (**Figura 3.B**). En cuanto a RPMI8226, la combinación de fármacos no muestra diferencias estadísticamente significativas (**Figura 3.C**). Esto puede deberse a que esta línea ya es bastante sensible a ambos fármacos por separado y, por tanto, la combinación de ambos no ha conseguido disminuir aún más la proliferación celular.

Por otro lado, se han utilizado los inhibidores de Mcl-1 A-1210477 y S-63845. Se ha descrito que A-1210477 aumenta la apoptosis en las líneas de mieloma múltiple OPM-2 y H929 [24]. Por ello, se decidió probar si la combinación de dicho inhibidor con dinaciclib muestra efecto sinérgico en las tres líneas empleadas en este trabajo. Como se muestra en la **Figura 3.C**, la combinación de fármacos solamente produce sinergia en RPMI8226 (IC₅₀ de 4,7 nM). En consecuencia, y ante la comercialización de un nuevo inhibidor más potente, S-63845, se decidió emplear este último en combinación con dinaciclib solamente para RPMI8226 (**Figura 3.D**); sin embargo, el IC₅₀ (5,7 nM) apenas varió. La diferencia entre ambos inhibidores se encuentra en que S-63845 se une con una afinidad mucho mayor a Mcl-1[25], por lo que para obtener los mismos resultados se necesita una concentración mucho menor de S-63845 (5 nM) que de A-1210477 (5 μM). Además, S-63845, a diferencia de A-1210477, no se une a proteínas séricas por lo que la biodisponibilidad del primer fármaco es mayor que la del segundo [26].

Un hecho que llama la atención es que, a excepción de MM1S, en U266 y RPMI8226 la combinación de BH3 miméticos y dinaciclib a bajas concentraciones (1-5 nM) parece inducir proliferación celular (**Figuras 3.B, 3.C y 3.D**). Sin embargo, este ligero aumento de la viabilidad celular no se encuentra recogido en la literatura.

Tabla 1. IC₅₀ de dinaciclib sobre las líneas de mieloma múltiple humano MM1S, U266 y RPMI8226, solo o en combinación con miméticos de BH3 que inhiben Bcl-X_L (A-1155463) o Mcl-1 (A-1210477 y S-63845). Los resultados son la media ±SEM de 4-5 experimentos diferentes.

	MM1S	U266	RPMI8226
Dinaciclib	9,5	12,3	8,0
Dinaciclib + A-1155463 (Inh. Bcl-X _L) 25 nM	4,5	10,8	6,6
Dinaciclib + A-1210477 (Inh. Mcl-1) 5 μM	12,3	17,6	4,7
Dinaciclib + S-63845 (Inh. Mcl-1) 5 nM	-	-	5,7

4.2 La combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 provoca muerte celular por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple humano

El ensayo de reducción del MTT, como previamente se ha comentado, permite detectar que la combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 inhibe la proliferación celular. Sin embargo, no establece si dicha inhibición del crecimiento se debe a un efecto citostático o citotóxico, por ello, se analizó mediante citometría de flujo la traslocación de la fosfatidilserina (PS) a la cara externa de la membrana plasmática. Este evento se corresponde con los primeros estadios de la apoptosis y, por tanto, indicarían que la combinación de fármacos tiene un efecto citotóxico.

Puesto que en la línea celular MM1S, el fármaco A-1210477 (inhibidor de Mcl-1) no mostró efecto sinérgico con el dinaciclíb y, por el contrario, la combinación con A-1155463 (inhibidor de Bcl-X_L) disminuyó en gran medida el IC₅₀, se decidió utilizar solamente este último inhibidor para los ensayos de citometría. Además, se bajó la dosis de A-1155463 (a 2 y 5 nM) ya que esta técnica es mucho más sensible. Como se observa en la **Figura 4**, ambas combinaciones de fármacos aumentan la apoptosis mostrando un efecto sinérgico a partir de una concentración de 2,5 nM de dinaciclíb. Cabe destacar que la dosis de inhibidor a 5 nM induce apoptosis por sí mismo en el control, este resultado se correlaciona con estudios previos que indican que A-1155463 es capaz de matar células MM1S mediante una vía dependiente de caspasas [24]. Por otro lado, a pesar de haber disminuido la concentración de A-1155463, a una concentración 5 nM de dinaciclíb la viabilidad celular sufre una reducción de prácticamente el 90% indicando un efecto sinérgico entre ambos compuestos.

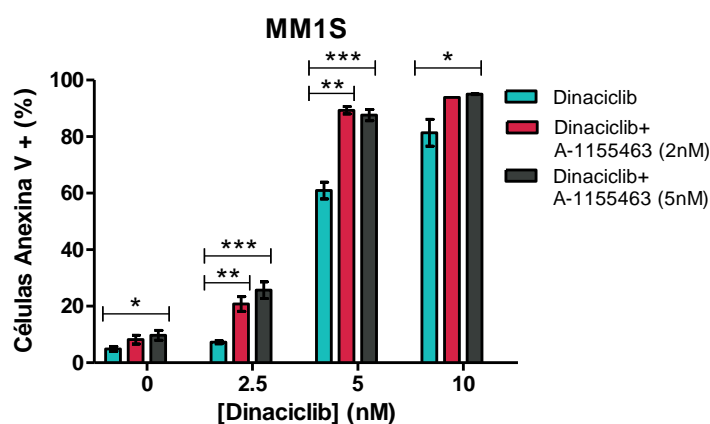


Figura 4. Efecto citotóxico de la combinación de dinaciclíb y el mimético de BH3, inhibidor de Bcl-X_L, A-1155463 en la línea de mieloma múltiple MM1S. Las células se sembraron a 3×10^5 cél/mL y se incubaron durante 24 horas a concentraciones crecientes de dinaciclíb, solo o en combinación el mimético de BH3. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se estudió la exposición de la PS mediante marcaje con anexina V-APC y análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

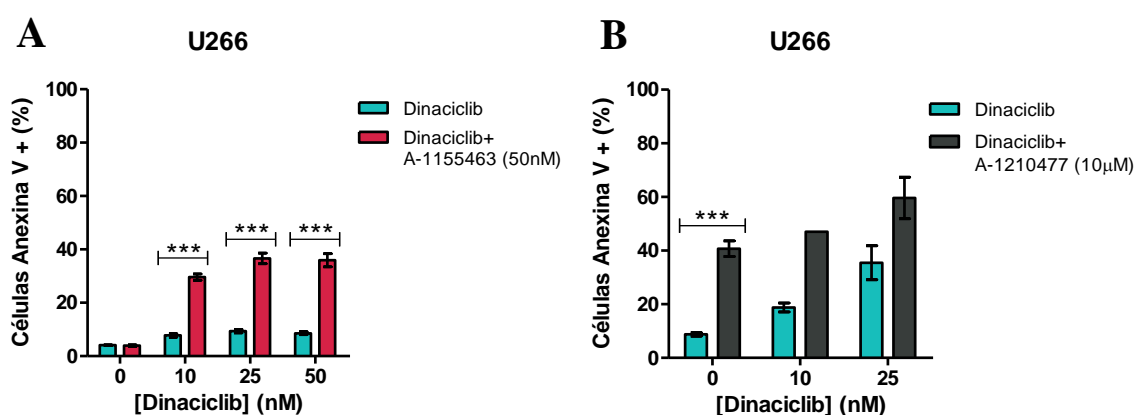


Figura 5. Efecto citotóxico de la combinación de dinaciclíb con el inhibidor de Bcl-X_L A-1155463 (A) o con el inhibidor Mcl-1 A-1210477 (B) en la línea de mieloma múltiple U266. Las células se sembraron a 3×10^5 cél/mL y se incubaron durante 24 horas a concentraciones crecientes de dinaciclíb, solo o en combinación con los miméticos de BH3. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se estudió la exposición de la PS mediante marcaje con anexina V-APC y análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SEM de 2 experimentos.

En cuanto a U266, puesto que los resultados del MTT mostraron que se trata de la línea más resistente a los fármacos, se duplicó la concentración de los miméticos de BH3. De esta manera, se consiguió un aumento del efecto sinérgico y una inducción de la apoptosis bastante mayor que la que provoca solamente dinaciclib (**Figura 5.A y 5.B**). Pese a ello, el porcentaje de muerte celular obtenido con la combinación sigue siendo bastante bajo y habría que estudiar cuanto más se puede aumentar las dosis de los fármacos sin que resulte demasiado tóxico para las células no tumorales. Por otro lado, estudios previos indican que la viabilidad de U266 no disminuye al silenciar Mcl-1 o Bcl-X_L por separado y que otros miméticos de BH3 que inhiben Bcl-X_L y Bcl-2, tales como ABT-737 o ABT-199, no resultan especialmente eficaces en dicha línea. En ese mismo estudio, se demostró que al tratar células U266 con la proteína Mcl-1 silenciada con inhibidores de Bcl-X_L se induce rápidamente muerte celular [24]. En base a estos estudios y a los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo, se puede deducir que la supervivencia de la línea U266 depende tanto de Mcl-1 como de Bcl-X_L. Por ello, la mejora del tratamiento de estas células podría redirigirse al estudio de combinaciones de tres fármacos, comprendiendo al dinaciclib, el inhibidor de Bcl-X_L A-1155463 y un inhibidor de Mcl-1 (A-1210477 o S-63845).

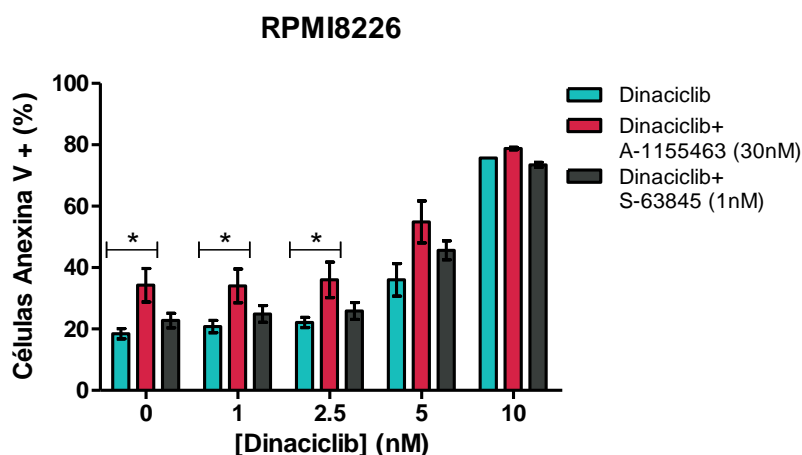


Figura 6. Efecto citotóxico de la combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 inhibidores de Bcl-X_L (A-1155463) y Mcl-1 (S-63845) en la línea de mieloma múltiple RPMI8226. Las células se sembraron a 2×10^5 cél/mL y se incubaron durante 24 horas a concentraciones crecientes de dinaciclib, solo o en combinación con los miméticos de BH3. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se estudió la exposición de la PS mediante marcaje con anexina V-APC y análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SEM de 5 experimentos diferentes.

Con respecto a RPMI8228, a pesar de que los resultados del MTT no mostraron sinergia entre el dinaciclib y A-1155463, en base al estudio anteriormente comentado que determinó que esta línea si es sensible al inhibidor de Bcl-X_L [24], se decidió aumentar la concentración del mismo hasta 30 nM. De esta forma, se comprobó que, tal y como habían sugerido los resultados del MTT, no se produce sinergia entre ambos fármacos ya que al aumentar la concentración de dinaciclib no aumenta el porcentaje de muerte celular obtenido en la combinación de fármacos (**Figura 6**). En cuanto al inhibidor de Mcl-1 S-63845, estudios paralelos en el grupo de investigación, permitieron determinar que se trata de un fármaco inestable que se degrada tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación. Una vez se determinó esto, se realizaron alícuotas del fármaco y, en dichos mismos estudios, se observó que una concentración 5 nM del inhibidor (dosis utilizada en los experimentos de MTT anteriormente comentados) produce demasiada muerte celular. Por esta razón, para el ensayo de citometría con la línea RPMI8226

del presente trabajo, se decidió bajar la dosis de S-63845 a 1 nM. Sin embargo, los resultados (**Figura 6**) no muestran efecto sinérgico entre el inhibidor y el dinaciclib lo que indica que habría que buscar la sinergia con una concentración de inhibidor superior a 1 nM pero inferior a 5 nM.

A la vista de los resultados obtenidos en estos experimentos, se puede concluir que la combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 posee efecto citotóxico sobre las líneas de mieloma múltiple MM1S, U266 y RPMI8226. Además, dado que la combinación de dinaciclib con el inhibidor de Bcl-X_L presenta mayor efecto sinérgico en dos de las tres líneas estudiadas, podría deducirse que dicha proteína antiapoptótica posee un papel más importante en la evasión de la apoptosis que Mcl-1.

4.3 Efecto del dinaciclib sobre el ciclo celular

Las CDKs regulan, como ya se ha comentado anteriormente, la progresión a través de las etapas del ciclo celular [6]. Cabría esperar que si se inhibe la actividad de estas proteínas el ciclo celular se detenga y, a continuación, se produzca muerte celular o apoptosis. Por esta razón, varios grupos de investigación han estudiado el efecto del dinaciclib sobre el ciclo celular para determinar en qué fase del mismo se produce el arresto celular previo a la apoptosis; sin embargo, en la literatura se muestran discrepancias.

Se ha descrito que el dinaciclib detiene el ciclo en la fase G₀/G₁ [4]; no obstante, otro artículo datado el mismo año defiende que el arresto celular se produce en la fase S. Este último estudio demuestra en líneas de mieloma múltiple (MM1S y RPMI8226) que el dinaciclib altera el proceso de recombinación homóloga que llevan a cabo las células para reparar el DNA en la fase S. Sus resultados muestran como, tras un tratamiento con dinaciclib, el número de células detenidas en la fase S incrementa más que el número de células detenidas en la fase G₁ y, además, se observa una disminución en el porcentaje de células que se encuentran en G₂/M [27].

En base a los estudios comentados, se decidió analizar el efecto del dinaciclib sobre el ciclo celular en las tres líneas empleadas en este trabajo. Tal y como se observa en la **Figura 7.A** y **7.B** y la **Tabla 2**, las líneas MM1S y U266 muestran un comportamiento similar de manera que, a una concentración 5 nM de dinaciclib, disminuye el número de células en las fases G₁ y S y aumenta el porcentaje de células en G₂/M. Al elevar la concentración de dinaciclib a 25 nM, incrementan las células apoptóticas y, mientras que la fase G₁ no varía, disminuye muy ligeramente el número de células en fase S y se reduce, de manera más notoria, el número de células en G₂/M. Los resultados parecen indicar que el arresto celular previo a la apoptosis se produce en la fase G₂/M a una concentración 5 nM de dinaciclib y que, al aumentar la concentración del fármaco a 25 nM, la disminución del porcentaje en G₂/M se corresponde con las células que han sufrido apoptosis y han contribuido a aumentar el porcentaje de células muertas. Estos resultados, aunque no encajan con los mostrados en los estudios publicados hasta la fecha sobre mieloma múltiple, sí que coinciden con el efecto que tiene el dinaciclib sobre el ciclo celular en otros cánceres, como melanoma y glioma, en los cuales se ha demostrado que dicho fármaco produce un arresto en la fase G₂/M [28, 29].

En cuanto a RPMI8226 (**Figura 7.C**), a una concentración 5 nM de dinaciclib, presenta un comportamiento similar a MM1S y U266. Por otro lado, como se trata de la línea celular más sensible a dinaciclib, la concentración de dicho fármaco no se subió hasta 25 nM sino que se dejó en 10 nM. En consecuencia, el comportamiento que se observa es diferente ya que, con

respecto a los valores obtenidos para una concentración 5 nM de dinaciclib, a una concentración 10 nM del fármaco el porcentaje de células en G₁ no varía y, mientras que el número de células en fase S aumenta, el número de células en G₂/M disminuye. Sin embargo, el porcentaje de células apoptóticas no aumenta; es decir, a una concentración 10 nM de dinaciclib se produce un arresto del ciclo en la fase S pero habría que aumentar la concentración de dinaciclib para que las células muriesen y se incrementara el porcentaje de células apoptóticas. Por tanto, se puede concluir que el efecto del dinaciclib sobre el ciclo en las células RPMI8226, a dosis bajas del fármaco, es similar a los estudios comentados sobre melanoma y glioma y, a dosis altas del fármaco, es similar a los estudios sobre mieloma múltiple.

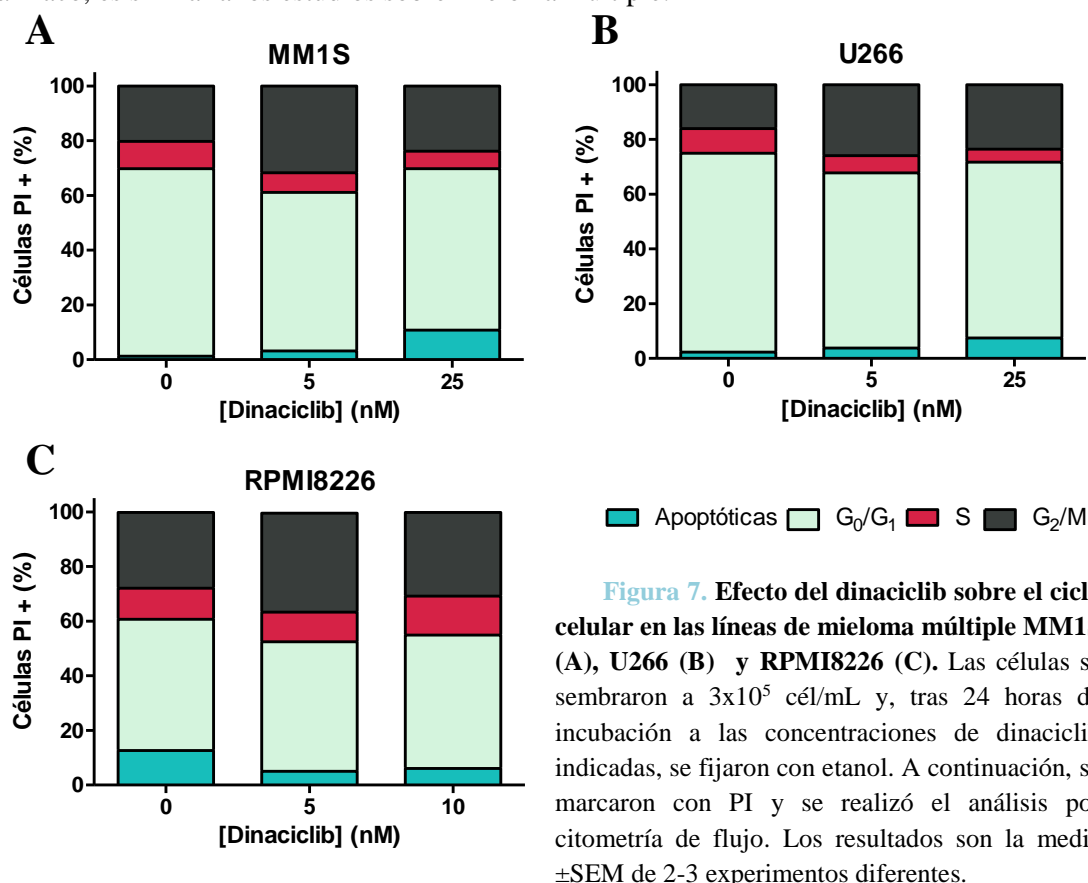


Figura 7. Efecto del dinaciclib sobre el ciclo celular en las líneas de mieloma múltiple MM1S (A), U266 (B) y RPMI8226 (C). Las células se sembraron a 3×10^5 cél/mL y, tras 24 horas de incubación a las concentraciones de dinaciclib indicadas, se fijaron con etanol. A continuación, se marcaron con PI y se realizó el análisis por citometría de flujo. Los resultados son la media \pm SEM de 2-3 experimentos diferentes.

Tabla 2. Porcentaje de las fases del ciclo celular en las líneas de mieloma múltiple MM1S, U266 y RPMI8226 tratadas a diferentes concentraciones de dinaciclib. Los resultados son la media \pm SEM de 2-3 experimentos diferentes

	Apoptóticas (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
MM1S				
Control	1,27	68,58	9,96	20,19
Dinaciclib 5 nM	3,23	57,87	7,21	31,69
Dinaciclib 25 nM	10,78	59,02	6,37	23,83
U266				
Control	2,28	72,68	8,97	16,07
Dinaciclib 5 nM	3,80	64,00	6,29	25,91
Dinaciclib 25 nM	7,48	64,26	4,74	23,52
RPMI8226				
Control	12,62	48,14	11,44	27,80
Dinaciclib 5 nM	5,08	47,62	10,94	36,36
Dinaciclib 10 nM	6,09	48,91	14,33	30,67

En el *Anexo IV* se muestran los resultados del ciclo de las tres líneas celulares analizados con la herramienta “Cell Cycle” del programa FlowJo 7.6.1.

4.4 Análisis de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en presencia de dinaciclib

La familia Bcl-2, involucrada en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis, consta de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas de manera que la homeostasis entre ambos tipos de proteínas es esencial para mantener el balance entre la supervivencia y la muerte celular [12]. Se ha visto que el dinaciclib induce muerte celular a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis [30], por ello, se decidió analizar la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 en presencia de dicho fármaco en las líneas MM1S, U266 y RPMI8226. Además, se pensó que sería interesante estudiar la influencia del fármaco a concentraciones subletales de manera que se pueda observar la capacidad de recuperación de las células tumorales. Puesto que MM1S y RPMI8226 son más sensibles se utilizó una concentración 5 nM de dinaciclib, sin embargo, U266 es más resistente y por ello se subió la concentración del fármaco hasta 25 nM.

La proteína Mcl-1 tiene una vida media corta y su expresión en células de mieloma múltiple está regulada por la IL-6. Se ha visto que la acción antiapoptótica de esta proteína se debe a que bloquea la progresión de la apoptosis uniéndose y secuestrando a las proteínas proapoptóticas solo-BH3 Bim, Puma, Noxa, Bak y Bax. Además, Mcl-1 contribuye a desarrollar resistencias a los fármacos que se usan en la quimioterapia convencional [31]. Por otro lado, se ha descrito en linfoma de células B que el dinaciclib, mediante la inhibición de CDK9, reduce la expresión de Mcl-1 [32]. En base a estos estudios, se decidió analizar cómo influye el dinaciclib en la expresión de Mcl-1 en las tres líneas empleadas en este trabajo.

Tanto en MM1S como en U266 se observa (*Figura 7* y *Figura A5.A y 5A.B* del *Anexo V*) que, al igual que sucedía en el linfoma de células B, la expresión de Mcl-1 se reduce tras 4 y 8h de incubación con el fármaco. A las 16h, mientras que en MM1S ya empieza a recuperarse la expresión de la proteína, en U266 sigue disminuyendo y, además, el descenso de la proteína se da de manera más brusca en esta última línea. Esto, probablemente, sea debido a que en U266 la concentración utilizada del fármaco es mucho mayor y por eso, aunque no induzca muerte celular, esta necesita más tiempo para recuperar los niveles de expresión de la proteína. En cuanto a RPMI8226, al ser una línea tan inestable, se observa que a las 4h el dinaciclib no muestra ningún signo de muerte celular puesto que la viabilidad, así como la expresión de Mcl-1, aumenta. Se debe esperar hasta 8 y 16h para que la concentración de proteína vuelva a descender a los niveles iniciales. Estos resultados indican que se necesitaría una concentración mayor de fármaco para que se inhiba la expresión de la proteína Mcl-1 en la línea RPMI8226.

En cuanto a Bcl-X_L y Bcl-2, se tratan, al igual que Mcl-1, de proteínas antiapoptóticas que interactúan con proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, para impedir la formación de poros en la membrana de la mitocondria que permitan la liberación del citocromo c y la inducción de la apoptosis [11]. Tanto Bcl-X_L como Bcl-2 se encuentran sobreexpresadas en un gran número de cánceres y, por ello, se han desarrollado varios miméticos de BH3 destinados a inhibir la acción de estas proteínas [24]. Dada la aparente importancia de estas dos proteínas en la proliferación de las células tumorales, se decidió estudiar el efecto del dinaciclib sobre su expresión en las líneas de mieloma múltiple MM1S, U266 y RPMI8226.

Como se observa en la **Figura 7** y en la **Figura A5** del **Anexo V**, el dinaciclib, a tiempos cortos, apenas consigue disminuir la concentración de Bcl-X_L en ninguna de las tres líneas, pero a tiempos más largos (16h) sí que provoca un descenso apreciable en las líneas MM1S y U266. En cuanto a Bcl-2, se reducen un poco más los niveles de expresión con respecto a Bcl-X_L, pero tampoco se aprecia un descenso tan notorio como el que mostraba Mcl-1. Estos resultados se correlacionan con los mostrados en un estudio sobre el efecto del dinaciclib en tumores sólidos. Dicho estudio demuestra que el dinaciclib reduce los niveles de mRNA de las proteínas Bcl-X_L y Bcl-2 pero, sin embargo, los niveles de dichas proteínas apenas varían o lo hacen más lentamente. Esto se debe a que Bcl-X_L y Bcl-2 tienen una vida media mucho más larga que Mcl-1 y, por tanto, la disminución de Bcl-X_L y Bcl-2, consecuencia del tratamiento de dinaciclib, tardará más tiempo en apreciarse ya que primero deben degradarse las proteínas de las que disponían las células antes del tratamiento con el fármaco [33].

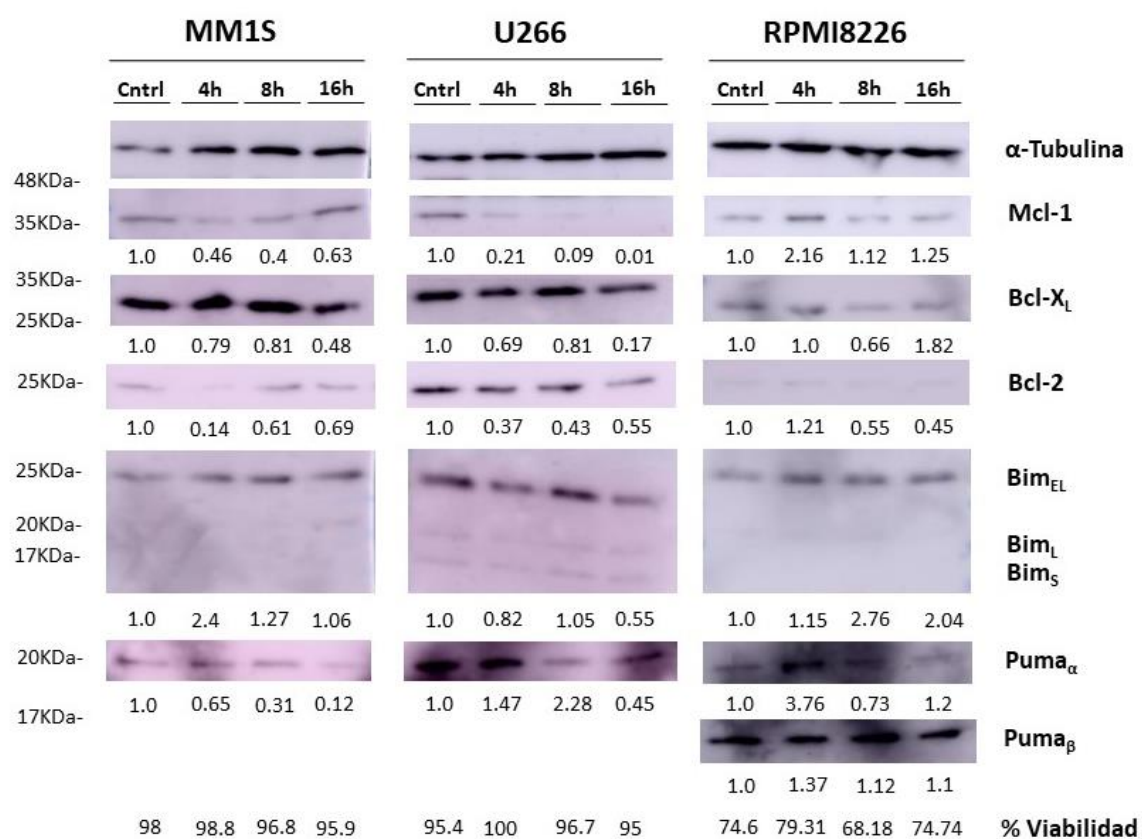


Figura 7. Efecto del dinaciclib sobre la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en las líneas de mieloma múltiple MM1S, U266 y RPMI8226. Las células se sembraron a 3×10^5 cél/mL y se incubaron durante 4, 8 o 16 horas a una concentración de dinaciclib 5 nM (MM1S y RPMI8226) o 25 nM (U266). Tras la cuantificación mediante el ensayo BCA, se realizó la electroforesis utilizando la tubulina como control. Los números debajo de cada banda corresponden con el ratio de la proteína correspondiente de la familia Bcl-2 con respecto a la tubulina y con respecto al control (media de 2-4 experimentos diferentes). En la parte inferior de la imagen se muestra el porcentaje de viabilidad celular.

Con respecto a la proteína Bim, se trata de un sensor de estrés celular capaz de promover la apoptosis. Se han descrito tres isoformas principales conocidas como Bim_{EL}, Bim_L y Bim_S; siendo la primera la más abundante pero la última la más potente. En células de mieloma múltiple Bim está regulada negativamente por la IL-6 y, además, es neutralizada por Mcl-1 para evitar su acción proapoptótica [34]. Puesto que Mcl-1 disminuye su expresión en presencia de

dinaciclib, se decidió estudiar como la disminución de dicha proteína antiapoptótica, debido al tratamiento con el fármaco, afecta a la expresión de Bim.

Dado que Bim se trata de una proteína proapoptótica y el dinaciclib induce apoptosis, se esperaría que el fármaco elevara la concentración de dicha proteína. En la **Figura 7** y en la **Figura A5** del **Anexo V** se observa que las líneas MM1S y RPMI8226 sí que aumentan los niveles de expresión de Bim. Por el contrario, U266 disminuye la concentración de Bim, lo cual sucede de manera similar en células de osteosarcoma tratadas con dinaciclib [35]. Una posible explicación de esta disminución de expresión de la proteína podría ser que, puesto que Bim se encuentra asociada a Mcl-1, al degradarse Mcl-1 por acción del dinaciclib la proteína Bim también se vea afectada de alguna manera y termine degradándose.

Por último, se decidió estudiar la expresión de las proteínas proapoptóticas Puma y Noxa. Se ha descrito que Noxa interacciona con proteínas antiapoptóticas neutralizando la acción de las mismas y permitiendo, así, que Bim y Puma interaccionen con Bax y Bak para desencadenar la apoptosis [36]. En la **Figura 7** y la **Figura A5** del **Anexo V** se observa que el dinaciclib, a excepción de en MM1S donde disminuye la concentración de Puma, en U266 y RPMI8226 aumenta la expresión de dicha proteína. Además, la isoforma β solo pudo detectarse en la línea RPMI8226, donde muestra niveles de expresión inferiores a la isoforma α . En cuanto a Noxa, no se pudo detectar su nivel de expresión mediante la técnica Western Blotting. Se necesitaría una técnica mucho más sensible, como marcaje intracelular con anticuerpos y el uso de citometría, para analizar como varía la expresión de Noxa en células tratadas con dinaciclib. También sería interesante estudiar Puma mediante marcaje con anticuerpos y citometría ya que, al ser una técnica más sensible, se podrían analizar las dos isoformas.

A la vista de los resultados obtenidos en estos experimentos, se puede concluir que el tratamiento con dinaciclib disminuye, en MM1S y U266, la expresión de proteínas antiapoptóticas. En cuanto a las proteínas proapoptóticas, Bim parece ser la encargada de desencadenar la apoptosis en la línea MM1S mientras que, en U266, Puma podría tener mayor importancia en el proceso de inicio de la muerte celular. Con respecto a RPMI8226, se trata de una línea muy inestable que necesitaría mayores concentraciones de dinaciclib para apreciar mejor la variación en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. A la concentración de dinaciclib estudiada (5 nM), los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas es bastante similar a los niveles de proteínas proapoptóticas, siendo estos últimos ligeramente superiores. No obstante, no se muestra una diferencia lo suficientemente significativa para poder sacar conclusiones.

Por otro lado, aunque la técnica Western Blotting permite detectar cambios en la expresión de una proteína o variaciones en la concentración de la misma, no permite asegurar que una proteína concreta sea clave en un mecanismo o ruta celular determinada. Por ello, para verificar el papel de las distintas proteínas de la familia Bcl-2 en el mecanismo de inducción de la apoptosis a través de la vía intrínseca, la mejor opción sería realizar experimentos de silenciamiento génico mediante, por ejemplo, RNA de interferencia o la técnica CRISPR/Cas9. De esta manera, eliminando la expresión de la proteína, o reduciéndola al mínimo, se puede estudiar de forma más precisa la función de dicha proteína en un mecanismo celular determinado.

4.5 Discusión general

En este trabajo se ha realizado un estudio sobre el mecanismo mediante el cual el inhibidor de CDKs, dinaciclib, induce muerte celular en las líneas de mieloma múltiple MM1S, U266 y RMI8226. Además, se ha analizado si se produce sinergia entre el dinaciclib y miméticos de BH3 que inhiben Bcl-X_L (A-1155463) o Mcl-1 (A-1210477 y S-63845) ya que estas proteínas antiapoptóticas se encuentran sobreexpresadas en células de mieloma múltiple y contribuyen a aumentar a resistencia a fármacos [12]. Es importante tener en cuenta que, debido al gran número de anomalías genéticas, el comportamiento de las distintas líneas celulares frente a los diversos fármacos utilizados no va a ser el mismo.

En primer lugar, se comprobó que la inhibición de la proliferación celular tras el tratamiento con dinaciclib se correspondía con el efecto citotóxico del fármaco sobre las líneas de mieloma múltiple empleadas, siendo RPMI8226 la línea más sensible y U266 la más resistente.

A continuación, se comprobó la existencia de un efecto citotóxico sinérgico entre el dinaciclib y los miméticos de BH3. Los experimentos mostraron que la línea MM1S es especialmente sensible al inhibidor de Bcl-X_L A-1155463 mientras que la combinación con el inhibidor de Mcl-1 A-1210477 no presentó efecto sinérgico. En cuanto a la línea RPMI8226, se observó un posible efecto sinérgico con el inhibidor A-1155463, aunque menor que en las otras dos líneas, y, a pesar de que no se demostró sinergia entre el dinaciclib y S-63845 (inhibidor de Mcl-1), se consiguió acotar el rango de concentración del inhibidor de Mcl-1 (entre 1 y 5 nM) en el que es probable que si se produzca un efecto sinérgico entre ambos fármacos. Con respecto a U266, aunque se obtuvo sinergia entre el dinaciclib y ambos miméticos de BH3, el porcentaje de muerte celular observado es bastante bajo puesto que, como se ha comentado anteriormente, se trata de la línea más resistente. Sería necesario estudiar cuanto más se puede subir la dosis de los fármacos para matar las células U266 sin que se vean afectadas las células no tumorales. Dada la resistencia mostrada, por parte de las células tumorales, a esta combinación de fármacos, tal vez funcionaría mejor probar nuevas combinaciones de compuestos basadas en el uso de tres fármacos, comprendiendo al dinaciclib, el inhibidor de Bcl-X_L A-1155463 y un inhibidor de Mcl-1 (A-1210477 ó S-63845).

Por otro lado, la progresión a través de las etapas del ciclo celular está regulada por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) [6]. En base a esto, se decidió analizar el efecto que tiene el inhibidor de CDKs, dinaciclib, sobre el ciclo celular para estudiar en que etapa del mismo se produce el arresto previo a la inducción de la apoptosis. En los experimentos se observó que, en las líneas MM1S y U266, el dinaciclib provoca el arresto del ciclo celular en G₂/M de manera similar a la observada en otros estudios sobre melanoma y glioma [28, 29]. En cuanto a RPMI8226, los resultados mostraron que, a dosis bajas del dinaciclib, también sufre un arresto en G₂/M; sin embargo, al aumentar la dosis del fármaco, el arresto se producía en la fase S mostrando un comportamiento más similar al observado en otros estudios sobre mieloma múltiple [27].

Por último, se analizó la expresión de varias proteínas de la familia Bcl-2 para determinar su posible función en la apoptosis inducida por el dinaciclib. Mientras que las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L y Bcl-2 apenas disminuyen su expresión a tiempos cortos (4 y 8h), la proteína antiapoptótica Mcl-1 muestra, por lo general, un descenso notorio de la concentración. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que Mcl-1 tiene una vida media corta, de tal manera que, cuando el dinaciclib inhibe CDK9 reduciendo, así, la expresión de Mcl-1 [32], a

las pocas horas de incubación ya se observa una disminución en la concentración de la proteína. Por el contrario, Bcl-X_L y Bcl-2 tienen una vida media más larga y, a los tiempos establecidos en nuestros experimentos (4, 8 y 16h) no se observa una disminución de la expresión muy significativa. Tal vez, si se dejara mayores tiempos de incubación con el dinaciclib daría tiempo a que las proteínas que tenían las células antes de tratamiento con el fármaco se degradaran y no camuflaran, así, el descenso en el nivel de mRNA que codificará para nuevas Bcl-X_L y Bcl-2. Sin embargo, otra posible explicación de por qué los niveles de Bcl-X_L y Bcl-2 apenas varía en presencia de dinaciclib podría ser que el fármaco no module la expresión de estas dos proteínas.

Además, cabe destacar que, a pesar de la notoria disminución de la concentración de Mcl-1 a tiempos cortos en las líneas MM1S y U266, la viabilidad celular se mantiene alta. Esto sugiere que la supervivencia de ambas líneas podría depender más de la proteína Bcl-X_L que de Mcl-1, lo que explicaría, asimismo, que las líneas MM1S y U266 hayan presentado mayor sinergia con el inhibidor de Bcl-X_L que con el inhibidor de Mcl-1.

En cuanto a las proteínas proapoptóticas, la sensibilidad de la técnica empleada no permitió estudiar la expresión de Noxa por lo que solo se obtuvieron datos de Bim y Puma. Los resultados de los experimentos parecen indicar que Bim tiene una mayor implicación en la apoptosis en las células MM1S mientras que, en U266, la proteína proapoptótica más importante en el inicio de la muerte celular sería Puma.

Con respecto a la línea RPMI8226, sería necesario repetir los experimentos del Western Blotting ya que los resultados obtenidos no permiten sacar conclusiones razonadas sobre el efecto que tiene el dinaciclib en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2.

En estudios futuros, sería interesante analizar cómo afecta la combinación de dinaciclib y miméticos de BH3 a la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. Especialmente, sería conveniente probar la sinergia de dinaciclib e inhibidores de Mcl-1 ya que esta última se trata de la proteína antiapoptótica que parece tener mayor implicación en la apoptosis inducida por dinaciclib. Sin embargo, también podría estudiarse la combinación de dinaciclib con inhibidores de Bcl-X_L, Bcl-2 o incluso de Bim, Puma y Noxa.

5. CONCLUSIONES

- El dinaciclib, así como su combinación con miméticos de BH3 que inhiben Bcl-X_L (A-1155463) o Mcl-1 (A-1210477 y S-63845), induce muerte por apoptosis en las líneas de mieloma múltiple humano MM1S, U266 y RPMI8226.
- En las líneas MM1S, U266 y RPMI8226, la combinación de dinaciclib con el inhibidor de Bcl-X_L presenta mayor efecto sinérgico que la combinación con los inhibidores de Mcl-1, lo que indica que, en estas líneas celulares, la proteína antiapoptótica Bcl-X_L posee un papel más importante en la evasión de la apoptosis que Mcl-1.
- El dinaciclib provoca el arresto del ciclo celular en la fase G₂/M en MM1S y U266. En la línea RPMI8226, el arresto del ciclo se produce en la fase G₂/M, a baja concentración del dinaciclib, y en la fase S a altas concentraciones del fármaco.

- El dinaciclib reduce los niveles de expresión de Bcl-X_L, Bcl-2 y, especialmente, Mcl-1 en MM1S y U266. La concentración de Mcl-1 se empieza a recuperar a tiempos largos de exposición al dinaciclib, cosa que no ocurre con Bcl-X_L, Bcl-2.
- La proteína proapoptótica con mayor implicación en la muerte celular inducida por dinaciclib en MM1S es Bim, mientras que en U266 es Puma.
- En las líneas MM1S y U266, el mecanismo de muerte celular inducido por dinaciclib se basa en la reducción de la expresión de Mcl-1 consecuencia de la inhibición de CDK9. Las células U266 son más resistentes a este fármaco ya que necesitan tener inhibida tanto Bcl-X_L como Mcl-1 para que se produzca mayor aumento de muerte celular.

5. CONCLUSIONS

- Dinaciclib, alone as well as combined with BH3-mimetics that inhibit Bcl-X_L (A-1155463) or Mcl-1 (A-1210477 y S-63845), promotes apoptotic cell death in MM1S, U266 y RPMI8226 human multiple myeloma cell lines.
- The combination of dinaciclib and the inhibitor of Bcl-X_L has shown more synergy than the combination of dinaciclib and the inhibitor of Mcl-1. This suggests that the anti-apoptotic protein Bcl-X_L has a more relevant role in apoptosis breakout than Mcl-1 in MM1S, U266 and RPMI8226 cell lines.
- Dinaciclib induces MM1S and U266 cell cycle arrest in G₂/M phase. As far as RPMI8226 is concerned, whereas at low concentration dinaciclib elicits cell cycle arrest in G₂/M phase, at high concentration of the drug the cell cycle arrest comes about S-phase.
- Dinaciclib cuts down Bcl-X_L, Bcl-2 and specially Mcl-1 expression in MM1S and U266 cell lines. Whereas at longer incubation periods Mcl-1 expression recovers partially, this effect is not observed in Bcl-X_L and Bcl-2 proteins level.
- Bim is the anti-apoptotic protein with a more relevant role in dinaciclib-induced cell death in MM1S whereas in U266 cell line it is Puma the one that has a key role.
- In MM1S and U266 cell lines, dinaciclib-induced cell death is based on the decrease of Mcl-1 protein level due to the CDK9 inhibition. The U266 cells are more resistant to dinaciclib treatment since this cell line must have inhibited Bcl-X_L and Mcl-1 to show an increased of drug-induced cell death.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rollig, C., S. Knop, and M. Bornhauser, *Multiple myeloma*. Lancet, 2015. **385**(9983): p. 2197-208.
2. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2210-21.
3. Romano, A., C. Conticello, and M. Cavalli, *Salvage therapy of multiple myeloma: the new generation drugs*. 2014. **2014**: p. 456037.

4. Rajan, A.M. and S. Kumar, *New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma*. 2016. **6**(7): p. e451.
5. Naymagon, L. and M. Abdul-Hay, *Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future*. 2016. **9**(1): p. 52.
6. Malumbres, M., *Cyclin-dependent kinases*. Genome Biol, 2014. **15**(6): p. 122.
7. Kumar, S.K., et al., *Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma*. Blood, 2015. **125**(3): p. 443-8.
8. Hossain, D.M.S., et al., *Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression*. J Clin Invest, 2018. **128**(2): p. 644-654.
9. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*. Seventh ed. 2016, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.
10. Portt, L., et al., *Anti-apoptosis and cell survival: a review*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(1): p. 238-59.
11. Luna-Vargas, M.P. and J.E. Chipuk, *The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane*. Febs j, 2016. **283**(14): p. 2676-89.
12. Vela, L. and I. Marzo, *Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside*. Curr Opin Pharmacol, 2015. **23**: p. 74-81.
13. Shamas-Din, A., et al., *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(4): p. a008714.
14. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
15. Elkholi, R., K.V. Floros, and J.E. Chipuk, *The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment*. Genes Cancer, 2011. **2**(5): p. 523-37.
16. Opydo-Chanek, M., O. Gonzalo, and I. Marzo, *Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects*. Biochem Pharmacol, 2017. **136**: p. 12-23.
17. Sarosiek, K.A. and A. Letai, *Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise*. Febs j, 2016. **283**(19): p. 3523-3533.
18. Campos, E., *Proteins involved in apoptosis induced by the Cdk inhibitor dinaciclib in human myeloma cells*. 2017, Trabajo Fin de Grado. Facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza.
19. De Benito, Á., *Estudio de la muerte inducida por el inhibidor de CDKs Dinaciclib en células de mieloma múltiple*. 2016, Trabajo Fin de Grado. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza.
20. ATCC. *MM.1S (ATCC® CRL-2974™)*. 2018 [cited 2018 06/05/2018]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Blood/CRL-2974.aspx?geo_country=es.
21. ATCC. *U266B1 [U266] (ATCC® TIB-196™)*. 2018 [cited 2018 06/05/2018]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-196.aspx?geo_country=es.
22. ATCC. *RPMI 8226 (ATCC® CCL-155™)*. 2018 [cited 2018 06/05/2018]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-155.aspx?geo_country=es.
23. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.

24. Gong, J.N., T. Khong, and D. Segal, *Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1*. 2016. **128**(14): p. 1834-1844.
25. Powell, J.A., A.C. Lewis, and S.M. Pitson, *The MCL-1 inhibitor S63845: an exciting new addition to the armoury of anti-cancer agents*. Journal of Xiangya Medicine, 2017. **2**(6).
26. Kotschy, A., et al., *The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models*. Nature, 2016. **538**(7626): p. 477-482.
27. Alagpulinsa, D.A., et al., *A Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Dinaciclib, Impairs Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to PARP Inhibition*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(2): p. 241-50.
28. Desai, B.M., et al., *The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59588.
29. Jane, E.P., et al., *Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Promotes Proteasomal Degradation of Mcl-1 and Enhances ABT-737-Mediated Cell Death in Malignant Human Glioma Cell Lines*. J Pharmacol Exp Ther, 2016. **356**(2): p. 354-65.
30. Varadarajan, S., et al., *Maritoclastax and dinaciclib inhibit MCL-1 activity and induce apoptosis in both a MCL-1-dependent and -independent manner*. Oncotarget, 2015. **6**(14): p. 12668-81.
31. Wang, M., et al., *Silence of MCL-1 upstream signaling by shRNA abrogates multiple myeloma growth*. Exp Hematol Oncol, 2014. **3**(1): p. 27.
32. Gregory, G.P., et al., *CDK9 inhibition by dinaciclib potently suppresses Mcl-1 to induce durable apoptotic responses in aggressive MYC-driven B-cell lymphoma in vivo*. Leukemia, 2015. **29**(6): p. 1437-41.
33. Boohar, R.N., et al., *MCL1 and BCL-xL levels in solid tumors are predictive of dinaciclib-induced apoptosis*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108371.
34. De Bruyne, E., et al., *IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms*. Blood, 2010. **115**(12): p. 2430-40.
35. Fu, W., et al., *The cyclin-dependent kinase inhibitor SCH 727965 (dinaciclib) induces the apoptosis of osteosarcoma cells*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 1018-27.
36. Zhang, L.N., J.Y. Li, and W. Xu, *A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Gene Therapy, 2012. **20**: p. 1.