



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad** Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

**Efecto de Selinexor y Panobinostat sobre los niveles de  
PD-L1 en células de mieloma múltiple**

**Effect of Selinexor and Panobinostat on PD-L1 levels in  
multiple myeloma cells**

Autor

**Andrea Martínez Jiménez**

Director/es

**Isabel Marzo Rubio**

**Manuel Beltrán Visiedo**

Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre

Curso 2021-2022 – Grado en Biotecnología

## Agradecimientos

Me gustaría transmitir mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado durante este proyecto.

En primer lugar, a mis directores, la Dr. Isabel Marzo, gracias por darme la oportunidad de trabajar en este grupo, guiarme y aconsejarme en todo momento y, a Manuel Beltrán, por enseñarme durante todo este año, la ayuda, el apoyo y sus ánimos, pero sobre todo por su eterna paciencia con cada uno de los experimentos; de corazón, gracias, sin ti no lo habría conseguido.

También me gustaría agradecer a Laura, su interés y esfuerzo durante los meses en los que Manu estuvo lejos, por su apoyo y cercanía desde el primer momento.

A todos los compañeros del grupo, gracias por ayudarme con todas mis dudas y resolver mis preguntas, suerte de haber compartido tiempo con vosotros.

Por último, a mi familia por su apoyo incondicional y a mis amigos, porque aunque saben que no se me da muy bien “abrirme” siempre han creído y confiado en mí. Os quiero.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	1
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3.1 Mieloma múltiple</b> .....	2
<b>3.1.1. Células plasmáticas (PCs)</b> .....	2
<b>3.1.2. Estadios de la enfermedad</b> .....	3
<b>3.2 Tratamientos actuales</b> .....	4
<b>3.2.1. Selinexor</b> .....	4
<b>3.2.2. Panobinostat</b> .....	5
<b>3.3 Checkpoints o puntos de control inmunitario</b> .....	6
<b>3.3.1. Eje PD-1/PD-L1</b> .....	7
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>5.1 Cultivos celulares</b> .....	8
<b>5.1.1. Líneas celulares</b> .....	8
<b>5.1.2. Materiales y medios de cultivo celular</b> .....	9
<b>5.1.3. Mantenimiento de los cultivos</b> .....	9
<b>5.1.4. Evaluación de la densidad y viabilidad celular</b> .....	10
<b>5.2 Análisis de la apoptosis celular por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V-FITC/7-AAD</b> .....	10
<b>5.3 Análisis del ciclo celular de la línea U266 por citometría de flujo</b> .....	11

5.4	Análisis de la expresión de PD-L1 por citometría de flujo.....	12
5.5	Análisis estadístico.....	13
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
6.1	Análisis de la apoptosis inducida por el fármaco Selinexor .....	13
6.2	Análisis de la apoptosis inducida por el fármaco Panobinostat .....	14
6.3	Análisis del efecto de Selinexor en el ciclo celular .....	17
6.4	Efecto de Selinexor y Panobinostat sobre los niveles de PD-L1.....	18
7.	CONCLUSIONES .....	22
8.	CONCLUSIONS.....	22
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	23
10.	ANEXOS .....	26

## 1. RESUMEN

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia hematológica maligna caracterizada por la presencia de células plasmáticas (PCs) clonales anormales en la médula ósea, con potencial de crecimiento incontrolado y, que además secretan una inmunoglobulina monoclonal cuya acumulación provoca una disfunción orgánica, causando lesiones óseas, lesión renal, anemia e hipercalcemia. A pesar de las numerosas investigaciones y los avances realizados en la terapia frente a la patología, sigue siendo una enfermedad incurable. Como posible terapia frente a esta enfermedad, se ha propuesto el bloqueo del eje PD-1/PD-L1; sin embargo, los datos discordantes de la literatura sobre la expresión del mismo y las toxicidades relacionadas hacen que se necesiten investigaciones adicionales para optimizar el potencial terapéutico de esta clase de inmunoterapia.

En el presente Trabajo Fin de Grado, se aborda el análisis de la expresión de PD-L1 en cuatro líneas de MM tras la administración de diferentes concentraciones de los fármacos Selinexor y Panobinostat; con el objetivo de, en un futuro, emplearlos como estrategia terapéutica de combinación frente al MM. Para ello, se ha comprobado la capacidad de Selinexor y Panobinostat de inducir muerte celular de manera dosis-dependiente en cuatro líneas de MM y posterior análisis de la expresión superficial de PD-L1 en la membrana plasmática de dichas células.

En los resultados, se pudo comprobar que las dosis de los fármacos provocaron un aumento de la muerte celular en todas las líneas. También se observó que los patrones de expresión de la proteína PD-L1 no seguían una tendencia uniforme en las cuatro líneas celulares; sin embargo, las dosis de Selinexor y Panobinostat empleadas, todas ellas indujeron un aumento de la expresión; lo que podría conllevar la evasión de la vigilancia inmune sobre las células cancerosas en presencia de dichos fármacos.

## 2. ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a malignant hematological neoplasm characterized by the presence of abnormal clonal plasma cells (PCs) in the bone marrow, with uncontrolled growth potential and, which also secrete a monoclonal immunoglobulin whose accumulation causes organ dysfunction, causing bone lesions, kidney injury, anemia and hypercalcemia. Despite numerous investigations and the advances made in therapy against the pathology, it remains incurable. The blockade of PD-1/PD-L1 axis has been proposed as a possible therapy against this disease; however, conflicting data from the literature on cell surface expression and related toxicities make additional research necessary to optimize the therapeutic potential of this class of immunotherapy.

In this Final Degree Project, the analysis of the expression of PD-L1 in four lines of MM after the administration of different concentrations of the drugs Selinexor and Panobinostat is addressed; with the aim of, in the future, using them as a therapeutic combination strategy against MM. To do this, the ability of Selinexor and Panobinostat to induce cell death in a dose-dependent manner in four MM lines has been verified and subsequent analysis of the superficial expression of PD-L1 in the plasma membrane of these cells.

In the results, it was possible to verify that the doses of the drugs caused an increase in cell death in all the lines. It was also observed that the expression patterns of the PD-L1 protein did not follow a uniform trend in the four cell lines; however, all Selinexor and Panobinostat doses tested induced increased PD-L1 levels, which could explain the evasion of immune surveillance on cancer cells.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1 Mieloma múltiple

El **mieloma múltiple (MM)** es una neoplasia hematológica maligna caracterizada por la presencia de células plasmáticas (PCs) clonales anormales en la médula ósea, con potencial de crecimiento incontrolado y causantes de lesiones óseas destructivas, lesión renal, anemia e hipercalcemia entre otras [1].

La enfermedad representa entre el 1% y el 1.8% de todos los tipos de cáncer [2] y el 10% de todas las neoplasias hematológicas malignas, siendo el **segundo cáncer hematológico más frecuente**, después del linfoma no-Hodgkin [3]; con una incidencia estimada en Europa de 4.5-6 casos por cada 100.000 habitantes al año [2]. En 2020 se diagnosticaron 50.918 nuevos casos y fueron reportadas 32.495 muertes en Europa (según los datos publicados por la International Agency for Research on Cancer (IARC) [Cancer Today \(iarc.fr\)](https://gco.iarc.fr/)).

Se desconocen con exactitud los factores etiológicos desencadenantes de la enfermedad, debido, en parte, a la **heterogeneidad** de la misma [3]. Pese a todo, la exposición a radiaciones o determinadas sustancias químicas (disolventes orgánicos, pesticidas...), obesidad y un sistema inmunológico debilitado, se han propuesto como potenciales causas de la enfermedad [4]. Adicionalmente, no se ha detectado ningún factor hereditario que contribuya a su aparición; sin embargo, ciertas mutaciones específicas se han identificado como factores de riesgo genético [4]. La enfermedad ocurre con mayor frecuencia en personas mayores de 65 años [1] y también es más común en hombres que en mujeres [4].

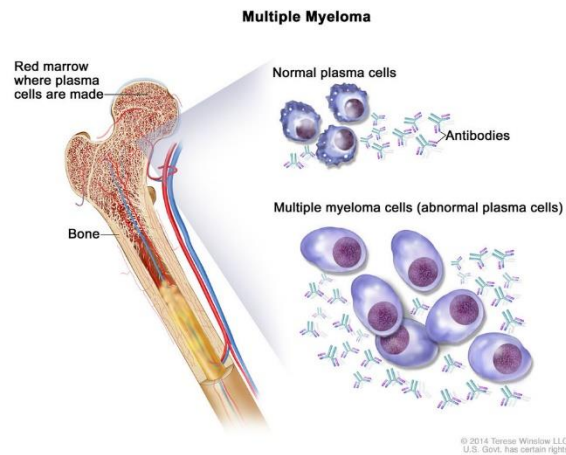
Aunque los avances terapéuticos realizados en los últimos años han llevado a mejores resultados y a un aumento de la supervivencia de 2-3 años hasta los 10 desde el diagnóstico de la enfermedad [5], el MM sigue siendo una **enfermedad incurable** [3], en la que muchos pacientes recaen debido en parte a las alteraciones genéticas así como a la presión del microambiente inmunosupresor de la médula ósea [5].

#### 3.1.1. Células plasmáticas (PCs)

Cuando las células B responden a una infección, maduran y se convierten en células plasmáticas. Las **células plasmáticas (PCs) normales** se encuentran en la médula ósea y son una parte importante del sistema inmunológico y, ante una infección, producen anticuerpos para ayudar a combatirla [6].

Además de las células plasmáticas (PCs), la médula ósea normal también alberga otras células sanguíneas como los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas [7].

El **MM** se caracteriza por la infiltración y crecimiento anómalo de PCs monoclonales en la médula ósea (copias de la misma PC); que además secretan una **inmunoglobulina monoclonal** (también llamada proteína M) que se puede encontrar en la sangre y/o la orina (**Figura 1**). La acumulación de estas inmunoglobulinas provoca una disfunción orgánica, generalmente conocida como C-R-A-B (hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas) [5], [6].



**Figura 1. Nicho biológico de las PCs.** Al igual que ocurre con las PCs normales, las PCs aberrantes (responsables del MM) se localizan en la médula ósea. Debido a su proliferación incontrolada acaban desplazando a otros tipos celulares cuya localización natural, en una situación no patológica, incluye, o es, la médula ósea. Imagen adaptada de "Myeloma CDC" por © 2014 Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights: <https://www.cdc.gov/cancer/myeloma/index.htm> [7]

A medida que las células cancerígenas se multiplican, hay un menor espacio en la médula ósea para el desarrollo de células sanguíneas normales, lo que resulta en una disminución del número de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas [8], esto provoca anemia y un mayor riesgo de infección [8]. La enfermedad también interfiere con los mecanismos de remodelación ósea, causando lesiones óseas que provocan un dolor óseo intenso y está asociado al aumento de los niveles de calcio en sangre (hipercalcemia) [6].

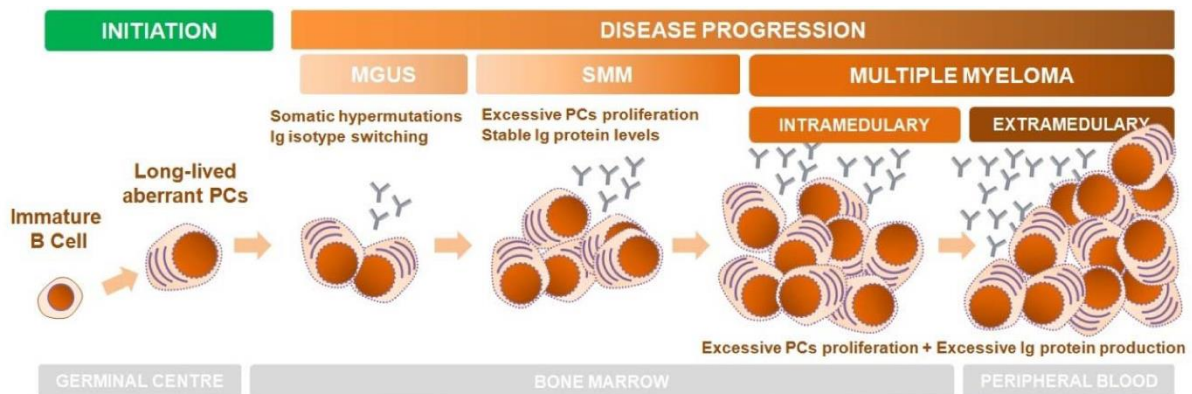
### 3.1.2. Estadios de la enfermedad

El MM es la etapa final de una transformación neoplásica de múltiples pasos. En la mayoría de los pacientes, el MM comienza con el estadio denominado **gammapatía monoclonal de significado incierto (por sus siglas en inglés MGUS)**. Esta etapa es una condición benigna, en la que una célula plasmática puede acumular varias mutaciones genéticas que afectan a la expresión de genes clave, otorgando una ventaja proliferativa a estas células mutadas; sin embargo, esta etapa se caracteriza por presentar una baja tasa de proliferación de PCs, baja carga de inmunoglobulina y sin síntomas relacionados claros [5]. Solo el 20% de los pacientes con MGUS progresan a mieloma activo [9].

Algunos pacientes evolucionan a otro estadio asintomático de la enfermedad denominado **mieloma múltiple latente (según sus siglas en inglés SMM)**; se trata de una etapa intermedia entre el MGUS y el mieloma activo [9]. A pesar de ser un estadio asintomático, las PCs hiperproliferativas acumulan mutaciones genéticas adicionales que agravan el fenotipo aberrante, lo que conlleva a un mayor porcentaje de células plasmáticas anormales en la médula ósea y, en consecuencia, a la secreción de niveles más altos de proteína monoclonal hacia el torrente sanguíneo [5].

Finalmente, la manifestación clínica de síntomas graves (como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones óseas) definen al estadio propio del **MM**. Si las células mielomatosas adquieren capacidad de extravasación el MM puede progresar a un último estadio (con peor pronóstico) denominado **leucemia de células plasmáticas (por sus siglas en inglés PCL)** en el que se pueden encontrar altos niveles de PCs malignas circulando en sangre periférica. Además, estas PCs

aberrantes son capaces de crecer en regiones extramedulares (p.j. piel o líquido pleural) ocasionando la aparición de tumores secundarios denominados plasmocitomas [5].



**Figura 2. Desarrollo del MM.** El desarrollo del MM es un proceso dividido en varias etapas: generalmente comienza siendo una condición benigna (p.j. MGUS) que posteriormente progresa hacia estadios con peor pronóstico (p.j. PCL). Imagen adaptada de Pinto, V. et al. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 407, vol. 12, no. 2, p. 407, Feb. 2020 [5].

### 3.2 Tratamientos actuales

Hoy en día el **objetivo principal** de los tratamientos empleados en pacientes con MM es **incrementar la supervivencia y calidad de vida** mediante la reducción del número de PCs malignas en la médula ósea [1]; sin embargo, ninguno de ellos permite una cura definitiva y las recaídas son habituales [3].

Hasta ahora, los avances más significativos en la terapia del MM han sido la introducción de **fármacos inhibidores del proteasoma (PIs)**, **agentes inmunomoduladores (IMiDs)**, **anticuerpos monoclonales (mAbs)** y el **trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (ASCT)**; que han permitido mejorar la supervivencia del paciente hasta 10 años. A pesar de los excelentes resultados alcanzados, en última instancia ciertos pacientes se vuelven resistentes a estos medicamentos y se produce una recaída de la enfermedad [1].

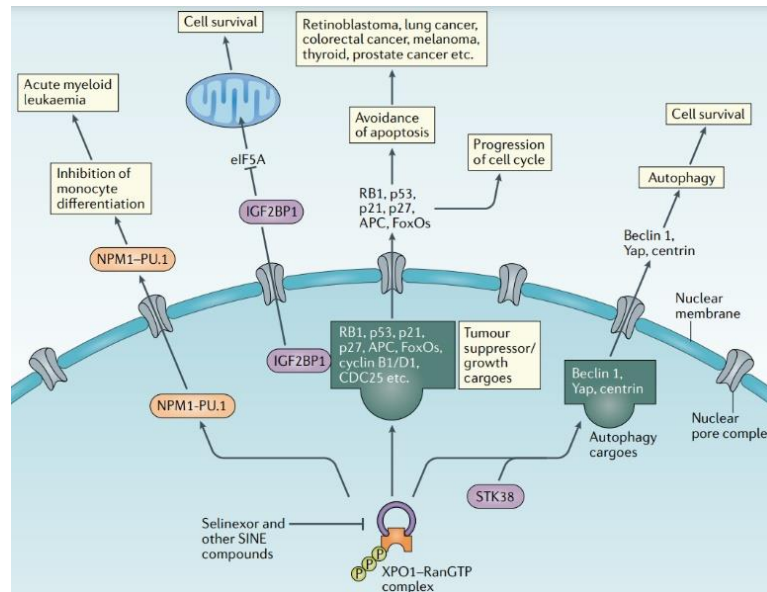
Por ello este tipo de pacientes con **mieloma recidivante/refractario (RRMM)** son tratados con fármacos de reciente introducción como el **Selinexor o Panobinostat**, los cuales son objeto de estudio en el presente trabajo Fin de Grado.

Además de este tipo de fármacos, la **terapia de células CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell)** ha sido aprobada para el tratamiento del mieloma múltiple recidivante y nuevos derivados de fármacos inmunomoduladores, conocidos como moduladores de la ligasa cereblón E3 (CELMoDs), han sido probados en estudios de fase temprana para RRMM [1].

#### 3.2.1. Selinexor

**Selinexor**, es un **agente inhibidor selectivo de exportación nuclear (SINE)** que bloquea la **exportina 1 (XPO1) (Figura 3)**, una proteína nuclear crítica para la exportación de las proteínas supresoras de tumores (TSPs) y los mRNA de oncoproteínas unidos al factor eIF4E [10]. Fue aprobado por la FDA en 2019 en combinación con dexametasona y se emplea como quinta línea de tratamiento en pacientes con MM [11].





**Figura 3. Exportación nuclear mediada por XPO1.** La principal función de la exportina 1 es el mantenimiento de la homeostasis celular mediante el transporte de proteínas y RNAs nucleares al citoplasma. Su sobreexpresión juega un papel importante en diversos tipos de cánceres hematológicos (p. MM) y, está asociada con resistencias a varias terapias por lo que su inhibición mediante el uso de fármacos SINE (p. Selinexor) se ha propuesto como una estrategia prometedora para nuevas terapias contra el cáncer. Imagen adaptada de A. S. Azmi. et al. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020 18:3, vol. 18, no. 3, pp. 152–169, Nov. 2020 [11].

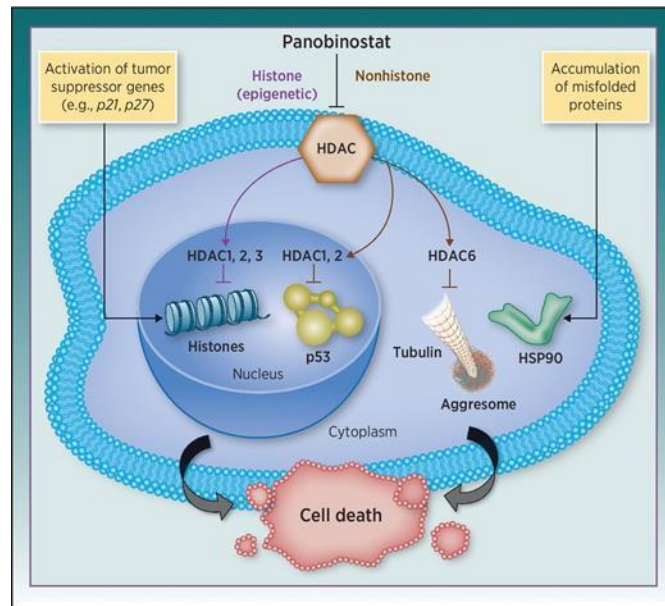
XPO1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, incluido el MM, lo que resulta en un mayor transporte de TSPs fuera del núcleo. Permite la evasión de la vigilancia inmune por parte de las células cancerosas, el escape de la regulación del ciclo celular mediada por TSPs y la evasión de la apoptosis [5, 10], lo que correlaciona a su vez con un peor pronóstico de los pacientes y su resistencia a la terapia tradicional. Mediante el **bloqueo de XPO1**, se produce la **retención nuclear y la activación de TSPs**, causando la muerte de las células cancerosas. Datos preclínicos demuestran que Selinexor en combinación con dexametasona, reactiva múltiples TSPs, inhibe la actividad del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), reduce los niveles de c-Myc y reactiva la señalización del receptor de glucocorticoides provocando la muerte de células tumorales [10]. Adicionalmente, se ha demostrado que la combinación de Selinexor con carfilzomib (un fármaco inhibidor del proteasoma habitualmente utilizado en clínica) tiene un efecto sinérgico en modelos preclínicos *ex vivo* provocando la entrada en apoptosis de las células tumorales [10].

### 3.2.2. Panobinostat

**Panobinostat** es un **fármaco inhibidor de histona desacetilasas (HDACs) (Figura 4)**. Su uso fue aprobado en combinación con bortezomib (un PI) y dexametasona (un corticosteroide) en pacientes con **RRMM** ya que los ensayos clínicos demostraron que mejoraba significativamente la supervivencia de los pacientes [12]; sin embargo, recientemente, su aprobación de uso ha sido retirada por la FDA (Food and Drug Administration) al no poderse completar los estudios clínicos requeridos [13].

Las **histona desacetilasas (HDACs)** son enzimas encargadas de regular la acetilación de proteínas involucradas en diversos procesos biológicos, incluida la replicación y reparación del DNA, la remodelación de la cromatina, la progresión del ciclo celular, la degradación de proteínas etc. Además

diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de estas enzimas en pacientes con MM se asocia a un mal pronóstico de la enfermedad [12].



**Figura 4. Inhibición de HDACs por el fármaco Panobinostat.** Es un fármaco inhibidor de histona deacetilasas (HDACs); aprobado para el tratamiento del RRMM. Provoca alteración de la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos. Además es capaz de inhibir la degradación de proteínas. Imagen adaptada de J. P. Laubach. et al. *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 21, pp. 4767–4773, Nov. 2015 [12].

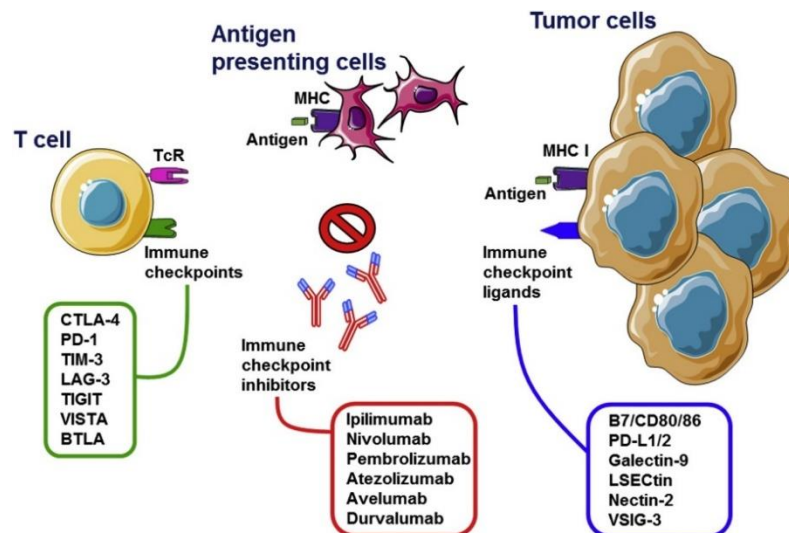
**Panobinostat**, actúa **modulando la expresión génica** a través de mecanismos epigenéticos (reactivación de genes supresores de tumores silenciados epigenéticamente) e **inhibe la degradación de proteínas**, lo que ocasiona un estrés importante en la célula mielomatosa. Todo ello deriva en un potente efecto antitumoral [12].

### 3.3 Checkpoints o puntos de control inmunitario

La **activación de los linfocitos T** a través de la señalización TCR, la coestimulación CD28 y la acción de IL-2 es esencial en el proceso de inmunidad [14]. Una vez activados, los linfocitos T eliminarán las amenazas, sin embargo, una activación descontrolada puede provocar graves consecuencias, como enfermedades autoinmunes. Por ello, es esencial la interacción entre los puntos de control inmunitario y sus ligandos para **mantener la homeostasis inmunitaria** [14].

Los **puntos de control inmunitario** son moléculas de membrana específicas ubicadas predominantemente, pero no exclusivamente, en los linfocitos T, que previenen una reacción exacerbada del sistema inmunitario, evitan el daño de tejidos sanos y mantienen la homeostasis inmunitaria [14, 15].

Desafortunadamente, las **células tumorales** comúnmente **expresan (o sobreexpresan) los ligandos** de los puntos de control inmunitarios (**Figura 5**), suprimiendo las funciones efectoras de los linfocitos T y **evadiendo la vigilancia inmunitaria** [14]. Debido a esto, los inhibidores de puntos de control inmunitario o de sus ligandos (localizados en las células tumorales) se encuentran entre los enfoques terapéuticos más prometedores para activar la inmunidad antitumoral y, por tanto, combatir el cáncer con el propio sistema inmunitario del paciente [16].



**Figura 5. Visión general de las interacciones entre los puntos de control inmunitarios y sus ligandos y, la intervención terapéutica a través de inhibidores de los puntos de control inmunitario.** Los puntos de control inmunitarios se expresan en células T activadas y, la interacción con sus ligandos en las células tumorales conduce a la inactivación de las células T, lo que impide la muerte de las células tumorales por las células T citotóxicas. Para evitar esto, se han desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de inhibir estas interacciones garantizando la activación sostenida de las células T y respuestas antitumorales efectivas. Imagen adaptada de S. M. Toor. et al. *Seminars in Cancer Biology*, vol. 65, pp. 1–12, Oct. 2020 [16].

Hasta el momento la mayor parte de las investigaciones se han centrado en bloquear la interacción entre el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (**CTLA-4**) y su ligando CD80/86 así como entre la proteína de muerte programada 1 (**PD-1**) y su ligando correspondiente, PD-L1. Ambas estrategias han mostrado resultados efectivos y prometedores como agentes bloqueantes de la unión entre los puntos de control y sus ligandos. No obstante, existen otros puntos de control (TIM-3, LAG-3, VISTA, IDO1, BTLA) también prometedores y cuyo interés terapéutico requiere de estudios más avanzados [14].

### 3.3.1. Eje PD-1/PD-L1

La **proteína de muerte celular programada-1 (PD-1)** es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas [14] cuya expresión se induce cuando los linfocitos T se activan. La **unión de PD-1** a su **ligando PD-L1** en las células tumorales contrarresta la transducción y coestimulación de la señal TCR. Además, esta interacción conduce a una producción deteriorada de citoquinas pro-inflamatorias por parte del linfocito T, **detención del ciclo celular** y disminución de la transcripción de proteínas de supervivencia, lo que promueve el agotamiento de los linfocitos T, la apoptosis celular y conlleva a la **evasión de la inmunidad anti-tumoral** [16].

Los inhibidores del punto de control inmunitario, especialmente PD-1 y PD-L1 (como se ilustra en la **Figura 5**), han demostrado eficacia clínica contra muchas neoplasias malignas sólidas y hematológicas diferentes, revirtiendo la supresión de las células T y mejorando la inmunidad antitumoral endógena al desencadenar respuestas antitumorales en los pacientes [17]. Actualmente, tres inhibidores de PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) han sido aprobados por la FDA para varias neoplasias malignas [17] aunque hay otros inhibidores de PD-L1 en ensayos clínicos [17]. A pesar de la popularidad y la aprobación acelerada de la FDA de los inhibidores de PD-L1, su **eficacia clínica** sigue siendo **limitada** y se necesitan más consideraciones sobre mecanismos de resistencia, duración

del tratamiento, toxicidades relacionadas con el sistema inmunológico y umbral de expresión de PD-L1 para optimizar el potencial anticancerígeno en esta clase de inmunoterapia [17]. Es por ello, por lo que se han desarrollado terapias combinadas de bloqueo simultáneo de varios puntos de control o sus respectivos ligandos, resultando en una mejora de la eficacia de la inmunoterapia y en unos índices de supervivencia superiores [16]. Varios ensayos clínicos se han desarrollado para evaluar la eficacia de atezolizumab y durvalumab en monoterapia o en combinación con otros agentes terapéuticos, como los IMiD; sin embargo, ninguno de ellos se ha aprobado para el tratamiento del MM [18].

Por ello, el presente trabajo se centra en determinar la expresión de PD-L1 en cuatro líneas de MM tras la administración de diferentes concentraciones de los fármacos Selinexor y Panobinostat; con el objetivo de, en un futuro, utilizarlos como estrategia terapéutica de combinación frente al MM.

## 4. OBJETIVOS

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha planteado con el objetivo final de determinar el efecto de los fármacos Selinexor y Panobinostat sobre los niveles de PD-L1 en cuatro líneas celulares de MM. Para ello se han establecido los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la sensibilidad de varias líneas de MM a la acción del Selinexor y el Panobinostat.
2. Determinación de dosis sub-letales de Selinexor y Panobinostat en líneas de MM.
3. Análisis de la expresión de PD-L1 en la membrana de las diferentes líneas celulares.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivos celulares

#### 5.1.1. Líneas celulares

Se han empleado **cuatro líneas celulares** de MM en el presente Trabajo de Fin de Grado: **MM.1S**, **NCI-H929**, **U266** y **RPMI-8226**. Todas ellas se caracterizan por ser líneas que crecen en suspensión, a excepción de la línea celular MM.1S, una línea celular semi-adherente mixta (células en suspensión con células ligeramente adherentes).

- **MM.1S:** línea celular establecida a partir de la línea celular principal MM.1, la cual se estableció en 1986 a partir de sangre periférica de una paciente de 42 años con mieloma múltiple IgA $\lambda$ , que se había vuelto resistente a la terapia basada en esteroides. Se caracteriza por un ser un cultivo celular mixto (células en suspensión con algunas formando una monocapa ligeramente unida) y ser sensible a dexametasona (<https://www.atcc.org/products/crl-2974>, [https://www.ebi.ac.uk/ols/ontologies/efo/terms?short\\_form=EFO\\_0005724](https://www.ebi.ac.uk/ols/ontologies/efo/terms?short_form=EFO_0005724)).
- **NCI-H929 (denominadas H929 de aquí en adelante):** se trata de una línea celular establecida a partir del derrame pleural de una paciente de 62 años diagnosticada de MM. Se caracteriza por la secreción de grandes cantidades de IgA $\kappa$  (<https://www.atcc.org/products/crl-9068>).
- **U266:** es una línea celular de linfocitos B establecida a partir de sangre periférica de un paciente de 53 años con MM. Estas células se diferencian por producir IgE $\lambda$  e interleuquina-6 (IL-6) (<https://www.atcc.org/products/tib-196>).

- **RPMI-8226:** se trata de una línea celular de linfocitos B, establecida en 1966 a partir de sangre periférica de un paciente de 61 años diagnosticado de MM. Se caracteriza por producir y secretar únicamente la cadena ligera  $\lambda$  (pero no hay evidencia de producción de cadena pesada (citoplasmática o secretada)) (<https://www.atcc.org/products/crm-ccl-155>).

### 5.1.2. Materiales y medios de cultivo celular

Para el cultivo de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo (MM.1S, H929 y U266) se empleó el medio **RPMI 1640 GlutaMax™ (Gibco)** suplementado con un **10% en volumen de SFB** (SFB: *Serum Fetal Bovine*, Sigma) y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma). El medio RPMI 1640 GlutaMax™ una vez suplementado se denominó **medio completo**. Para la línea RPMI-8226 se empleó el medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% en volumen de SFB de complementado, y tampoco se añadió antibiótico; a este medio se le denominó **medio RPMI de complementado**. La de complementación del SFB empleado para suplementar el medio, se efectuó durante 30 min en un baño de agua termostaticado a 60°C.

El material empleado durante el desarrollo de este trabajo (frascos de cultivo, raspadores y placas de 24 o 48 pocillos) fueron estériles y procedían del proveedor TPP. Las puntas y los eppendorf también fueron esterilizados previo a su uso. Los tubos de fondo cónico de 15 y 50 mL así como las pipetas serológicas empleadas (5 y 10 mL) y, los tubos de citometría procedían de Corning. En el caso de los fármacos empleados, Selinexor (Selleckchem) y Panobinostat (MedChemExpress); fueron previamente reconstituidos con dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma) y, almacenados en el laboratorio en alícuotas de 10 mM en el caso de Selinexor y de 1 mM las de Panobinostat.

Todas las manipulaciones se realizaron en campanas de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P) y los cultivos se mantuvieron en un incubador termostaticado (Heraeus Heracell 150i, Thermo) a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y aire saturado de humedad.

Además, se emplearon las siguientes centrifugas:

- **SL 8 Small Benchtop Centrifuge Series (Thermo Scientific):** empleada para tubos de fondo cónico.
- **Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter):** empleada para centrifugar tubos de citometría (5 mL) a temperatura controlada.
- **Mini vibration shaker vortex mixer wincom Xh-d:** empleada para resuspender tubos eppendorf y tubos de citometría.

### 5.1.3. Mantenimiento de los cultivos

Las líneas celulares empleadas fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (TPP), dependiendo de la cantidad de células necesarias para cada experimento. Además, de manera periódica, se llevaron a cabo sucesivos subcultivos; con el objetivo de evitar la confluencia y por consiguiente detención del crecimiento que conllevaría a la muerte celular. Para ello, se determinaba la densidad celular (células  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) y viabilidad del cultivo (% células viables) como se indica en el siguiente apartado. Seguidamente se procedía, diluyendo las células en el medio RPMI-1640 correspondiente (en función del tipo celular) hasta una densidad mínima entre  $7 \cdot 10^4$  y  $1,5 \cdot 10^5$  células  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Adicionalmente, con el objetivo de comprobar el correcto estado de los diferentes cultivos, se observaba la morfología celular de los mismos mediante el empleo de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300).

#### 5.1.4. Evaluación de la densidad y viabilidad celular

La **densidad celular** (células · mL<sup>-1</sup>) y **viabilidad** (% de células viables) de los cultivos fueron determinadas rutinariamente mediante el uso de la **tinción por exclusión del azul de Trypan**. Para llevar a cabo dicha técnica, se mezclaron volúmenes iguales (50 µL) de la suspensión celular y azul de Trypan. Tras la mezcla de ambos, se dispuso parte de la disolución en una cámara de Neubauer y se procedió al conteo de las células empleando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i). El colorante empleado (azul de Trypan), penetra en el interior de las células no viables debido al daño en su membrana plasmática (ya que no está intacta), lo que permite visualizar estas células de color azul al microscopio óptico. Para el **cálculo de la densidad celular** se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad celular} = \frac{N^{\circ} \text{ Células Viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ cuadrantes contados}}$$

En dicha expresión, el **factor de dilución** es 2, debido a que 50 µL de la suspensión celular fue diluida en 50 µL de azul de Trypan; siendo el volumen final el doble del volumen de partida y el **factor 10<sup>4</sup>** corresponde con el volumen de la cámara de Neubauer.

La **viabilidad celular**, fue determinada empleando la siguiente ecuación:

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

## 5.2 Análisis de la apoptosis celular por citometría de flujo mediante marcaje con Anexina V-FITC/7-AAD

Para analizar el porcentaje de apoptosis inducida por los fármacos se empleó el **marcaje con Anexina V-FITC/7-AAD (7-AAD Viability Staining Solution (biolegend.com))**. La **anexina V** (la empleada en este trabajo fue conjugada con FITC según se describe en *Logue et al. (Nature Protocols 2009) [19]*), es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, con una alta afinidad por la **fosfatidilserina (PS)**. En las células viables, la PS se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana plasmática; sin embargo durante la apoptosis temprana, la membrana plasmática sufre una serie de cambios estructurales, y la PS es translocada a la cara externa de la membrana plasmática, mecanismo que favorece el reconocimiento y la fagocitosis celular por macrófagos. En base a este proceso, puede emplearse la Anexina V conjugada con diversos fluorocromos, como el FITC ( $\lambda_{\text{ex}}= 494$  nm,  $\lambda_{\text{em}}= 518$  nm), para la identificación específica de células apoptóticas. Sin embargo el marcaje únicamente con Anexina V no permite diferenciar entre células necróticas y apoptóticas, por ello se empleó de manera adicional el fluorocromo **7-AAD (7-aminoactinomicina)**, que se intercala entre las **bases del DNA** ( $\lambda_{\text{ex}}= 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}}= 647$  nm) de aquellas células cuya membrana está dañada (células en apoptosis tardía o células necróticas), ya que puede penetrar al interior celular; sin embargo es excluido de aquellas células cuya membrana está intacta.

Este **marcaje Anexina V/7-AAD**; permite discriminar entre células en **apoptosis temprana, apoptosis tardía o células necróticas**. Aquellas células que sufren apoptosis temprana, exponen la PS en la membrana plasmática externa, de manera que son marcadas únicamente por la Anexina V-FITC ya que su membrana aun es impermeable al 7-AAD; sin embargo, aquellas células que sufren apoptosis tardía o necrosis tienen dañada la membrana y el 7-AAD puede entrar al interior celular; de manera que las células necróticas son marcadas únicamente por el 7-AAD, pero las células que sufren apoptosis tardía son marcadas con ambos compuestos (Anexina V-FITC y 7-AAD).

Las **líneas celulares MM.1S, NCI-H929 y U266** se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de  $1,5 \cdot 10^5$  células·mL<sup>-1</sup> en 500 µL de medio completo RPMI 1640 y por duplicado. A diferencia de la línea celular **RPMI-8226**, la cual fue sembrada en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \cdot 10^5$  células·mL<sup>-1</sup> en 500 µL de medio de complementado.

Para el análisis de la **muerte celular** inducida por **Selinexor**, las células fueron tratadas durante 24 h (MM.1S y NCI-H929) o 48 h (U266 y RPMI-8226) con concentraciones crecientes (entre 31.25 y 1000 nM) de dicho fármaco.

Para el análisis de la **muerte celular** inducida por **Panobinostat**, las **cuatro líneas celulares** fueron tratadas e incubadas durante **48 h** con concentraciones crecientes del fármaco (entre 3.125 y 100 nM).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, se preparó una dilución de ABB 1x (ABB: *Annexin Binding Buffer*; Hepes/NaOH 10 nM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 nM) en agua Mili-Q estéril a partir de una solución de ABB 10x. Por cada pocillo, se preparó una solución con 50 µL ABB 1x, 1 µL de 7-AAD y 0.15 µL de Anexina V-FITC, se añadió y se dejaron incubar las muestras durante 15 minutos en la estufa, transcurrido el tiempo se recogieron las diferentes muestras en tubos de citometría y se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACScalibur™). Los resultados obtenidos fueron procesados y analizados con el soporte informático de los programas CellQuest pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 8.

Dicho protocolo fue adaptado de *V. Jarauta et al. Cancer Letters Nov. 2016 [20]*.

### 5.3 Análisis del ciclo celular de la línea U266 por citometría de flujo

La distribución de la **línea celular U266** en las distintas fases del ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo, gracias al **marcaje con yoduro de propidio (PI/RNASE Solution (immunostep.com))**. Esta sustancia es capaz de intercalarse en el DNA ( $\lambda_{ex} = 535$  nm,  $\lambda_{em} = 617$  nm); de manera que la medición de su intensidad de fluorescencia permite la resolución de las 3 fases principales del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). Dado que no penetra en las células vivas, también se suele emplear para identificar células muertas de una población.

Inicialmente, las células fueron sembradas en placas de 48 pocillos ( $1 \cdot 10^6$  células·mL<sup>-1</sup>), y fueron tratadas con dosis crecientes de Selinexor (0, 62.5 250 y 500 nM), las cuales se dejaron incubando durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se recogieron las células en tubos de fondo cónico de 15 mL. Se centrifugaron a 233 x g durante 5 min, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron con 3 mL de PBS cada tubo. Nuevamente, se centrifugaron durante 5 minutos a 233 x g, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µL de PBS que se pasaron a un eppendorf estéril. Tras un nuevo lavado, las células se fijaron con 1 mL de etanol al 70% añadido gota a gota y previamente enfriado. Para evitar la formación de agregados celulares, el etanol fue añadido paralelamente a la mezcla con vórtex. Tras la fijación, los eppendorf se almacenaron durante 24 h a -20°C y posteriormente se volvieron a lavar con 500 µL de PBS frío, y se centrifugaron a 233 x g, durante 10 minutos y a 4°C. Se decantó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 500 µL de la solución que contenía yoduro de propidio y RNasa (en PBS y azida de sodio al 0,09%, pH 7.2, Immunostep) y se incubaron a T<sup>a</sup> ambiente durante 20 minutos y en oscuridad. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo (FACScalibur™, BD Biosciences) y los datos obtenidos se analizaron con los programas informáticos CellQuest Pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 8.

#### 5.4 Análisis de la expresión de PD-L1 por citometría de flujo

Para analizar el efecto de los fármacos **Selinexor** y **Panobinostat** sobre los **niveles de PD-L1** en las cuatro líneas de MM, se empleó un marcaje con anticuerpos. En concreto, para cuantificar la expresión de PD-L1, se empleó el **anticuerpo anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody (clon 29E.2A3)** ([PE anti-human CD274 B7-H1, PD-L1 Antibody anti-CD274 - 29E.2A3 \(biolegend.com\)](#)) conjugado con ficoeritrina (PE) ( $\lambda_{ex}= 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}= 578 \text{ nm}$ ) de la casa comercial BioLegend. Como control de isotipo se empleó **Mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype Ctrl Antibody (clon MPC-11)** marcado con PE, también de BioLegend ([PE Mouse IgG2b, kappa Isotype Ctrl \(biolegend.com\)](#)).

Inicialmente se sembraron las diferentes líneas celulares en placas de 24 ó 48 pocillos a distintas densidades dependiendo de la línea celular (las líneas celulares U266, MM.1S y NCI-H929 se sembraron a una densidad de  $1,5 \cdot 10^5 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$  en placas de 48 pocillos y la línea celular RPMI-8226 fue sembrada a una densidad de  $1 \cdot 10^5 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$  en placas de 24 pocillos) en un total de 500  $\mu\text{L}$  por pocillo. Para el ensayo se emplearon diferentes condiciones en función del fármaco empleado y la línea celular a analizar, para alcanzar un porcentaje de muerte celular de aproximadamente un 30-40% con respecto al control.

Con el objetivo de observar el efecto del **Selinexor** y **Panobinostat** sobre el nivel de PD-L1 se emplearon **cinco pocillos** para cada línea celular (sembradas en sus placas correspondientes) y fármaco: el primero correspondiente a células no tratadas con fármaco ni marcadas con anticuerpos, un segundo pocillo control de isotipo (correspondiente a células sin tratar con fármaco, pero marcadas con el anticuerpo PE Mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype), un tercer pocillo control (células sin tratar con fármaco pero marcadas con el anticuerpo PE anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1)) y dos últimos pocillos con células tratadas con dos concentraciones de fármaco diferentes y marcadas con el anticuerpo PE anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1).

Cada línea celular fue tratada con diferentes concentraciones de **Selinexor** con el objetivo de alcanzar un porcentaje de muerte celular del 30-40% (la línea celular RPMI-8226 se trató con 62.5 y 125 nM, la línea MM.1S con 62.5 y 100 nM, la línea U266 con 500 y 1000 nM y finalmente la línea celular H929 fue tratada con 250 y 500 nM de Selinexor)

Para analizar el efecto del fármaco **Panobinostat** sobre los niveles de PD-L1, al igual que con Selinexor, cada línea celular fue tratada con diferentes concentraciones hasta alcanzar un porcentaje de muerte celular del 30-40% (la línea celular RPMI-8226 se trató con 6.25 y 12.5 nM, la línea MM.1S con 3.125 y 6.25 nM, la línea U266 con 6.25 y 12.5 nM y finalmente la línea celular H929 fue tratada con 12.5 y 20 nM de Panobinostat)

Transcurrido el tiempo de incubación de las diferentes líneas celulares, se trasvasó el contenido de los diferentes pocillos a tubos de citómetro previamente rotulados. Se centrifugaron durante 5 minutos a  $233 \times g$  y  $25^\circ\text{C}$ . A continuación, los pellets celulares fueron resuspendidos en una mezcla compuesta por 99.5  $\mu\text{L}$  de PBS + 5% SFB y 0.5  $\mu\text{L}$  del anticuerpo correspondiente e incubados durante 20 min a  $T^\circ$  ambiente, en oscuridad. En el caso del control sin marcar, el pellet fue resuspendido únicamente en PBS.

Transcurrido el tiempo de incubación, los diferentes tubos se centrifugaron durante 5 minutos a  $233 \times g$  y  $25^\circ\text{C}$ . Finalmente los pellets se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de PBS y se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACScalibur™). Los resultados obtenidos fueron procesados y analizados con el soporte informático de los programas CellQuest pro, FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 8.



Paralelamente al análisis de la expresión de PD-L1, también se determinó la muerte celular. Para ello se empleó el protocolo descrito en el **apartado 2.2** (marcaje con Anexina V-FITC y 7-AAD) de este mismo trabajo.

Dicho protocolo fue adaptado de C. Reina-Ortiz *et al.*, *Oncolmmunology*, vol. 10, no. 1, 2021 [21].

## 5.5 Análisis estadístico

El análisis, interpretación y representación de los resultados obtenidos en los experimentos del presente Trabajo Fin de Grado se realizó con el programa GraphPad Prism 8. Para ello, se llevó a cabo el análisis One-way ANOVA para el análisis de la expresión de PD-L1 y la prueba t de Student desapareada para el análisis de la muerte celular, en ambos se compararon las diferentes situaciones respecto a la situación control. El nivel de significancia  $\alpha$  se estableció en un valor de probabilidad inferior a 0,05; considerando los distintos grados de significancia como:

- ns si el p-valor es  $> 0,05$
- \* si el p-valor es  $< 0,05$
- \*\* si el p-valor es  $< 0,01$
- \*\*\* si el p-valor es  $< 0,001$

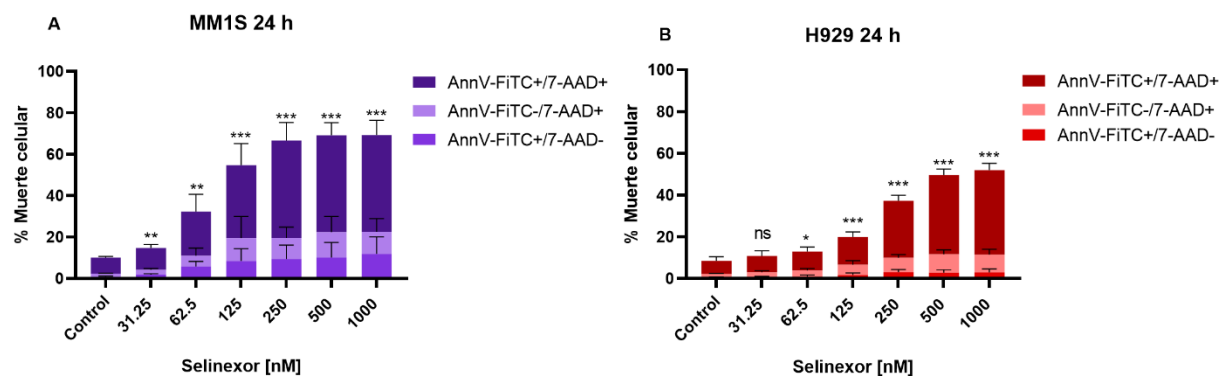
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

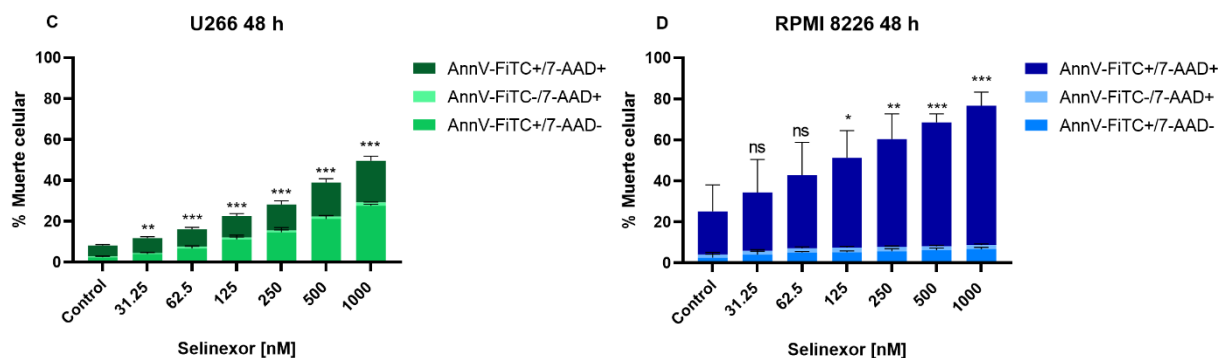
### 6.1 Análisis de la apoptosis inducida por el fármaco Selinexor

Las células de MM son capaces de escapar de la retención del ciclo celular mediada por TSPs y la apoptosis debido a la sobreexpresión de la exportina 1 (XPO1) [10]. Una manera de evitar esto, es mediante la inhibición de la exportación nuclear mediante fármacos; es por ello por lo que en el presente Trabajo Fin de Grado se estudia la **muerte celular inducida por Selinexor**.

El efecto de Selinexor en células de MM se estudió empleando las líneas celulares MM.1S y H929 a 24 h y las líneas U266 y RPMI-8226 a 48 h. Para ello, se llevó a cabo un **ensayo dosis-respuesta** mediante citometría de flujo. Todas las líneas celulares fueron incubadas a concentraciones crecientes de Selinexor (0-1000 nM).

Las cuatro líneas fueron evaluadas a diferentes tiempos, ya que en experimentos anteriores (resultados no publicados del Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre), se observó que las líneas celulares U266 y RPMI-8226, apenas eran sensibles al fármaco a 24 h; por ello se decidió aumentar el tiempo de incubación a 48 h, manteniendo los experimentos de las líneas MM.1S y H929 a 24 h.





**Figura 6. Evaluación del efecto de Selinexor sobre la viabilidad celular en líneas MM.** Las líneas fueron tratadas con concentraciones crecientes de Selinexor (0-1000 nM) durante 24 o 48 h, según se indica en cada caso, para evaluar la viabilidad celular por citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.2. En el eje Y, se indica el porcentaje de cada una de las siguientes poblaciones celulares: AnnV-FITC+/7-AAD+ (células en apoptosis tardía), AnnV-FITC-/7-AAD+ (células necróticas) y AnnV-FITC+/7-AAD- (células en apoptosis temprana). Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=2-3$  experimentos independientes realizados en las mismas condiciones. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control.

Tal y como se observa en la **Figura 6**, las diferentes líneas celulares varían en cuanto a la sensibilidad a Selinexor; también se puede ver esta diferencia en la **Figura 1 del Anexo**. La **Tabla 1** muestra los diferentes valores  $LD_{50}$  obtenidos para cada línea celular; siendo la línea MM.1S la más sensible ya que presenta una  $LD_{50}$  de 125 nM a 24 h, seguida de la línea H929 cuya  $LD_{50}$  a 24 h es de aproximadamente 1  $\mu$ M. La línea RPMI-8226 presenta una  $LD_{50}$  de 0.5  $\mu$ M a 48 h y, finalmente la línea U266 la más resistente de las cuatro ya que su  $LD_{50}$  a 48 es de 1  $\mu$ M aproximadamente.

**Tabla 1. Dosis Letal 50 de Selinexor sobre las líneas MM.** Concentración individual de Selinexor que provoca la muerte del 50% de la población celular.

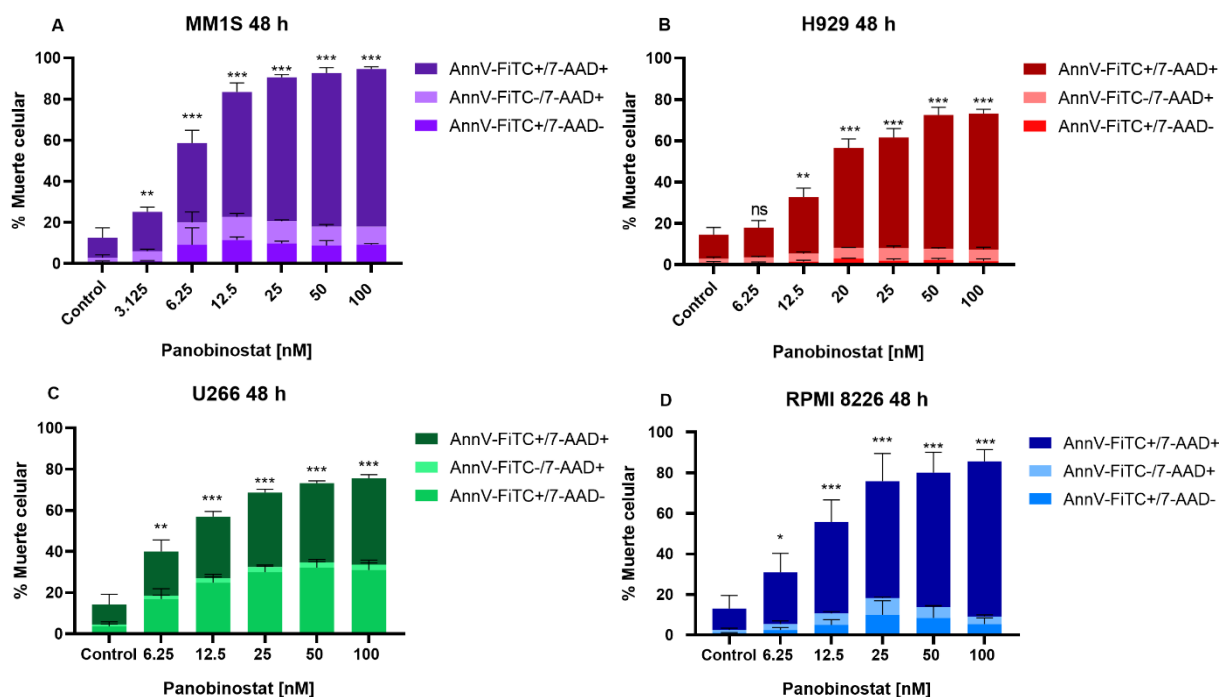
Línea Celular	$LD_{50}$ [nM] 24 h	Línea Celular	$LD_{50}$ [nM] 48 h
MM.1S	$\approx 125$	U266	$\approx 1000$
H929	$\approx 1000$	RPMI-8226	$\approx 500$

Asimismo, cabe destacar que las poblaciones de muerte celular se diferencian en función de la línea celular tratada. En la **línea MM.1S**, se detectan mayoritariamente células en apoptosis tardía, aunque la población de células necróticas y en apoptosis temprana son similares. La **línea H929** también sufre mayoritariamente apoptosis tardía y en menor porcentaje necrosis; sin embargo, apenas sufre apoptosis temprana. Cabe desatacar que en la **línea U266**, se detectó apoptosis temprana y tardía casi a partes iguales y, apenas se pudieron observar células necróticas. Finalmente, la **línea celular RPMI-8226** destaca por su sensibilidad al fármaco que provoca apoptosis tardía en un gran porcentaje de las células, y en menor medida necrosis y apoptosis temprana.

## 6.2 Análisis de la apoptosis inducida por el fármaco Panobinostat

El empleo de Panobinostat en células de MM permite modular la expresión génica e inhibir la degradación de ciertas proteínas [12]; lo que induce apoptosis en este tipo de células. Debido a esto, el presente Trabajo Fin de Grado estudia la **muerte celular inducida por Panobinostat**.

El efecto de Panobinostat en células de MM se estudió empleando las líneas celulares MM.1S, H929, U266 y RPMI-8226 a 48 h. Para ello, se llevó a cabo un **ensayo dosis-respuesta** mediante citometría de flujo. Todas las líneas celulares fueron incubadas a concentraciones crecientes de Panobinostat (0-100 nM). Las cuatro líneas fueron evaluadas a 48 h, tras comprobar en experimentos anteriores que la eficacia del fármaco a 24 h era prácticamente nula en las diferentes líneas celulares (resultados no publicados del Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre).



**Figura 7. Evaluación del efecto de Panobinostat sobre la viabilidad celular en líneas MM.** Las líneas fueron tratadas con concentraciones crecientes de Panobinostat (0-100 nM) durante 48 h, para evaluar la viabilidad celular por citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.2. En el eje Y, se indica el porcentaje de cada una de las siguientes poblaciones celulares: AnnV-FITC+/7-AAD+ (células en apoptosis tardía), AnnV-FITC-/7-AAD+ (células necróticas) y AnnV-FITC+/7-AAD- (células en apoptosis temprana). Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=2-3$  experimentos independientes realizados en las mismas condiciones. El análisis estadístico se realizó respecto a la situación control.

Tal y como se observa en la **Figura 7**, las diferentes líneas celulares varían en cuanto a la sensibilidad a Panobinostat (al igual que ocurría con Selinexor); también se puede apreciar esta diferencia en la **Figura 3 del Anexo**. Siendo la línea MM.1S la más sensible y la línea H929 la más resistentes de las cuatro. La **Tabla 2** muestra las LD<sub>50</sub> aproximadas obtenidas para cada línea celular; en cuanto a las líneas U266 y RPMI-8226 sus LD<sub>50</sub> fueron similares, en torno a 20-25 nM. Respecto a la línea MM.1S, al ser la más sensible de las cuatro, su LD<sub>50</sub> se sitúa en torno a los 10 nM y finalmente la LD<sub>50</sub> obtenida para la línea H929, la línea más resistente, fue mayor a 25 nM.

**Tabla 2. Dosis Letal 50 de Panobinostat sobre las líneas MM.** Concentración individual de Panobinostat que provoca la muerte del 50% de la población celular.

Línea Celular	LD <sub>50</sub> [nM] 48 h
MM.1S	≈10
H929	≈30
U266	≈25
RPMI-8226	≈20

Asimismo, cabe destacar que las poblaciones de muerte celular se diferencian en función de la línea celular tratada. La **línea MM.1S**, al igual que ocurría con el efecto de Selinexor, sufre mayoritariamente apoptosis tardía, además la población de células necróticas y en apoptosis temprana son similares. La **línea H929** (también se asemeja el patrón de poblaciones celulares observado con Selinexor) sufre mayoritariamente apoptosis tardía y en menor porcentaje necrosis; sin embargo, apenas se observa apoptosis temprana. Del mismo modo, cabe desatacar que la **línea U266**, sufre apoptosis temprana y tardía en porcentajes casi idénticos y, apenas se pudieron observar células necróticas. Finalmente, en la **línea celular RPMI-8226** el efecto de Panobinostat provoca apoptosis tardía en un gran porcentaje celular, y en menor medida necrosis y apoptosis temprana.

Se podría concluir que ambos fármacos inducen un patrón similar de muerte celular en cada una de las cuatro líneas celulares. Además, trabajos previos del Grupo realizados con otros fármacos también muestran que la línea U266 apenas presenta necrosis (marcaje con 7-AAD), a diferencia de las líneas MM.1S y H929, las cuales presentan un porcentaje más alto de necrosis [22]. De igual manera, en trabajos previos del Grupo, se ha observado que en todas las líneas estudiadas al igual que ocurre en el presente trabajo, el tipo de muerte predominante es la apoptosis (marcaje con Anexina V-FITC o doble marcaje Anexina V-FITC y 7-AAD) [23].

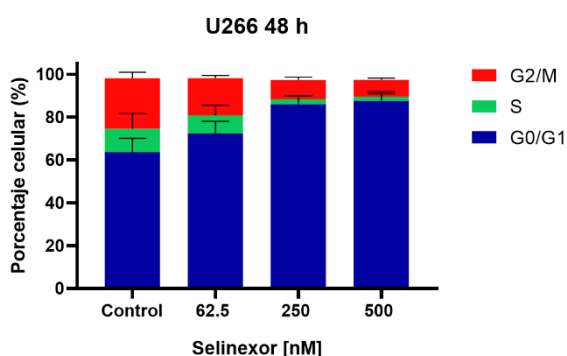
En relación a los resultados obtenidos con **Selinexor** en el presente trabajo, son consistentes con respecto a publicaciones previas, donde también se observó un valor de LD<sub>50</sub> aproximado de 500nM en la línea RPMI-8226 [24]. Con respecto a las líneas MM.1S, H929 y RPMI-8226 (ordenadas de mayor a menor sensibilidad), otros trabajos, realizados a 72 h muestran unos valores de LD<sub>50</sub> inferiores a los obtenidos en el **apartado 6.1** de este trabajo; sin embargo, nuestros resultados son consistentes con la bibliografía previa ya que para tiempos superiores, las LD<sub>50</sub> obtenidas son inferiores que las observadas en nuestros experimentos [25].

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo con **Panobinostat**, los valores LD<sub>50</sub> difieren a los de la literatura. El trabajo publicado por Matthews et al. 2013, muestra que la línea U266 (LD<sub>50</sub>-16 nM) es más sensible que la línea RPMI-8226 (LD<sub>50</sub>-36 nM) [26]; a diferencia de lo observado en este trabajo donde se han obtenido valores LD<sub>50</sub> para las líneas U266 y RPMI-8226 de 25 y 20 nM respectivamente; sin embargo, cabe destacar que los valores previos y los obtenidos en el presente trabajo son bastante próximos ya que ambos se sitúan en el rango nanomolar. El trabajo publicado por Maiso et al. 2006 muestra valores de LD<sub>50</sub> de 5,7 y 8,1 nM para las líneas MM.1S y U266 [27], siendo esta última más resistente a la acción de Panobinostat, al igual que se ha comprobado en este trabajo; sin embargo, los valores LD<sub>50</sub> difieren con respecto a los que se muestran en la **Tabla 2**: 10 y 25 nM (MM.1S y U266), si bien en ambos casos se sitúan en el rango nanomolar.

La comparación de los valores de LD<sub>50</sub> obtenidos con ambos fármacos, indica que Panobinostat es en relación a Selinexor eficaz a dosis más bajas, pero su mecanismo de acción parece ser más lento y no se observa toxicidad en ninguna de las líneas hasta las 48 h.

### 6.3 Análisis del efecto de Selinexor en el ciclo celular

Estudios previos (resultados no publicados del Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre), indicaban que, a 24 h, el efecto de Selinexor sobre las líneas celulares U266 y RPMI-8226 era prácticamente nulo en cuanto a la inducción de muerte celular. Esto podría deberse a una inhibición continuada de la exportación nuclear provocada por Selinexor, lo que estuviese afectando a la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular, favoreciendo, por ejemplo, la parada de éste en alguna de las fases. Por dicho motivo, se decidió estudiar la distribución del ciclo celular en células control y en células tratadas con dicho fármaco.



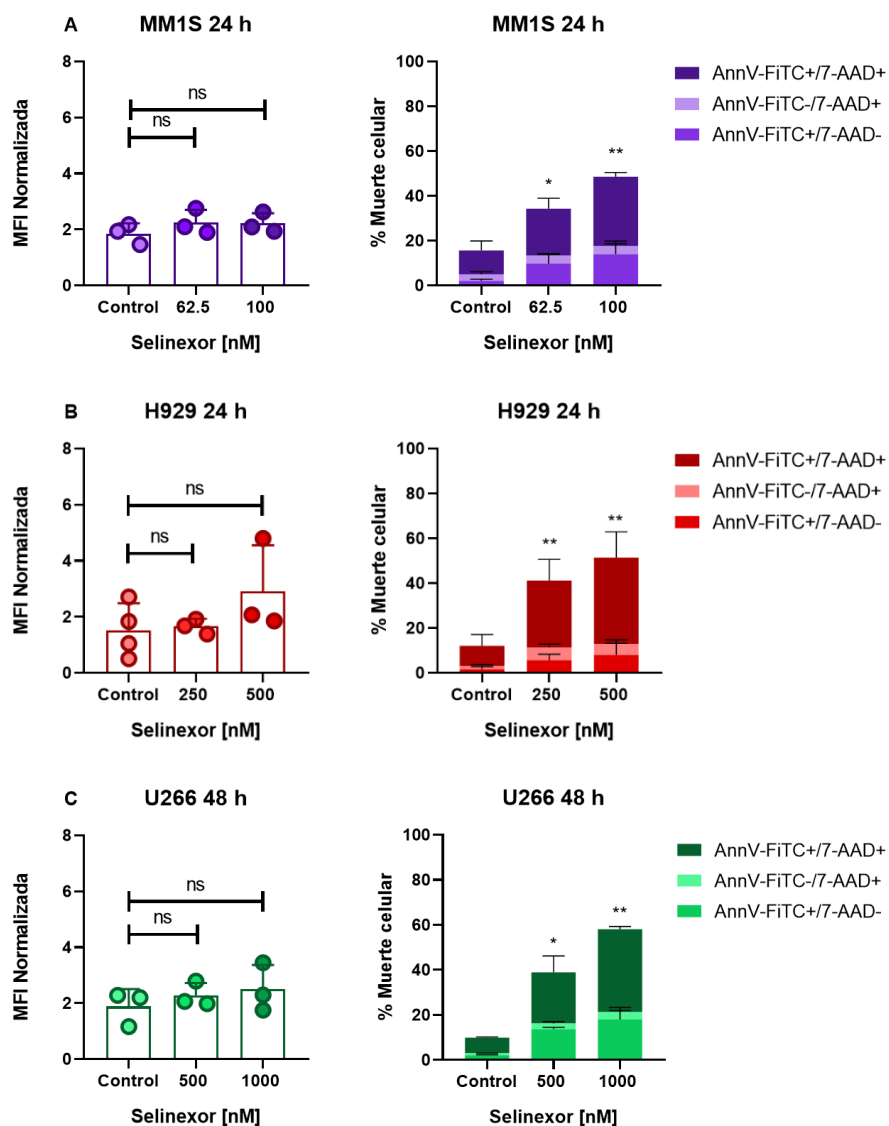
**Figura 8. Evaluación del efecto de Selinexor sobre el ciclo celular en la línea celular U266.** Las células fueron tratadas durante 48 h con tres dosis diferentes de Selinexor (62.5, 250 y 500 nM), además se analizaron células control, sin tratar con fármaco. Tras el tratamiento, se evaluó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.3. En el eje X, se muestra la concentración de Selinexor y, en el eje Y, el porcentaje celular en las diferentes fases del ciclo celular. Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=2$  experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

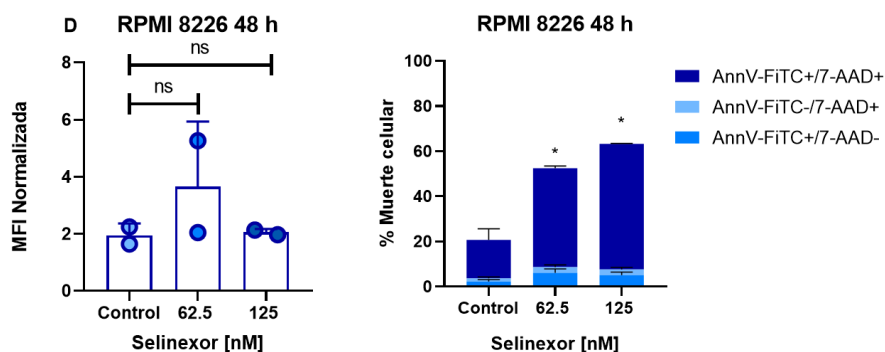
El hecho de que se **incremente el número de células en la fase G0/G1** tras el tratamiento con Selinexor (**Figura 8**) podría deberse a que frena la entrada en el ciclo, ejerciendo un efecto citostático; lo que acabaría provocando una entrada en apoptosis de las células. Este es el efecto observado sobre la línea U266; pero se han de realizar estudios más en profundidad para confirmar esta misma hipótesis en la línea celular RPMI-8226.

Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los que han demostrado que el Selinexor es capaz de producir en células tumorales de vejiga un arresto en la fase G1 del ciclo celular y una disminución del número de células en fase S y G2/M [28]. Estudios adicionales, han demostrado que células tumorales en fase G1 o S temprana tratadas con Selinexor muestran una respuesta más fuerte y mueren o se detienen, mientras que las tratadas en fase S o G2 tardía, progresan a mitosis y se dividen y, son las células hijas las que responden a Selinexor en el ciclo celular posterior, generalmente en fase G1 [29]. Es decir, que las células no pueden comprometerse con la detención o muerte del ciclo celular de la misma manera que las células en la fase G1 y S temprana y/o que el Selinexor gana eficacia a través de un proceso o respuesta al estrés que ocurre en la fase G1 o S temprana y no en la fase S o G2 tardía [29].

## 6.4 Efecto de Selinexor y Panobinostat sobre los niveles de PD-L1

En este ensayo, se estudió mediante citometría de flujo, la **expresión de PD-L1** en la membrana de las cuatro líneas celulares (MM.1S, H929, U266 y RPMI-8226) empleando un marcaje con anticuerpos. Respecto al efecto del **Selinexor**, las diferentes líneas fueron incubadas a dos concentraciones diferentes del fármaco, para alcanzar un porcentaje de muerte celular de aproximadamente un 30-40% (dosis sub-letal), además se sembró un pocillo con células en ausencia de fármaco a modo de control. La expresión de la proteína solamente fue considerada en aquella población de células viables tras la incubación con el fármaco; es decir aquellas células con valores altos de FSC y bajos de SSC (**Figura 6 Anexo**).





**Figura 9. Efecto de Selinexor sobre los niveles de PD-L1 en líneas MM.** Las células fueron tratadas con dos concentraciones de Selinexor, para evaluar la expresión de PD-L1 por citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.4. Las gráficas de la izquierda muestran en el eje X, la concentración de Selinexor y, en el eje Y, la intensidad media de fluorescencia (MFI) del marcaje anti-PD-L1. Las gráficas de la derecha muestran en el eje X, la concentración de Selinexor y, en el eje Y, el porcentaje de muerte celular. Los resultados son la media  $\pm$  SD 2-3 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

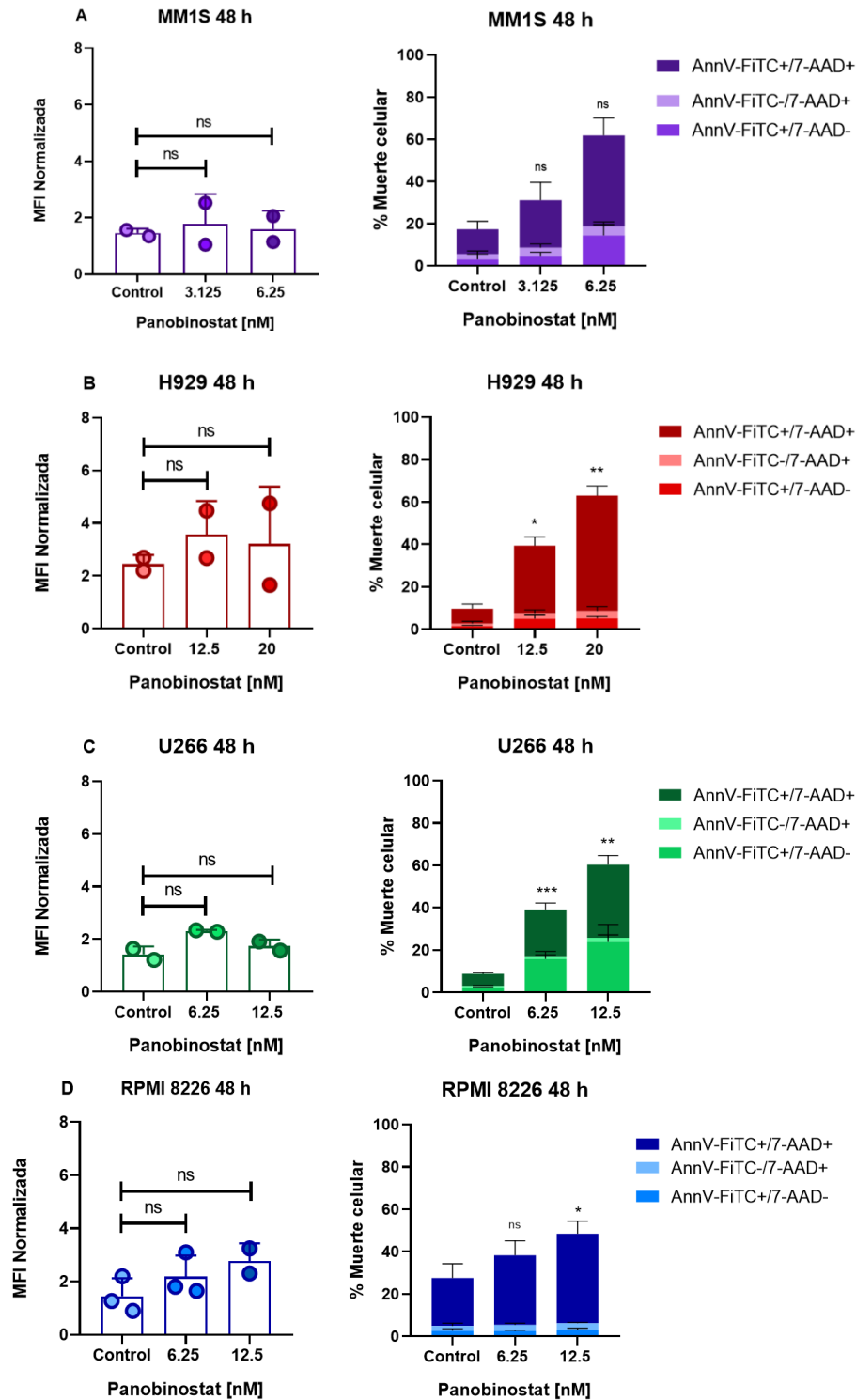
**Tabla 3. MFI de Selinexor sobre las líneas MM.** Cambio en la intensidad de la fluorescencia en función de las diferentes concentraciones de fármaco empleadas para cada línea celular. Los resultados son la media  $\pm$  SD de 2-3 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

Línea Celular	MFI PD-L1 (Control)	MFI PD-L1 (Dosis 1)	MFI PD-L1 (Dosis 2)
MM.1S	1.85 $\pm$ 0.36	2.25 $\pm$ 0.45	2.22 $\pm$ 0.36
H929	1.52 $\pm$ 0.96	1.66 $\pm$ 0.27	2.91 $\pm$ 1.64
U266	1.88 $\pm$ 0.63	2.28 $\pm$ 0.45	2.5 $\pm$ 0.87
RPMI-8226	1.95 $\pm$ 0.42	3.66 $\pm$ 2.28	2.05 $\pm$ 0.12

Tal y como se puede observar en la **Figura 9**, y como reflejan los valores de la **Tabla 3** el efecto de Selinexor sobre la expresión de PD-L1 en las diferentes líneas celulares es variable es decir, los cambios observados en la expresión de PD-L1 no siguen un patrón uniforme en presencia de Selinexor.

Todas las concentraciones del fármaco en cada una de las líneas provocan un **aumento de la expresión de PD-L1** aunque, este aumento no llega a ser estadísticamente significativo. Esto indica que, a pesar de que el fármaco ejerce un efecto tóxico sobre cierto porcentaje celular (aproximadamente un 30-40% respectivamente); en aquellas células que siguen siendo viables, la expresión de PD-L1 se ve aumentada, lo que puede derivar en un aumento del escape de la vigilancia inmune sobre las células cancerosas.

De la misma forma que se evaluó la expresión de **expresión de PD-L1** con Selinexor, se analizó la expresión con **Panobinostat**. Para ello fueron empleadas distintas dosis del fármaco, al mismo tiempo, se estableció un grupo control. Además, solo se evaluó la expresión de la proteína PD-L1 en aquella población celular viable tras la administración del fármaco (valores altos de FSC y bajos de SSC) (**Figura 7 Anexo I**).



**Figura 10. Efecto de Panobinostat sobre los niveles de PD-L1 en líneas MM.** Las células fueron tratadas con dos concentraciones de Panobinostat, para evaluar la expresión de PD-L1 por citometría de flujo, según se indica en el apartado 5.4. Las gráficas de la izquierda muestran en el eje X, la concentración de Panobinostat y, en el eje Y, la intensidad media de fluorescencia (MFI) del marcaje anti-PD-L1. Las gráficas de la derecha muestran en el eje X, la concentración de Panobinostat y, en el eje Y, el porcentaje de muerte celular. Los resultados son la media  $\pm$  SD 2-3 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.



**Tabla 4. MFI de Panobinostat sobre las líneas MM.** Cambio en la intensidad de la fluorescencia en función de las diferentes concentraciones de Panobinostat empleadas para cada línea celular. Los resultados son la media  $\pm$  SD de 2-3 experimentos independientes realizados en las mismas condiciones.

Línea Celular	MFI PD-L1 (Control)	MFI PD-L1 (Dosis 1)	MFI PD-L1 (Dosis 2)
<b>MM.1S</b>	1.46 $\pm$ 0.16	1.79 $\pm$ 1.05	1.6 $\pm$ 0.65
<b>H929</b>	2.44 $\pm$ 0.35	3.57 $\pm$ 1.27	3.2 $\pm$ 2.19
<b>U266</b>	1.42 $\pm$ 0.3	2.31 $\pm$ 0.04	1.73 $\pm$ 0.25
<b>RPMI-8226</b>	1.45 $\pm$ 0.67	2.18 $\pm$ 0.79	2.78 $\pm$ 0.67

Los resultados de este análisis resumidos en la **Figura 10** y en la **Tabla 4**, muestran el efecto de Panobinostat sobre la expresión de PD-L1 en las diferentes líneas celulares. De modo similar a lo que ocurría con Selinexor, las diferentes líneas celulares presentan un patrón variable en la expresión de PD-L1.

Todo ello indica, como conclusión a este apartado que, a pesar de que **ambos fármacos ejercen un efecto tóxico** provocando la muerte de cierto porcentaje celular; aquellas células que siguen siendo viables, muestran una **expresión aumentada de PD-L1 respecto al control**, aunque en ningún caso esta expresión es estadísticamente significativa. Es por ello, por lo que se requieren de nuevas replicas que confirmen lo que ya se ha observado. Consecuencia de esta expresión incrementada, puede derivar en un aumento del escape de la vigilancia inmune sobre las células cancerosas, al interaccionar PD-L1 en la membrana de las células tumorales con PD-1 de las células del sistema inmunitario que se encuentran en el TME encargadas de la destrucción de las células malignas. Dicho incremento en la expresión de PD-L1 supondría a su vez un aumento de la proliferación celular, disminución de la apoptosis, resistencia al fármaco y aumento de la migración celular.

Otros estudios *in vitro* también han reportado un aumento de la expresión de PD-L1 tras la incubación de **Selinexor** en líneas celulares de melanoma humano y otras líneas celulares de cáncer humano, incluyendo mama, sarcoma y próstata [30]; lo que indica que este efecto no es exclusivo de un tipo celular concreto. Del mismo modo, estudios realizados con el inhibidor de HDACs, **Panobinostat**, mostraron que es capaz de regular al alza la expresión de PD-L1 en células de MM [31] y en una línea celular de cáncer de tiroides anaplásico solo o en combinación con quimioterapia convencional [32]. Sin embargo, estudios adicionales muestran un patrón variable de la **expresión de PD-L1 en células de MM** en función del fármaco aplicado; por ejemplo, se ha comprobado que Lenalidomida y la terapia anti-BCMA (antígeno de maduración de células B) regulan a la baja la expresión de PD-L1 a diferencia de ciertos inhibidores del proteasoma que inducen una expresión aumentada de la proteína [33].

Por todo ello, la **combinación de fármacos como Selinexor o Panobinostat** junto con anticuerpos **anti-PD-L1/PD-1** podría suponer en un futuro una estrategia terapéutica frente al MM, ya que puede ser capaz de provocar respuestas rápidas y duraderas al dirigirse de manera simultánea al tumor y estimular el sistema inmune del paciente. Sin embargo, a la vista de los resultados del presente trabajo, cabe destacar el especial interés que tiene evaluar los cambios de expresión de PD-L1 al realizar terapias de combinación en las que la inmunoterapia esté involucrada. En efecto ya hay en marcha ensayos clínicos en los que combinan la administración de Selinexor con Pembrolizumab; un anticuerpo dirigido a PD-1 para el tratamiento del melanoma avanzado recurrente

([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov): NCT04768881) y otros ensayos en los que emplean Atezolizumab (anti-PD-L1) solo o en combinación con fármacos inmunomoduladores o Daratumumab (anti-CD38) en pacientes con MM ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov): NCT02431208)

Finalmente, con respecto al **Panobinostat** cabe destacar que, pese a haber sido retirado por la FDA en monoterapia para el tratamiento del MM, este tipo de combinación con inhibidores del eje PD-1/PD-L1 podría suponer una reducción en las dosis administradas del fármaco y por tanto una reducción en los efectos adversos, lo cual permitiría su reincorporación a la actividad clínica.

Estudios han demostrado que el **Selinexor** (también aprobado para el tratamiento del DLBCL) es capaz de sensibilizar a las células de linfoma a la muerte mediada por las células NK a través de la interrupción de la interacción NKG2A (en la superficie de las células NK) y HLA-E (expresado en la superficie de células tumorales) [34]. Adicionalmente, otros estudios han demostrado que el **Panobinostat** es capaz de aumentar la expresión de MHC y moléculas estimuladoras en células de melanoma, lo que lleva a una mayor capacidad para activar las células T [35]. Dado que este tipo de ensayos no se han llevado a cabo en células de MM, sería necesario estudiar la expresión de otros ligandos tanto de receptores activadores como inhibitorios para poder evaluar en conjunto el efecto de estos fármacos sobre la respuesta inmune antitumoral.

## 7. CONCLUSIONES

En función a los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y de acuerdo con los objetivos establecidos al inicio de este trabajo, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Los fármacos **Selinexor y Panobinostat** ejercen un **efecto citotóxico dosis-dependiente** causante de la muerte celular en las líneas celulares de mieloma MM.1S, NCI-H929, U266 y RPMI-8226.
2. Se observaron **diferencias en la sensibilidad a ambos fármacos** entre las diferentes líneas celulares.
3. **Selinexor** es capaz de causar la **detención del ciclo celular en la fase G0/G1** de la línea celular U266 provocando como consecuencia una reducción en la capacidad proliferativa de las células.
4. La administración de Selinexor o Panobinostat induce un **aumento de la expresión de PD-L1** en las cuatro líneas celulares estudiadas; sin embargo, el patrón de expresión es variable y dosis-dependiente en todas ellas.

## 8. CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the different tests and in accordance with the objectives established at the beginning of this work, the following conclusions have been obtained:

1. **Selinexor and Panobinostat** induce **dose-dependent cytotoxic effect** causing cell death in myeloma cell lines MM.1S, NCI-H929, U266 y RPMI-8226.
2. **Differences in sensitivity to both drugs** were observed between the different cell lines

3. **Selinexor** is able to cause **cycle arrest in the G0/G1 phase** of the U266 cell line causing as a consequence a reduction in the proliferative capacity of the cells.
4. Selinexor and Panobinostat administration causes **increased surface expression of PD-L1** in the four cell lines studied; however, the expression pattern is variable and dose-dependent in all of them.

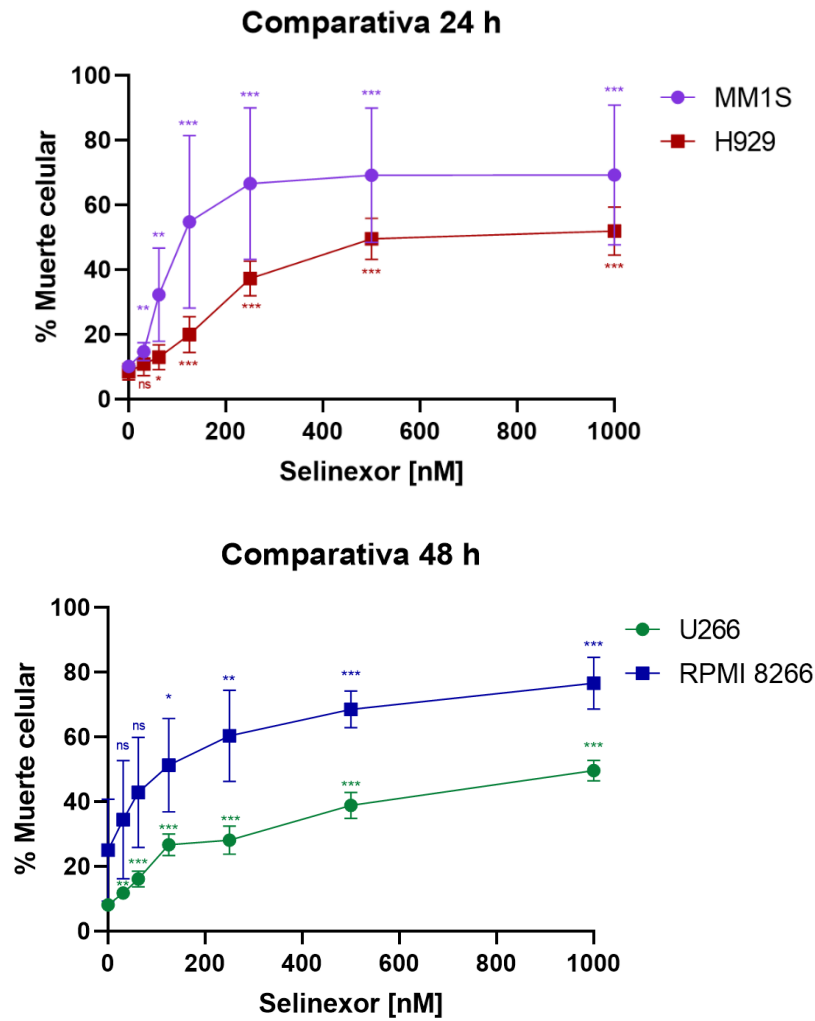
## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. J. Cowan *et al.*, “Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review,” *JAMA*, vol. 327, no. 5, pp. 464–477, Feb. 2022, doi: 10.1001/JAMA.2022.0003.
- [2] M. A. Dimopoulos *et al.*, “Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up<sup>†</sup>,” *Annals of Oncology*, vol. 32, no. 3, pp. 309–322, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.ANNONC.2020.11.014/ATTACHMENT/39E08551-CDE2-4513-9810-FE23DB917647/MMC1.PDF.
- [3] O. Castaneda and R. Baz, “Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review,” *Acta Med Acad*, vol. 48, no. 1, pp. 57–67, Apr. 2019, doi: 10.5644/AMA2006-124.242.
- [4] S. A. Albagoush, C. Shumway, and A. M. Azevedo, “Multiple Myeloma,” *StatPearls*, Feb. 2022, Accessed: Jun. 13, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534764/>
- [5] V. Pinto, R. Bergantim, H. R. Caires, H. Seca, J. E. Guimarães, and M. H. Vasconcelos, “Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance,” *Cancers 2020, Vol. 12, Page 407*, vol. 12, no. 2, p. 407, Feb. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12020407.
- [6] “Multiple myeloma | José Carreras Leukaemia Foundation.” <https://www.fcarreras.org/en/mieloma> (accessed May 01, 2022).
- [7] “| mieloma CDC.” <https://www.cdc.gov/cancer/myeloma/index.htm> (accessed Apr. 30, 2022).
- [8] “What is Multiple Myeloma? | The MMRF.” <https://themmrf.org/multiple-myeloma/> (accessed Apr. 18, 2022).
- [9] “What Are MGUS, Smoldering and Active Myeloma? | The IMF.” <https://www.myeloma.org/what-are-mgus-smm-mm> (accessed May 19, 2022).
- [10] C. Gasparetto *et al.*, “Once weekly selinexor, carfilzomib and dexamethasone in carfilzomib non-refractory multiple myeloma patients,” *British Journal of Cancer 2021 126:5*, vol. 126, no. 5, pp. 718–725, Nov. 2021, doi: 10.1038/s41416-021-01608-2.
- [11] A. S. Azmi, M. H. Uddin, and R. M. Mohammad, “The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy,” *Nature Reviews Clinical Oncology 2020 18:3*, vol. 18, no. 3, pp. 152–169, Nov. 2020, doi: 10.1038/s41571-020-00442-4.
- [12] J. P. Laubach, P. Moreau, J. F. San-Miguel, and P. G. Richardson, “Panobinostat for the treatment of multiple myeloma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 21, pp. 4767–4773, Nov. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0530/176571/AM/PANOBINOSTAT-FOR-THE-TREATMENT-OF-MULTIPLE.

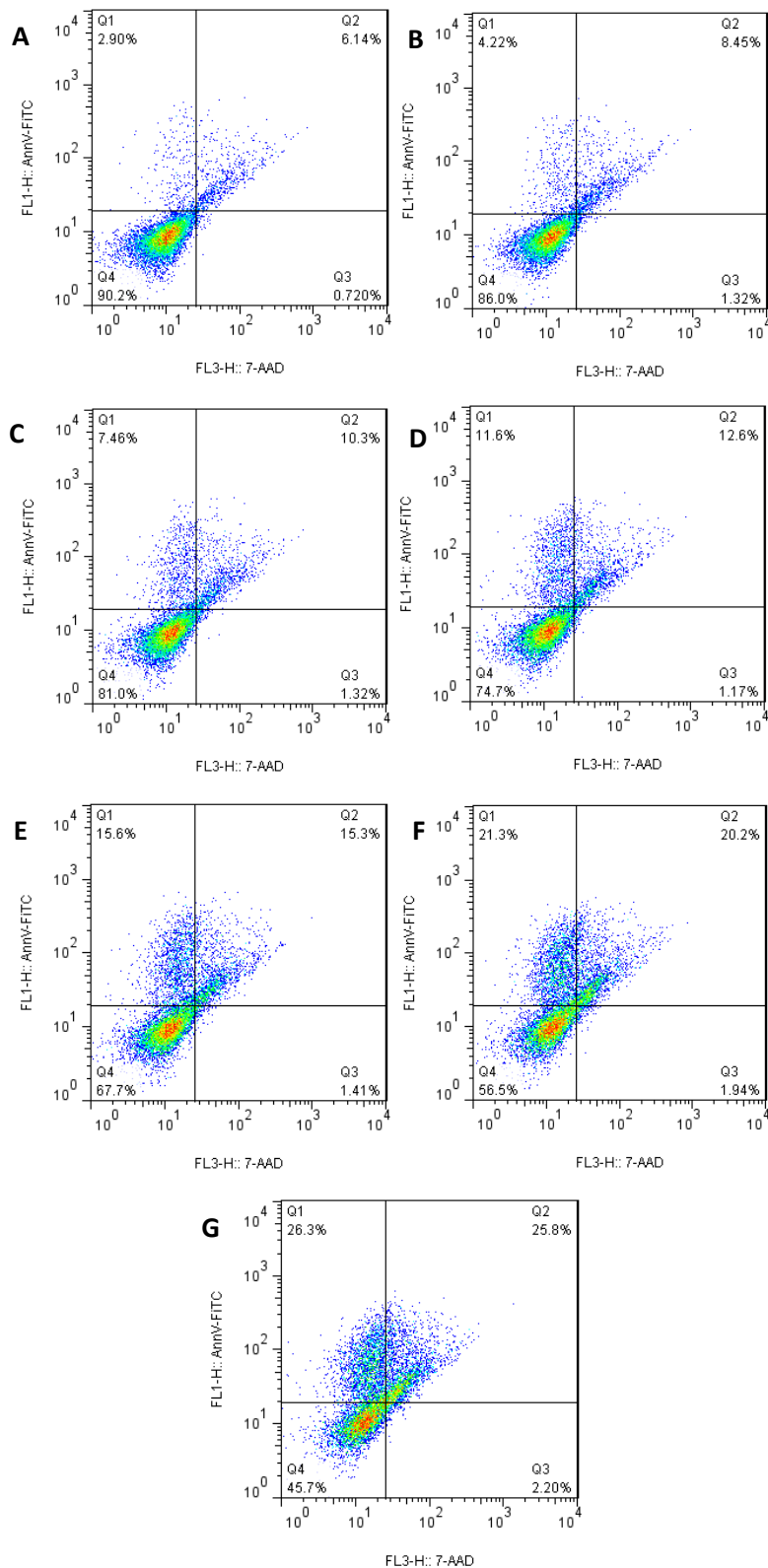
- [13] “FDA withdrawal of panobinostat for the treatment of R/R MM.” <https://multiplemyelomahub.com/medical-information/fda-withdrawal-of-panobinostat-for-the-treatment-of-rr-mm> (accessed Jun. 03, 2022).
- [14] X. Cai *et al.*, “Current Progress and Future Perspectives of Immune Checkpoint in Cancer and Infectious Diseases,” *Frontiers in Genetics*, vol. 12, p. 2352, Nov. 2021, doi: 10.3389/FGENE.2021.785153/BIBTEX.
- [15] M. A. McBride, T. K. Patil, J. K. Bohannon, A. Hernandez, E. R. Sherwood, and N. K. Patil, “Immune Checkpoints: Novel Therapeutic Targets to Attenuate Sepsis-Induced Immunosuppression,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11, p. 3726, Feb. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2020.624272/BIBTEX.
- [16] S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, J. Decock, and E. Elkord, “Immune checkpoints in the tumor microenvironment,” *Seminars in Cancer Biology*, vol. 65, pp. 1–12, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.06.021.
- [17] A. Akinleye and Z. Rasool, “Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, Sep. 2019, doi: 10.1186/S13045-019-0779-5/TABLES/3.
- [18] T. Jelinek, B. Paiva, and R. Hajek, “Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. NOV, p. 2431, Nov. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.02431.
- [19] S. E. Logue, M. Elgendy, and S. J. Martin, “Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells,” *Nature Protocols 2009 4:9*, vol. 4, no. 9, pp. 1383–1395, Sep. 2009, doi: 10.1038/nprot.2009.143.
- [20] V. Jarauta *et al.*, “Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo,” *Cancer Letters*, vol. 382, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.CANLET.2016.08.019.
- [21] C. Reina-Ortiz *et al.*, “Expanded NK cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood combined with daratumumab are effective against tumor cells from multiple myeloma patients,” *Oncolimmunology*, vol. 10, no. 1, 2021, doi: 10.1080/2162402X.2020.1853314/SUPPL\_FILE/KONI\_A\_1853314\_SM3894.DOCX.
- [22] Manuel Beltrán Visiedo, “Apoptosis induced by the proteasome inhibitor Ixazomib in human myeloma cells”, M.S. tesis, Dept. Bchm. Mol and Cell Bio, Zaragoza Univ, Zaragoza, AR, Spain, 2018.
- [23] N. Jimenez Alduán, I. Marzo and J. Naval, “Study of apoptosis induced by the proteasome inhibitor Ixazomib in myeloma cells. Evaluation of resistance factors and analysis of their potentiation by BH3 agonists”. Ph.D Thesis, Dept. Bchm. Mol and Cell Bio, Zaragoza Univ, Zaragoza, AR, Spain, 2022.
- [24] J. G. Turner *et al.*, “CRM1 inhibition sensitizes drug resistant human myeloma cells to topoisomerase II and proteasome inhibitors both in vitro and ex vivo,” *J Cancer*, vol. 4, no. 8, pp. 614–625, 2013, doi: 10.7150/JCA.7080.
- [25] S. Rosebeck *et al.*, “Synergistic Myeloma Cell Death via Novel Intracellular Activation of Caspase-10-Dependent Apoptosis by Carfilzomib and Selinexor,” *Mol Cancer Ther*, vol. 15, no. 1, pp. 60–71, Jan. 2016, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0488.

- [26] G. M. Matthews *et al.*, “Preclinical screening of histone deacetylase inhibitors combined with ABT-737, rhTRAIL/MD5-1 or 5-azacytidine using syngeneic Vk\*MYC multiple myeloma,” *Cell Death Dis*, vol. 4, no. 9, Sep. 2013, doi: 10.1038/CDDIS.2013.306.
- [27] P. Maiso *et al.*, “The Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Is a Potent Antimyeloma Agent that Overcomes Drug Resistance,” *Cancer Res*, vol. 66, no. 11, pp. 5781–5790, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4186.
- [28] H. B. Baek *et al.*, “XPO1 inhibition by selinexor induces potent cytotoxicity against high grade bladder malignancies,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 77, pp. 34567–34581, Oct. 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.26179.
- [29] J. M. Marcus, R. T. Burke, J. A. Desisto, Y. Landesman, and J. D. Orth, “Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor, selinexor,” *Scientific Reports 2015 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, Sep. 2015, doi: 10.1038/srep14391.
- [30] M. R. Farren *et al.*, “The exportin-1 inhibitor selinexor exerts superior antitumor activity when combined with T-Cell checkpoint inhibitors,” *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 16, no. 3, pp. 417–427, Mar. 2017, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0498/86891/AM/THE-EXPORTIN-1-INHIBITOR-SELINEXOR-EXERTS-SUPERIOR.
- [31] M. Iwasa *et al.*, “PD-L1 upregulation in myeloma cells by panobinostat in combination with interferon- $\gamma$ ,” *Oncotarget*, vol. 10, no. 20, p. 1903, Mar. 2019, doi: 10.18632/ONCOTARGET.26726.
- [32] L. Hegedús *et al.*, “HDAC Inhibition Induces PD-L1 Expression in a Novel Anaplastic Thyroid Cancer Cell Line,” *Pathology and Oncology Research*, vol. 26, no. 4, pp. 2523–2535, Oct. 2020, doi: 10.1007/S12253-020-00834-Y/FIGURES/6.
- [33] R. Tremblay-Lemay, N. Rastgoo, and H. Chang, “Modulating PD-L1 expression in multiple myeloma: An alternative strategy to target the PD-1/PD-L1 pathway,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, Mar. 2018, doi: 10.1186/S13045-018-0589-1/FIGURES/2.
- [34] J. Fisher *et al.*, “Selinexor Enhances NK Cell Activation Against Lymphoma Cells Via Downregulation of HLA-E,” *Blood*, vol. 138, no. Supplement 1, p. 2411, Nov. 2021, doi: 10.1182/BLOOD-2021-144836.
- [35] D. M. Woods *et al.*, “THE ANTI-MELANOMA ACTIVITY OF THE HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR PANOBINOSTAT (LBH589) IS MEDIATED BY DIRECT TUMOR CYTOTOXICITY AND INCREASED TUMOR IMMUNOGENICITY,” *Melanoma Res*, vol. 23, no. 5, p. 341, 2013, doi: 10.1097/CMR.0B013E328364C0ED.

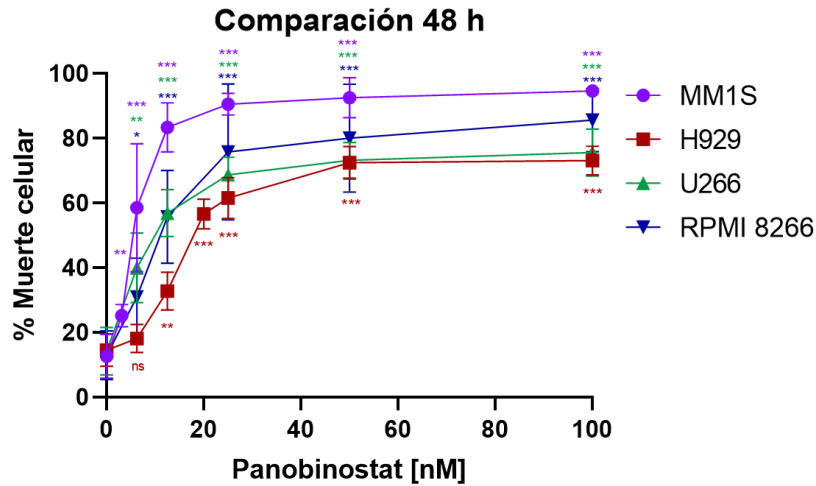
## 10. ANEXOS



**Figura A-1. Grafica comparativa del efecto de Selinexor sobre la viabilidad celular en líneas MM (24 y 48 h).** En el eje X, se muestra la concentración de Selinexor y, en el eje Y, el porcentaje de viabilidad celular. En función de la línea celular, fueron incubadas a 24 h (MM.1S y H929) o a 48 h (U266 y RPMI-8226). Los resultados son la media  $\pm$  SD de  $n=2-3$  experimentos independientes en las mismas condiciones. Se llevo a cabo el análisis estadístico t de Student desapareado respecto al control.

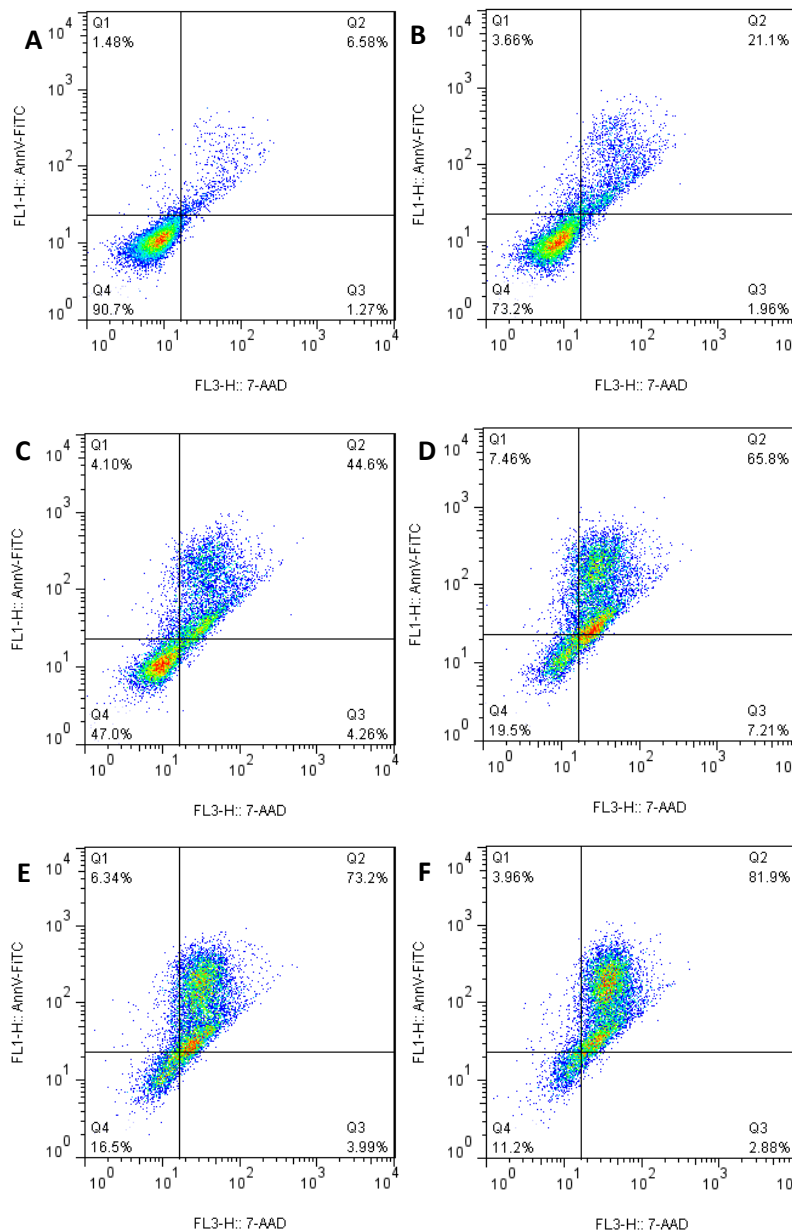


**Figura A-2.** Diagramas de puntos de la línea celular U266 tras el efecto de Selinexor (Control (A), 31.25 nM (B), 62.5 nM (C), 125 nM (D), 250 nM (E), 500 nM (F) y 1000 nM (G)), representando las diferentes poblaciones celulares. En el eje X, se muestra el marcaje con 7-AAD y, en el eje Y, el marcaje con anexina V-FITC. Q1: células en apoptosis temprana (AnnV-FITC+/7-AAD-), Q2: células en apoptosis tardía (AnnV-FITC+/7-AAD+), Q3: células necróticas (AnnV-FITC-/7-AAD+) y Q4: células viables (AnnV-FITC-/7-AAD-).

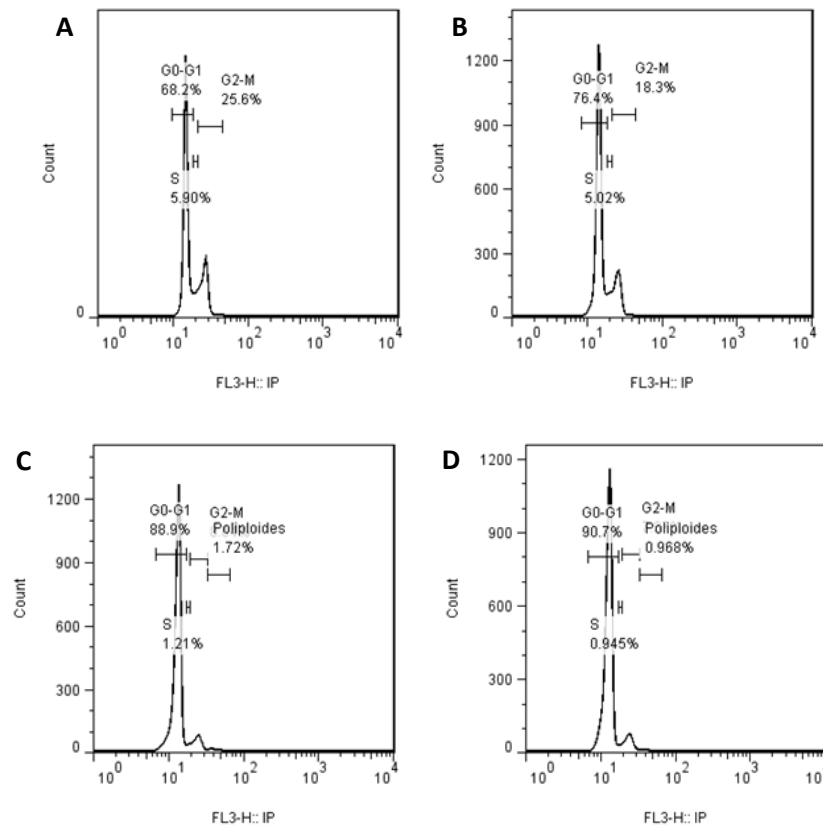


**Figura A-3.** Grafica comparativa del efecto de Panobinostat sobre la viabilidad celular en líneas MM. En el eje X, se muestra la concentración de Panobinostat y, en el eje Y, el porcentaje de viabilidad celular. Todas las líneas celulares, fueron incubadas a 48 h (MM.1S, H929, U266 y RPMI-8226). Los resultados son la media  $\pm$  SD de n=2-3 experimentos independientes en las mismas condiciones. Se llevo a cabo el análisis estadístico t de Student desapareado respecto al control.

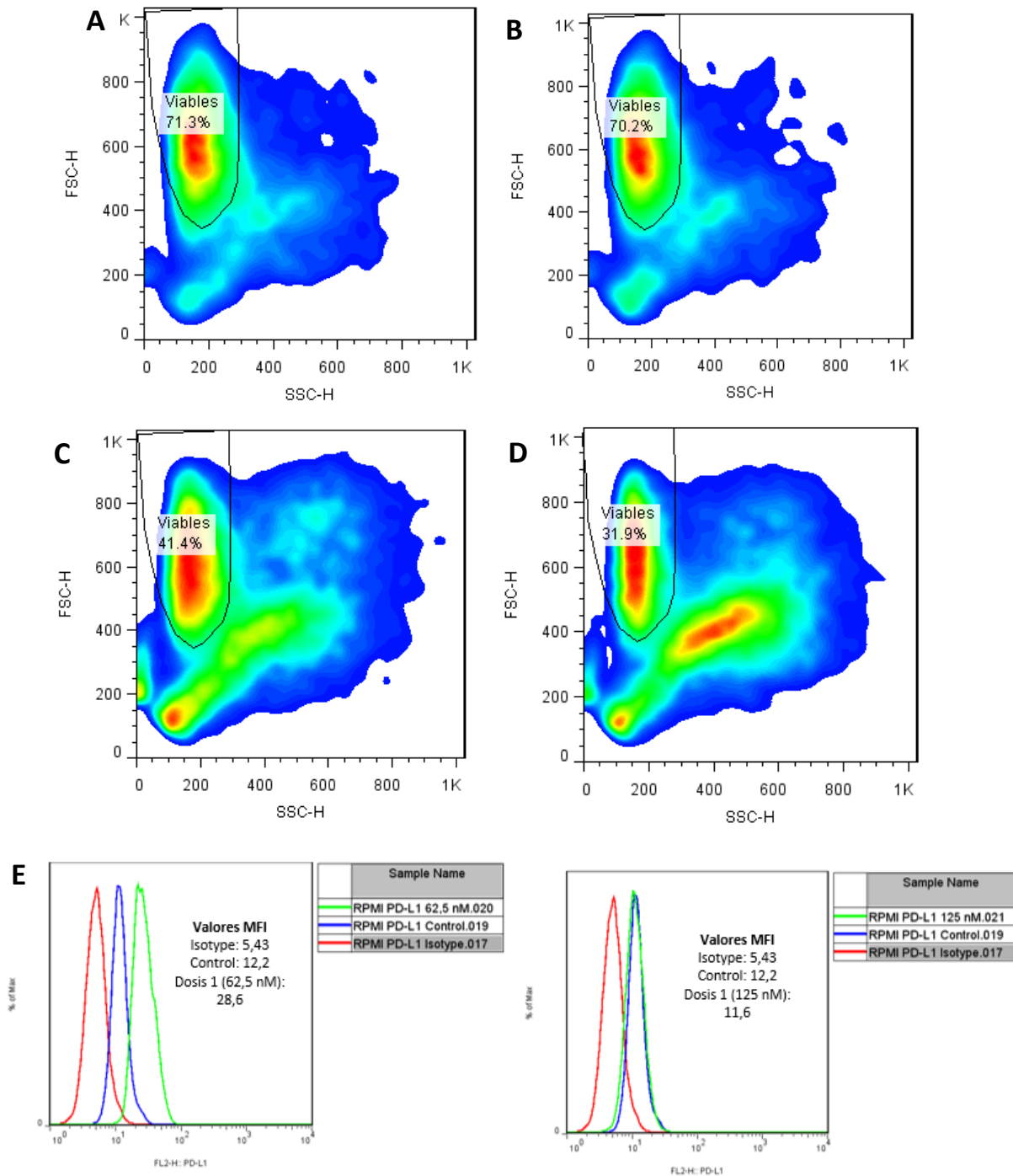




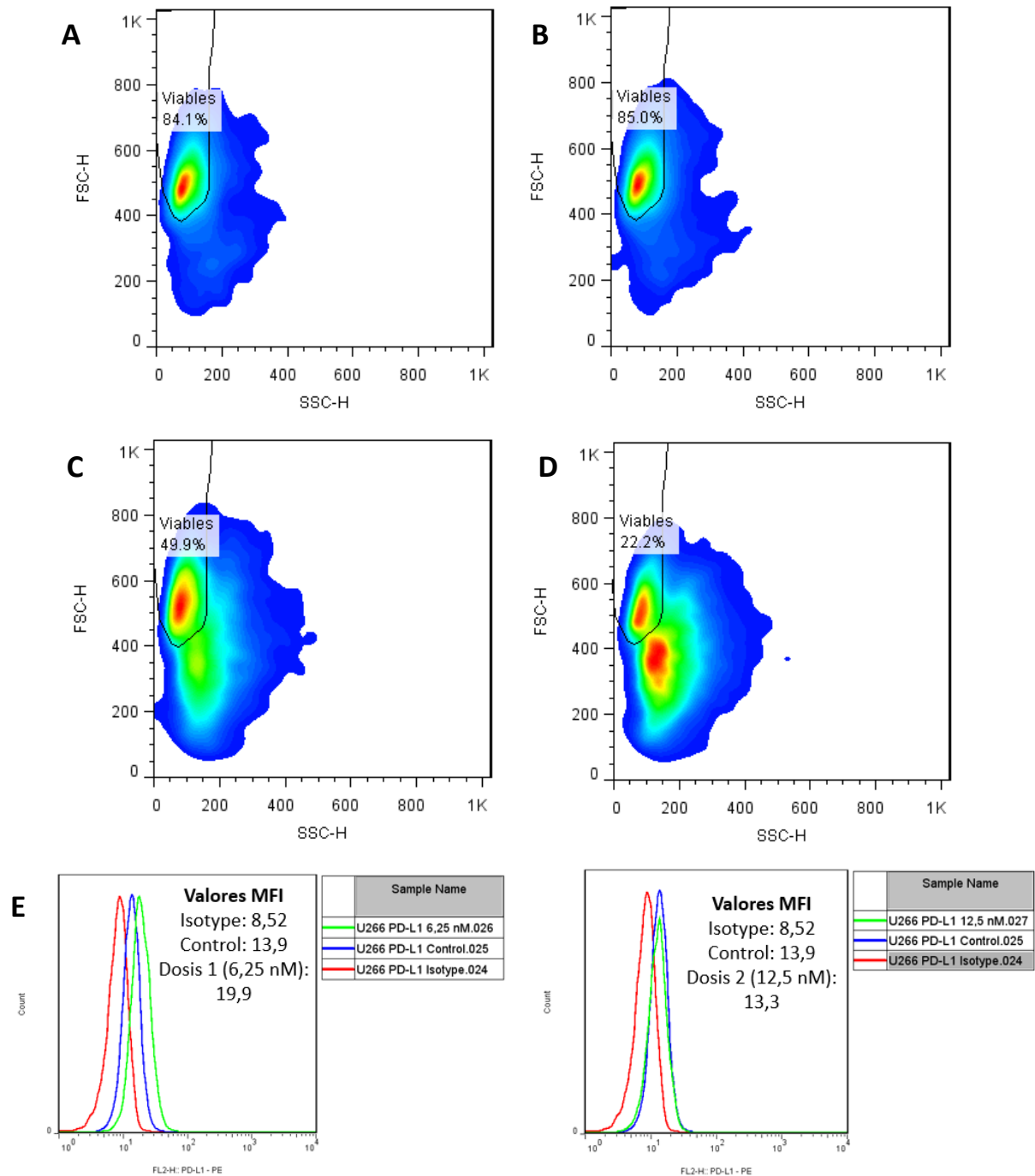
**Figura A-4.** Diagramas de puntos de la línea celular RPMI-8226 tras el efecto de Panobinostat (Control (A), 6.25 nM (B), 12.5 nM (C), 25 nM (D), 50 nM (E) y 100 nM (F)), representando las diferentes poblaciones celulares. En el eje X, se muestra el marcaje con 7-AAD y, en el eje Y, el marcaje con anexina V-FITC. Q1: células en apoptosis temprana (AnnV-FITC+/7-AAD-), Q2: células en apoptosis tardía (AnnV-FITC+/7-AAD+), Q3: células necróticas (AnnV-FITC-/7-AAD+) y Q4: células viables (AnnV-FITC-/7-AAD-).



**Figura A-5.** Graficas distribución en el ciclo celular de la línea U266 tratada con Selinexor (A-D) . En el eje X se muestra el marcaje con IP y, en el eje Y contenido de ADN y la distribución en las diferentes fases del ciclo celular.



**Figura A-6. Efecto de Selinexor sobre la expresión de PD-L1 en la línea celular RPMI-8226.** (A-D) Se muestran los gráficos FSC vs SSC de las células control (A-B) y tratadas con Selinexor 62,5 nM (C) o 125 nM (D). En el eje X, se muestra la granulosidad celular (Side Scatter: SSC) y, en el eje Y, el tamaño celular (Foward Scatter: FSC); además la región seleccionada muestra aquella población celular viable (altos valores de FSC y bajos SSC) sobre la que se ha determinado el marcaje anti-PD-L1. La **figura E (A-6)** muestra un ejemplo del análisis de la expresión de la proteína PD-L1 en función de la dosis de fármaco empleada y en comparación con el isotipo y la población control.



**Figura A-7. Efecto de Panobinostat sobre la expresión de PD-L1 en la línea celular U266 (A-D).** Se muestran los gráficos FSC vs SSC de las células control (A-B) y tratadas con Panobinostat 6,25 nM (C) o 12,5 nM (D). En el eje X, se muestra la granulosidad celular (Side Scatter: SSC) y, en el eje Y, el tamaño celular (Foward Scatter: FSC); además la región seleccionada muestra aquella población celular viable (altos valores de FSC y bajos SSC) sobre la que se ha determinado el marcaje anti-PD-L1. La **figura E (A-7)** muestra un ejemplo del análisis de la expresión de la proteína PD-L1 en función de la dosis de fármaco empleada y en comparación con el isotipo y la población control.