

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS PRE-CLÍNICO COMPARATIVO DE LA
EFICACIA, MECANISMO DE ACCIÓN Y MECANISMOS
DE RESISTENCIA DE DOS FÁRMACOS
INMUNOMODULADORES (IMiDS), LENALIDOMIDA Y
POMALIDOMIDA, EN MIELOMA MÚLTIPLE.**

AUTOR: DIEGO FERNÁNDEZ LÁZARO

DIRIGIDA POR: JESÚS F. SAN MIGUEL Y ENRIQUE M. OCIO

SALAMANCA, 2011

D. Jesús F. San Miguel Izquierdo, Catedrático de Hematología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D. Enrique M. Ocio San Miguel, Licenciado Especialista de Área del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

CERTIFICAN

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por **Diego Fernández Lázaro** titulado “ANÁLISIS PRE-CLÍNICO COMPARATIVO DE LA EFICACIA, MECANISMO DE ACCIÓN Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE DOS FÁRMACOS INMUNOMODULADORES (IMiDs), LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA, EN MIELOMA MÚLTIPLE”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Salamanca, a uno de Octubre de dos mil once.

Fdo. Prof. Jesús F. San Miguel

Fdo. Enrique M. Ocio

AGRADECIMIENTOS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. PATOGENIA DEL MIELOMA MÚLTIPLE	5
1.1. BASES MOLECULARES.....	5
1.2. INTERACCIÓN ENTRE LA CÉLULA MIELOMATOSA Y EL MICROMEDIOAMBIENTE	9
1.2.1. Factores de crecimiento y supervivencia	11
1.3. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL MIELOMA MÚLTIPLE.....	13
1.3.1. Factores relacionados con el paciente.....	14
1.3.2. Factores relacionados con el clon tumoral.....	14
2. IMIDS EN MIELOMA MÚLTIPLE	17
2.1. TALIDOMIDA.....	17
2.2. ANÁLOGOS DE LA TALIDOMIDA: IMIDS	18
2.2.1. Efectos tumorocidas de IMIDS y sobre la interacción con el micromedioambiente.....	19
2.2.2. Efectos inmunomoduladores de IMIDS.....	21
2.2.3. Diferencias en el modo de actuación de la Talidomida e IMDS.....	22
2.3. INFLUENCIA DE DEXAMETASONA EN EL EFECTO DE IMIDS	23
2.3.1 Dexametasona.....	23
2.3.2 Administración conjunta de IMIDs y Dexametasona.....	24
3. MECANISMO GENERALES DE RESISTENCIA A DROGAS	25
3.1. MECANISMOS CELULARES DE TRANSPORTE Y ELIMINACIÓN DE FÁRMACOS.....	26
3.1.1. Proteínas transportadoras dependientes de ATP.....	26
3.1.2. Proteínas transportadoras no dependientes de ATP.....	27
3.2. MECANISMOS DE INACTIVACIÓN DE DROGAS A TRAVÉS DE VÍAS METABÓLICAS	28
3.3. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE RECEPTORES DE TIROSINA KINASA (RKT).....	28
3.4. RESISTENCIA FARMACOLÓGICA MEDIADA POR EL CITOESQUELETO	29
3.5. RESISTENCIA FARMACOLÓGICA MEDIADA POR EL BLOQUEO DE LAS SEÑALES DE MUERTE POR APOPTOSIS.	29
3.6. RESISTENCIA FARMACOLÓGICA MEDIADA POR MECANISMO DE REPARACIÓN DEL ADN.....	30
Tesis Doctoral	III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
1. HIPÓTESIS	33
2. OBJETIVOS	34
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. LÍNEAS CELULARES	37
2. CÉLULAS PROCEDENTES DE PACIENTES	37
3. ESTUDIOS “IN VIVO”	39
3.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS	39
3.2. INDUCCIÓN DEL PLASMOCITOMA (TUMOR)	39
3.3. VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO	40
3.4. MONITORIZACIÓN DEL ENSAYO.....	41
3.5. EXPERIMENTOS “IN VIVO” REALIZADOS.....	41
3.5.1. Actividad anti-MM de los IMIDs.....	41
3.5.2. Estudio de la resistencia adquirida a IMIDs + Dexametasona en un modelo de MM.....	42
4. MEDIDA DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	44
4.1. MTT	44
4.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD TRAS CO-CULTIVO CON CÉLULAS DE ESTROMA DE MÉDULA ÓSEA	45
5. ESTUDIOS DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA	46
5.1. ANEXINA V-IODURO DE PROPIDIO	46
5.1.1. Estudio en líneas celulares y células extraídas de plasmocitoma de ratón.....	47
5.1.2. Estudios “ex vivo” en células procedentes de pacientes.....	48
5.2. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	51
6. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR	52
7. ESTUDIOS DE COMBINACIÓN DE DROGAS	53

8. WESTERN BLOT	55
8.1. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA	55
8.2. CUANTIFICACIÓN PROTÉICA DE LOS EXTRACTOS CELULARES	55
8.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA	56
8.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A UNA MEMBRANA DE PVDF	57
8.5. BLOQUEO, MARCAJE CON ANTICUERPOS Y REVELADO	58
9. MICROARRAYS DE ARN	59
9.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	59
9.2. PURIFICACIÓN DEL ARN	60
9.3. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL ARN	60
9.4. PROCEDIMIENTO DESARROLLADO DE GENE 1.0 ST Y EXON ST ARRAYS DE AFFYMETRIX	61
9.4.1. Preparación de las diluciones de controles Poly-A	62
9.4.2. Síntesis primera cadena ADNc (1º Ciclo)	62
9.4.3. Síntesis segunda cadena ADNc (1ºCiclo):	62
9.4.4. Síntesis ARNc	63
9.4.5. Síntesis ADNc (2ºCiclo)	63
9.4.6. Hidrólisis y limpieza de ADN SS (+)	64
9.4.7. Fragmentación del ADN SS (+)	64
9.4.8. Marcaje del ADN fragmentado	65
9.4.9. Hibridación del array (I)	65
9.4.10. Hibridación del array (II)	66
9.5. ANÁLISIS DE DATOS	66
10. ESTUDIOS DE INMUNOFENOTIPO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	67
10.1. PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	67
RESULTADOS	69
1. CAPÍTULO I. COMPARACIÓN DE LA EFICACIA Y MECANISMO DE ACCIÓN DE DOS FÁRMACOS INMUNOMODULADORES (LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA) SOBRE CÉLULAS MIELOMATOSAS	71

1.1. ANÁLISIS DE LA EFICACIA EN LÍNEAS CELULARES DE MM.....	71
1.1.1. <i>Actividad de ambos IMiDs en monoterapia en líneas celulares de Mieloma Múltiple..</i>	71
1.1.2. <i>Actividad de ambos IMiDs en combinación con Dexametasona en líneas celulares.....</i>	74
1.2. ANÁLISIS DE LA EFICACIA EN CÉLULAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON MM	78
1.2.1. <i>Actividad ““ex vivo”” de ambos de IMiDs en monoterapia en células procedentes de pacientes</i>	78
1.2.2. <i>Actividad ““ex vivo”” de ambos IMiDs en combinación con Dexametasona en células procedentes de pacientes.....</i>	79
1.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS IMiDs, INDIVIDUALMENTE O EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA, EN PRESENCIA DEL MICROMEDIOAMBIENTE.....	81
1.4. ESTUDIO DE LA EFICACIA “IN VIVO”.....	88
1.5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTUACIÓN DE LOS IMiDs EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA.....	92
1.5.1. <i>Análisis del efecto sobre la apoptosis</i>	92
1.5.2. <i>Análisis del efecto sobre el ciclo celular.....</i>	99
1.6. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	102
1.6.1. <i>Comparación de los genes desregulados por Lenalidomida y Pomalidomida.....</i>	103
1.6.2. <i>Efecto de la Dexametasona en la expresión génica y su aportación a la combinación con IMiDs</i>	106
2. CAPÍTULO II. COMBINACIONES DE IMiDs CON OTROS FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DEL MIELOMA MÚLTIPLE	111
2.1. COMBINACIONES CON FÁRMACOS CONVENCIONALES	111
2.2. COMBINACIONES CON FÁRMACOS E INVESTIGACIÓN	113
2.3. COMBINACIONES DE AMBOS IMiDs MÁS DEXAMETASONA MÁS BORTEZOMIB EN CÉLULAS PROCEDENTE DE PACIENTES	115
3. CAPÍTULO III: ANÁLISIS “IN VIVO” DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA RESISTENCIA ADQUIRIDA A LAS COMBINACIONES DE IMiDs + DEXAMETASONA	118
3.1. GENERACIÓN DE UN MODELO “IN VIVO” DE RESISTENCIA ADQUIRIDA A FÁRMACOS ANTI-MIELOMA	

3.1.1 Demostración de la Resistencia “in vivo” a las combinaciones de IMIDs más Dexametasona	
119	
3.1.2 Demostración “ex vivo” de la resistencia generada en el modelo “in vivo”	121
3.2. AUSENCIA DE RESISTENCIAS CRUZADAS ENTRE LENALIDOMIDA + DEXAMETASONA Y	
POMALIDOMIDA + DEXAMETASONA.....	122
3.2.1 PD y LD son capaces de vencer la resistencia adquirida “in vivo” a la combinación	
alternativa	124
3.2.2. Confirmación “ex vivo” de la ausencia de resistencia cruzada entre ambos IMIDs en	
combinación con dexametasona demostrada en el modelo “in vivo”	125
3.2.3. PD es más potente en cuanto a reversión de la resistencia a LD que la situación contraria	
128	
3.2.4. Estudio de la eficacia de un tratamiento alternante con Lenalidomida + Dexametasona y	
Pomalidomida + Dexametasona.....	130
3.3. ESTUDIO DE LA POTENCIAL REVERSIBILIDAD DE LA RESISTENCIA A LAS COMBINACIONES DE IMIDs	
MÁS DEXAMETASONA TRAS UN PERIODO DE LAVADO SIN EL TRATAMIENTO.....	132
3.3.1. La resistencia generada a LD y PD es reversible tras un periodo sin recibir dicho	
tratamiento.....	132
3.3.2. PD muestra nuevamente mayor potencia que LD en el segundo cambio de tratamiento	
134	
3.3.3. Confirmación “ex vivo” de la reversibilidad de la resistencia observada en los	
experimentos “in vivo”	135
3.3.4. Comparación de la eficacia a LD o a PD tras los sucesivos cambios de tratamiento.....	137
4. CAPÍTULO IV: ANÁLISIS “IN VIVO” DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS AL	
DESARROLLO DE LA RESISTENCIA ADQUIRIDA A LAS COMBINACIONES DE IMIDs +	
DEXAMETASONA.....	139
4.1 ANÁLISIS DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LOS TUMORES RESISTENTES.....	139
4.2. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN (VÍA DE MEK/ERK) EN EL	
DESARROLLO DE RESISTENCIAS A IMIDs MÁS DEXAMETASONA.....	140
4.3. EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS TUMORES SENSIBLES A	
LENALIDOMIDA Ó POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA FRENTE A SU CONTRAPARTIDA RESISTENTE	144
Tesis Doctoral	VII

4.3.1. Análisis del perfil de expresión génica de las células sensibles y resistentes al tratamiento con Lenalidomida más Dexametasona.....	145
4.3.2. Análisis del perfil de expresión génica de las células sensibles y resistentes al tratamiento con Pomalidomida más Dexametasona	149
DISCUSIÓN.....	163
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	177

Índice de Tablas

TABLA 1. FRECUENCIA DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS DETECTADAS EN EL MM.	5
TABLA 2. PRINCIPALES CAMBIOS NUMÉRICOS Y ESTRUCTURALES EN EL CARIOTIPO DE CP DE PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE.....	8
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE TALIDOMIDA Y SUS ANÁLOGOS: LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA ¹⁰³	18
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.....	38
TABLA 5. IC PARA EL PROGRAMA CALCUSYN.....	54
TABLA 6. PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	68
TABLA 7. PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA E ÍNDICES DE COMBINACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE LENALIDOMIDA O POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA A DISTINTAS DOSIS Y TIEMPOS	77
TABLA 9. CLASIFICACIÓN DE LOS GENES DESREGULADOS POR POMALIDOMIDA A 5 DÍAS DE TRATAMIENTO	105
TABLA 10. CLASIFICACIÓN DE LOS GENES MÁS REPRESENTATIVOS DESREGULADOS EN LA COMPARACIÓN LD Y PD.....	109
TABLA 11. FUNCIONES MOLECULARES DE ALGUNOS DE LOS 166 GENES COMUNES SPDvRPD vs SPDvCPD.....	151

Índice de Figuras

FIGURA 1. INTERACCIÓN ENTRE LA CÉLULA MIELOMATOSA Y EL MICROMEDIOAMBIENTE.....	11
FIGURA 2. MECANISMOS RESPONSABLES DEL EFECTO TUMORICIDA DE LENALIDOMIDA ¹⁰³	20
FIGURA 3. EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LENALIDOMIDA ¹⁰³	22
FIGURA 4. ESQUEMA DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE DEXAMETASONA.	24
FIGURA 5. MECANISMO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ¹²⁶	26
FIGURA 6. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	47
FIGURA 7. MEDIDA DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE PACIENTES.....	50
FIGURA 8. ANÁLISIS DEL POTENCIAL MITOCONDRIAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.	51
FIGURA 9. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	53
FIGURA 10. CUANTIFICACIÓN DE ARN Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD.	61
FIGURA 11. EFECTO DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA EN MM1S A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TIEMPOS.....	72
FIGURA 12. DOSIS RESPUESTA DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA TRAS 5 DÍAS DE TRATAMIENTO EN DIFERENTES LÍNEAS DE MM.	73
FIGURA 13. TIEMPO RESPUESTA DE LA COMBINACIÓN DE LENALIDOMIDA + DEXAMETASONA	75
FIGURA 14. TIEMPO RESPUESTA DE LA COMBINACIÓN DE LENALIDOMIDA + DEXAMETASONA.	76
FIGURA 15. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN MONOTERAPIA, SOBRE CÉLULAS PLASMÁTICAS PROCEDENTES DE PACIENTES.	78
FIGURA 16. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN MONOTERAPIA, SOBRE LINFOCITOS NORMALES PROCEDENTES DE PACIENTES.	79
FIGURA 17. EFECTO DE LENALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN CÉLULAS PROCEDENTES DE PACIENTES.	80
FIGURA 18. EFECTO DE POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN CÉLULAS PROCEDENTES DE PACIENTES.	80
FIGURA 19. EFECTO DE LENALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN LINFOCITOS NORMALES PROCEDENTES DE PACIENTES.	81
FIGURA 20. EFECTO DE POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN LINFOCITOS NORMALES PROCEDENTES DE PACIENTES.	81
FIGURA 21. EFECTO DE LENALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IGF-1.....	82
Tesis Doctoral	IX

FIGURA 22. EFECTO DE POMALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IGF-1.	82
FIGURA 23. EFECTO DE LENALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IL-6.....	83
FIGURA 24. EFECTO DE POMALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IL-6.....	83
FIGURA 25. EFECTO DE LENALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S-LUC EN CONTACTO CON BMSC.	84
FIGURA 26. EFECTO DE POMALIDOMIDA EN CÉLULAS MM1S-LUC EN CONTACTO CON BMSC.....	84
FIGURA 27. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IGF-1.	85
FIGURA 28. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE IGF-1.	85
FIGURA 29. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA EN CÉLULAS MM1S EN PRESENCIA DE BMSC.	86
FIGURA 30. EFECTO DE LENALIDOMIDA SOBRE CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA.	86
FIGURA 31. EFECTO DE POMALIDOMIDA SOBRE CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA.....	87
FIGURA 32. EFECTO DE AMBOS IMIDS EN COMBINACIÓN CON DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA.	87
FIGURA 33. EVOLUCIÓN DEL TAMAÑO TUMORAL DE LOS RATONES TRATADOS.....	90
FIGURA 34. SUPERVIENCIA DE LOS RATONES TRATADOS.	91
FIGURA 35. EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS RATONES TRATADOS.	92
FIGURA 36. DOSIS RESPUESTA POR ANEXINA-V DE AMBOS IMIDS EN CÉLULAS MM1S TRAS 5 DÍAS DE TRATAMIENTO	93
FIGURA 37. TIEMPO RESPUESTA DE AMBOS IMIDS A DOSIS 1 μ M EN CÉLULAS MM1S.....	93
FIGURA 38. TIEMPO RESPUESTA POR ANEXINA-V DE LA COMBINACIÓN DE AMBOS IMIDS (1 μ M) CON DEXAMETASONA (2 nM) EN CÉLULAS MM1S.....	94
FIGURA 39. ANÁLISIS MEDIANTE WB DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA APOPTOSIS TRAS TRATAMIENTO CON LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA (1 μ M) CON O SIN DEXAMETASONA (2 nM) Y A 1, 3 Y 5 DÍAS DE TRATAMIENTO	96
FIGURA 40. ACTIVIDAD PRO-APOPTÓICA DE AMBOS IMIDS CON DEXAMETASONA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE DIFERENTES CASPASAS.	97
FIGURA 41. EFECTO DE AMBOS IMIDS CON DEXAMETASONA A DIFERENTES TIEMPOS EN LA PÉRDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	98
FIGURA 42. EFECTO DE AMBOS IMIDS CON DEXAMETASONA SOBRE EL CICLO CELULAR DE MM1S.....	100
FIGURA 43. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL CICLO CELULAR MEDIANTE WB.	101

FIGURA 44. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES DESREGULADOS POR EL TRATAMIENTO DE IMIDS EN MONOTERAPIA A TIEMPOS CORTOS.	103
FIGURA 45. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES DESREGULADOS POR EN TRATAMIENTO DE IMIDS EN MONOTERAPIA A TIEMPOS TARDÍOS.	104
FIGURA 45. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES DESREGULADOS POR LENALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN COMPARACIÓN CON LENALIDOMIDA Y DEXAMETASONA POR SEPARADO.	107
FIGURA 46. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENES DESREGULADOS POR POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA EN COMPARACIÓN CON POMALIDOMIDA Y DEXAMETASONA POR SEPARADO.	108
FIGURA 47. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA COMPARACIÓN DE LOS GENES DESREGULADOS POR LENALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA VS POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA.	109
FIGURA 48. COMBINACIONES DOBLES DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA CON FÁRMACOS CONVENCIONALES.	112
FIGURA 49. COMBINACIONES TRIPLES DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA CON FÁRMACOS CONVENCIONALES.	113
FIGURA 50. COMBINACIONES DOBLES DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA CON FÁRMACOS EN INVESTIGACIÓN.....	114
FIGURA 51. COMBINACIONES TRIPLES DE LENALIDOMIDA Y POMALIDOMIDA CON FÁRMACOS EN INVESTIGACIÓN.....	115
FIGURA 52. COMBINACIÓN TRIPLE DE LENALIDOMIDA, DEXAMETASONA Y BORTEZOMIB EN CÉLULAS DE PACIENTES.	116
FIGURA 53. COMBINACIÓN TRIPLE DE POMALIDOMIDA, DEXAMETASONA Y BORTEZOMIB EN CÉLULAS DE PACIENTES.	117
FIGURA 54. TIEMPO HASTA LLEGAR A UN VOLUMEN TUMORAL DE 500 MM ³ (TT500) EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO.	120
FIGURA 55. CINÉTICA DE CRECIMIENTO TUMORAL DE LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO UNA VEZ QUE LOS TUMORES LLEGAN A 500 MM ³	120
FIGURA 56. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD/RESISTENCIA “EX VIVO” A LD Y PD EN CÉLULAS EXTRAÍDAS DE TUMORES RESISTENTES “IN VIVO” A LD Y PD RESPECTIVAMENTE.	122
FIGURA 57. EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN TUMORAL DE 5 TUMORES RESISTENTES A LD Y QUE PASARON A SER TRATADOS CON PD.	123
FIGURA 58. EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN TUMORAL DE 5 TUMORES RESISTENTES A PD Y QUE PASARON A SER TRATADOS CON LD.....	123
FIGURA 59. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE LOS TUMORES RESISTENTES A LD QUE CONTINUARON TRATAMIENTO CON LD O QUE CAMBIARON A PD.	124
Tesis Doctoral	XI

FIGURA 60. EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE LOS TUMORES RESISTENTES A PD QUE CONTINUARON TRATAMIENTO CON PD O QUE CAMBIARON A LD.	125
FIGURA 61. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD “EX VIVO” DE CÉLULAS RESISTENTES “IN VIVO” A LD (IZQUIERDA) O PD (DERECHA) AL TRATAMIENTO CON LD.....	126
FIGURA 62. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD “EX VIVO” DE CÉLULAS RESISTENTES “IN VIVO” A LD (IZQUIERDA) O PD (DERECHA) AL TRATAMIENTO CON PD.....	127
FIGURA 63. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE LOS TUMORES TRAS EL CAMBIO A PD O TRAS EL CAMBIO A LD.....	128
FIGURA 64. MÁXIMA RESPUESTA ALCANZADA EN TÉRMINOS DE % DEL VOLUMEN INICIAL EN RATONES RESISTENTES A PD Y TRATADOS CON LD Y EN RATONES RESISTENTES A LD TRATADOS CON PD. ...	129
FIGURA 65. TTP DE RATONES RESISTENTES A PD Y TRATADOS CON LD Y EN RATONES RESISTENTES A LD TRATADOS CON PD.....	130
FIGURA 66. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL EN RATONES TRATADOS DE FORMA CONTINUA CON LD Y PD Y AQUELLOS TRATADOS DE FORMA ALTERNANTE CON DICHAS COMBINACIONES.....	131
FIGURA 67. COMPARACIÓN DEL TTP DE LOS RATONES TRATADOS DE FORMA CONTINUA CON LD Y PD Y DE LOS TRATADOS DE FORMA ALTERNANTE CON DICHAS COMBINACIONES.	132
FIGURA 68. COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE LOS TUMORES TRAS EL SEGUNDO CAMBIO A PD O A LD.....	133
FIGURA 69. MÁXIMA RESPUESTA ALCANZADA EN TÉRMINOS DE % DEL VOLUMEN INICIAL EN RATONES TRATADOS CON PD Y LD EN UN SEGUNDO CAMBIO DE TRATAMIENTO.	134
FIGURA 70. TTP DE RATONES TRATADOS CON PD Y LD EN UN SEGUNDO CAMBIO DE TRATAMIENTO.....	135
FIGURA 71. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD/RESISTENCIA “EX VIVO” DE LAS CÉLULAS QUE HABÍAN DESARROLLADO RESISTENCIA “IN VIVO” A LD O A PD.....	136
FIGURA 72. EVOLUCIÓN COMPARATIVA DEL CRECIMIENTO TUMORAL TRAS EL PRIMER Y SEGUNDO CAMBIOS DE TRATAMIENTO A LD O A PD.	137
FIGURA 73. COMPARACIÓN DE LA MÁXIMA RESPUESTA A LD Y A PD TRAS EL PRIMER Y SEGUNDO CAMBIOS DE TRATAMIENTO.	138
FIGURA 74. COMPARACIÓN DEL TTP DE LD Y DE PD TRAS EL PRIMER Y SEGUNDO CAMBIOS DE TRATAMIENTO.	138
FIGURA 75. ANÁLISIS DEL PERFIL FENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS PREIMPLANTACIÓN, DE LOS PLASMOCITOMAS NO TRATADOS Y DE LOS TUMORES RESISTENTES.....	140
FIGURA 76. WESTERN-BLOT DE P-AKT EN TUMORES CONTROLES, SENSIBLES A LD O PD Y RESISTENTES A LD O PD.....	141

FIGURA 77. WESTERN-BLOT DE DIFERENTES COMPONENTES DE LA VÍA DE MEK/ERK EN TUMORES CONTROLES, SENSIBLES A LD O PD Y RESISTENTES A LD O PD.....	142
FIGURA 78. COMBINACIONES DE IMIDS Y DEXAMETASONA MÁS PD98059 A 3 DÍAS DE TRATAMIENTO ..	143
FIGURA 79. COMBINACIONES DE IMIDS Y DEXAMETASONA MÁS PD98059 A 5 DÍAS DE TRATAMIENTO ..	143
FIGURA 80. ESQUEMA DEL ANÁLISIS REALIZADO DE LOS CAMBIOS A NIVEL GENÓMICO ENTRE LOS TUMORES SENSIBLES Y RESISTENTES A LENALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA Y POMALIDOMIDA MÁS DEXAMETASONA ASÍ COMO EN TUMORES CONTROL SIN TRATAMIENTO.....	144
FIGURA 81. DIAGRAMAS DE VENN PARA LAS MUESTRAS CONTROL, SENSIBLES Y RESISTENTES A LD.	146
FIGURA 82. GENES DESREGULADOS EXCLUSIVAMENTE POR EL TRATAMIENTO DE LENALIDOMIDA CON DEXAMETASONA.	147
FIGURA 83. ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO SUPERVISADO DE LAS MUESTRAS CONTROL, SENSIBLES Y RESISTENTES A LD.....	148
FIGURA 84. DIAGRAMAS DE VENN PARA LAS MUESTRAS CONTROL, SENSIBLES Y RESISTENTES A PD.....	150
FIGURA 85. GENES DESREGULADOS COMÚNMENTE ENTRE LA PRIMERA Y SEGUNDA COMPARACIÓN.	151
FIGURA 87. GENES DESREGULADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE SPD Y CPD.....	153
FIGURA 88. ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO SUPERVISADO DE LAS MUESTRAS TRATADAS CON PD.....	154
FIGURA 89. RUTA BIOLÓGICA DE 35 GENES DESREGULADOS DIFERENCIALMENTE ENTRE SPD Y RPD.....	155
FIGURA 90. CICLINAS DEPENDENTES DE QUINASA DESREGULADAS POR TRATAMIENTO CON PD.	157
FIGURA 91. CDC DESREGULADAS POR TRATAMIENTO CON PD.....	158
FIGURA 92. PSM DESREGULADAS POR TRATAMIENTO CON PD.....	159
FIGURA 93. PSM DESREGULADAS POR TRATAMIENTO CON PD.....	160
FIGURA 94. GENES DE RESISTENCIA A LD.....	161
FIGURA 95. GENES DE RESISTENCIA A PD.	161
FIGURA 96. GENES DE METABOLISMO A LD	162
FIGURA 97. GENES DE METABOLISMO A PD.	162

INTRODUCCIÓN

Conceptos previos

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B clonales caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CP) malignas en la médula ósea (MO). Las células mielomatosas secretan una inmunoglobulina de carácter monoclonal que puede ser detectada en el suero y/u orina, y a su vez, como consecuencia de su interacción con el micromedioambiente de la MO, desencadenan un aumento de la actividad osteoclástica que se traduce en la presencia de lesiones óseas ¹⁻⁴.

El MM representa el 1% de todas las neoplasias y aproximadamente el 10% de las hemopatías malignas. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 65 años. Su incidencia se sitúa en torno a 4 casos por cada 100.000 habitantes y año ⁵. La mediana de supervivencia de los pacientes con MM es de unos 3 años. No obstante, el curso de la enfermedad puede ser muy variable, desde casos muy agresivos hasta otros con un comportamiento indolente con supervivencias superiores a 10 años ^{3, 5-6}.

El tratamiento del MM está determinado fundamentalmente por la edad y por el estado general del paciente. El empleo de melfalán, bien aislado o combinado con prednisona, representó el primer avance importante en el tratamiento de esta enfermedad, aunque solo una minoría de los pacientes alcanzaba remisión completa (RC) (5%), e inevitablemente, en todos los casos se producían recaídas con una mediana de supervivencia aproximada de 2-3 años ^{3, 7-8}. El empleo de combinaciones de fármacos como Melfalán, Vincristina, Ciclofosfamida, Prednisona, BCNU (Carmustina) y Adriamicina, seguido de altas dosis de quimioterapia (principalmente Melfalán) con rescate de progenitores hematopoyéticos autólogos, ha ampliado las expectativas en el tratamiento del MM ya que se han conseguido remisiones completas en el 10 -40% de los casos, con una supervivencia global (SG) de 54-58 meses ^{3, 8-14}.

La aparición de nuevos fármacos con eficacia anti-mieloma ha supuesto un cambio radical en el tratamiento de esta enfermedad. El primero de todos ellos fue la Talidomida que a finales de los 90 demostró capacidad de inducir respuestas en un tercio de los pacientes resistentes¹⁵⁻¹⁷. Posteriormente se descubrió que la inhibición del proteosoma, a través de un fármaco denominado Bortezomib también era capaz de rescatar hasta un 40% de enfermos refractarios incluso a Talidomida y trasplante, con una supervivencia libre de progresión superior a 6 meses¹⁸⁻¹⁹. El tercer fármaco aprobado para tratamiento de mieloma en recaída o refractarios ha sido la Lenalidomida, que en combinación con Dexametasona logra un 60% de respuestas y una supervivencia libre de progresión cercana al año²⁰⁻²¹.

Estos resultados propiciaron la investigación de estos fármacos también en enfermos de nuevo diagnóstico, tanto en candidatos a trasplante como en pacientes mayores de 65-70 años, con resultado muy prometedores en ambos casos²²⁻²³.

No obstante, a pesar de estos avances, el MM sigue siendo una enfermedad incurable, debido a la aparición de refractariedad, en ocasiones primaria pero generalmente secundaria. Por ello, profundizar en los mecanismos de resistencia es uno de los objetivos prioritarios de muchos grupos de investigación.

1. PATOGENIA DEL MIELOMA MÚLTIPLE

1.1. Bases moleculares

Los estudios moleculares han contribuido a aclarar el posible origen de las células tumorales del MM ²⁴⁻²⁵. Sin embargo, el nivel en que se produce la transformación neoplásica de la célula tumoral del MM continúa siendo objeto de controversia. La célula que predomina en la médula ósea de los pacientes con MM es la célula plasmática, que constituye el último eslabón de la diferenciación linfóide B.

La transformación de un linfocito normal en una célula B mielomatososa requiere de dos tipos de eventos oncogénicos: primarios y secundarios como se puede ver en la Tabla 1. Las traslocaciones primarias serían responsables de la yuxtaposición de un oncogen y el gen de las cadenas pesadas (IgH) de las inmunoglobulinas (Igs), que actuaría como potenciador (“enhancer”). Estas traslocaciones se originan a partir de errores durante el proceso fisiológico de recombinación del DNA, principalmente en el momento del cambio de isotipo de la IgH, e incluyen tres grandes grupos: 1) las traslocaciones que implican ciclinas: D1 (en 11q23), D3 (en 6q21) y D2 (en 12p13), que están presentes en el 20-25% de los MM; 2) las que involucran a dos genes codificados en 4p16: MMSET (*Multiple Myeloma SET domain protein*) y FGFR3 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-3*), que están traslocados en el 15% de MM; y 3) las que implican a dos factores de transcripción: C-maf (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma oncogene homolog*) (en 16q23) y maf-B (en 20q11), traslocados en el 10% de MM. En el resto de los casos o no se conoce o no se produce una traslocación en IgH o IgL ²⁶.

Tabla 1. Frecuencia de las principales alteraciones citogenéticas detectadas en el MM.

Alteraciones	Genes involucrados	Frecuencia
Traslocaciones de <i>IGH</i>		50-73%
t(11;14)	<i>CCND1/IGH</i>	15%
t(4;14)	<i>FGFR3-MMSET/IGH</i>	15%
t(14;16)	<i>IGH/CMAF</i>	5%
t(6;14)	<i>CCND3/IGH</i>	3%
t(14;20)	<i>IGH/MAFB</i>	2%
Monosomía/Del 13	<i>RB1</i>	30-55%
Delección de 17p13	<i>P53</i>	10%

Los eventos oncogénicos secundarios se caracterizan por la aparición de inestabilidad cariotípica, deleciones (*Rb*: Retinoblastoma) o mutaciones génicas (*Ras*), o nuevas traslocaciones que habitualmente afectan a genes diferentes del locus de las Igs, aunque también puedan involucrar la región 14q32, como es el caso de algunas traslocaciones de *c-myc* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) (t(8;14), t(2;8), t(8;22))²⁶.

La progresión tumoral del MM está asociada con traslocaciones cromosómicas secundarias, de las cuales *c-myc* representa el paradigma. Las traslocaciones secundarias en *c-*, *n-*, o *l-myc*, que están asociadas con el aumento de expresión del gen *myc*, están presentes en una baja frecuencia en tumores de MM intramedulares, pero ocurren en cerca del 50% de los tumores avanzados, y están presentes en casi todas las líneas celulares de MM. Esta desregulación de un gen *myc* podría estar asociada a que la célula mielomatososa progrese a un fenotipo más agresivo y proliferativo²⁷. Aunque las implicaciones clínicas y pronósticas de las alteraciones de *myc* son desconocidas, ya que se trata de alteraciones poco frecuentes y no hay un número suficiente de casos como

para extraer conclusiones definitivas al respecto, las alteraciones de *c-myc* en cariotipos complejos se correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad y probablemente tengan una incidencia negativa en la supervivencia, ya que se sospecha que representan eventos de progresión tardíos que son más frecuentes en subgrupos de mielomas con cariotipos anormales, que tienen un índice de proliferación elevado, y un pronóstico más adverso²⁸⁻²⁹.

Por último, se han descrito un número importante de alteraciones cromosómicas recurrentes, tanto numéricas como estructurales, como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales cambios numéricos y estructurales en el cariotipo de CP de pacientes con Mieloma Múltiple.

Cambios numéricos	
Ganancias: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 18, 19, 21	
Pérdidas: 8, 13 (total o parcial), 14, 16, 22, X, Y	
Cambios estructurales	
1	trisomías parciales
1p	deleciones
14q	t(11;14)(q13;q32)
	t(8;14)(q24;q32)
8q	t(8;14)(q24;q32)
	t(8;22)(q24;q11)
	t(2;8)(p12;q24)
11q	t(11;14)(q13;q32)
	Ganancias
6q	Deleciones
16p ó 16q	t(1;16)(q11;q11)
22q11	deleciones
19q y 19p	traslocaciones

Obtenido de: Dewald et al, 1985; Gould et al, 1988; Taniwaki et al, 1994; Lai et al, 1995; Weh et al, 1995; Calasanz et al, 1997; Tricot et al, 1997; Seong et al, 1998; Smadja et al, 1998; Gutierrez et al, 2000; Smadja et al, 2001; Debes-Marun et al, 2003; Pantou et al, 2005.

Algunas de estas anomalías moleculares constituyen potenciales dianas terapéuticas. Así, por ejemplo, la activación de FGFR3, que se produce como consecuencia de la t(4;14) y las mutaciones de Ras (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene*)³⁰, provocan la activación de vías de señalización proliferativas como la vía de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) / Erk 1/2 (*Extracellular Signal-*

Regulated Kinase-1/2) y antiapoptóticas como la vía de PI3K (*Phosphatidyl Inositol-3 kinase*) / Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene*). Dichas alteraciones moleculares podrían contrarrestarse mediante el uso de inhibidores de quinasas y de farnesil transferasas, respectivamente.

1.2. Interacción entre la célula mielomatosa y el micromedioambiente

El micromedioambiente de la MO está formado por proteínas de la matriz extracelular, y por diferentes poblaciones celulares: células estromales, células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos y linfocitos³¹⁻³². Durante el proceso de maduración, las células B van adquiriendo una amplia variedad de moléculas de adhesión que facilitan su regreso a la MO para continuar su diferenciación³³⁻³⁴. Una vez en la MO, las moléculas de adhesión median la interacción con otras células plasmáticas, con la matriz extracelular y con las células estromales de la MO (BMSC: *Bone Marrow Stromal Cells*)³³⁻³⁴. En el MM, la expresión de las moléculas de adhesión cambia a lo largo del curso de la enfermedad y esto puede favorecer la migración de la célula mielomatosa de la MO a la sangre periférica, como sucede en la variante más agresiva representada por la leucemia de células plasmáticas³³⁻³⁴.

La adhesión de las células de mieloma al estroma de la MO está mediada por la unión de varios tipos de receptores de membrana como CD44, CD54/ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), CD56/VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) y CD138/Syndecan-1 con sus ligandos: LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), MUC-1 (*Mucin-1-Transmembrane*), VLA-5 (*Very Late Antigen 5*) y VLA-4 (*Very Late Antigen 4*). Syndecan-1 interacciona con el colágeno, y VLA-4 con la fibronectina, componentes de la matriz extracelular. La adhesión va acompañada

de la expresión de metaloproteinasas de la matriz, como MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*) que a su vez contribuye a la resorción ósea y a la movilidad de la célula mielomatosa ³⁵. Esta unión de la célula de MM a la MO induce un fenotipo asociado a resistencia a fármacos llamado CAM-DR (*Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance*), a través de distintos mecanismos: 1) Parada de ciclo celular en G1 asociado a la sobreexpresión de p27 (inhibidor de CDKs) ³³, 2) Inhibición de apoptosis mediante sobreexpresión FLIP (*FLICE Inhibitory Protein*) (inhibidor endógeno del receptor Fas (CD95) que induce apoptosis) ³³, y 3) Protección contra el daño al ADN producido eventualmente por fármacos, reduciendo la actividad topoisomerasa ³³. La unión de VLA-4 a la fibronectina induce la sobreexpresión de 53 genes, 11 de los cuales son regulados por NF- κ B (*Nuclear Factor-Kappa B*) ³³.

Estas uniones también estimulan la secreción de citocinas como la IL-6 (*Interleukin-6*) y TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) desde las células estromales ³⁶, y de IL-1 β (*Interleukin-1 β*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), IL-6 y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) desde la célula mielomatosa. Estas citocinas y factores de crecimiento juegan un papel clave en la patogénesis del MM, ya que al interactuar con los correspondientes receptores en la CP, estimulan la expansión clonal y la proliferación tumoral y favorecen la destrucción ósea (Figura 1).

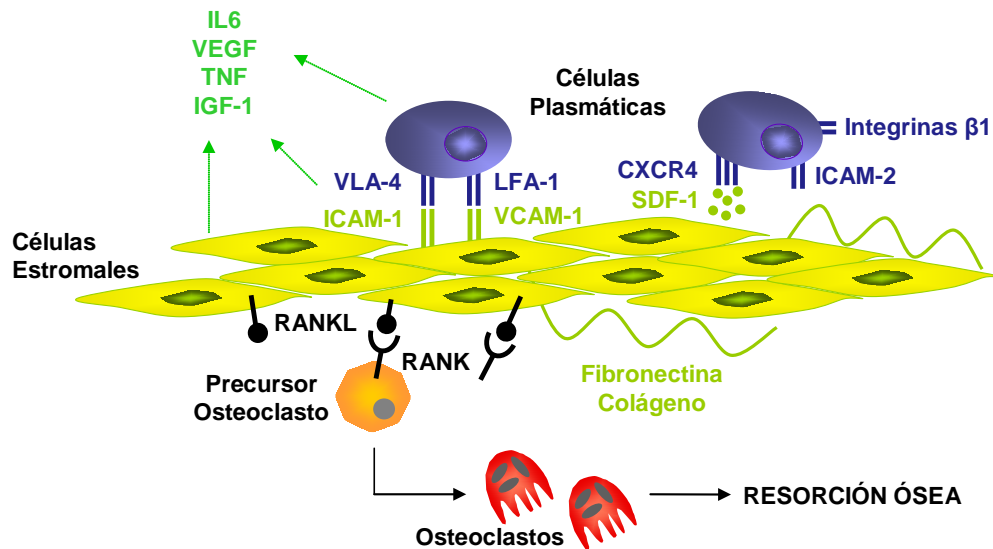


Figura 1. Interacción entre la célula mielomatososa y el micromedioambiente.

1.2.1. Factores de crecimiento y supervivencia

Interleucina-6 (IL-6)

La IL-6 es el principal factor de crecimiento y supervivencia para la célula mielomatososa y es producida principalmente por las células estromales³⁷. En MM, la IL-6 inhibe la apoptosis a través de la vía de JAK (*Janus Kinase*) / STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*)³⁸⁻³⁹, esta vía induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL (*Bcl-2 Related Protein Long Isoform*) y Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia-1*). Mcl-1 ha sido identificado como un factor crucial de supervivencia para la célula de MM⁴⁰⁻⁴¹. La IL-6 también inhibe apoptosis mediante la activación de PI3K/Akt⁴²⁻⁴³ que fosforila e inactiva a la Caspasa 9 y a Bad (*Bcl-2-Antagonist of Cell Death*) e induce proliferación y supervivencia a través de la vía de NF-κB y de la cascada de MAPK⁴⁴, activada por Ras y Raf (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene*).

Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1)

IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor-1*) es producido principalmente por los hepatocitos, pero también por los fibroblastos y osteoclastos ⁴⁵. Esta citocina ha adquirido notable relevancia en los últimos años ya que se ha descrito que induce proliferación y aumenta el efecto de la IL-6 en la célula plasmática tumoral ⁴⁶. IGF-1 activa dos vías diferentes, la cascada de las MAPKs y la de PI-3K/Akt, que median la proliferación y resistencia a drogas a través de la fosforilación de Bad (forma inactiva de la proteína proapoptótica miembro de la familia *Bcl-2*), inhibiendo la apoptosis ⁴⁷. Los pacientes con MM con baja concentración de IGF-1 en suero han demostrado tener mejor pronóstico ⁴⁸⁻⁴⁹.

Factor de necrosis tumoral de tipo α (TNF- α)

TNF- α es producido por las células plasmáticas y por las células estromales. Este factor induce la expresión de moléculas de adhesión como VLA-4 y LFA-1 en células mielomatosas y sus ligandos ICAM-1 y VCAM-1 en células estromales a través de la activación de la vía de NF- κ B. Este efecto aumenta la adhesión de la célula plasmática al micromedioambiente lo que favorece la secreción de IL-6, y la supervivencia y la protección ante estímulos apoptóticos ^{32, 50}. En el MM, se ha observado que la secreción de TNF- α es mayor en los pacientes con enfermedad ósea que en aquellos que no la tienen ^{32, 51}.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

La IL-6 secretada por las células estromales aumenta la producción y secreción de VEGF por la célula mielomatosa, y a su vez el VEGF secretado estimula la producción de IL-6 por las células estromales. La unión de las células plasmáticas a las

células estromales también induce la producción tanto de VEGF como de IL-6, sugiriendo la existencia de un asa autocrina de VEGF⁵². VEGF activa la señalización de MAPK provocando la proliferación y la migración de la célula plasmática tumoral. Tanto VEGF como IL-6, inhiben la función presentadora de antígenos de las células dendríticas contribuyendo al estado de inmunosupresión del paciente⁵⁰.

Factor derivado del estroma de tipo 1 (SDF-1 α)

SDF-1 α (*Stromal Cell Derived Factor-1*) es un factor soluble que induce proliferación a través de su unión al receptor CXCR4 (*Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4*), y la subsiguiente activación de la vía de PKC (*Protein Kinase-C*). Esto aumenta la síntesis de metaloproteasas en la célula plasmática y la secreción de IL-6 y de VEGF en las células estromales, actuando como quimio-receptor y manteniendo a la célula de MM en el micromedioambiente de la MO⁵³.

1.3. Factores pronósticos en el Mieloma Múltiple

La supervivencia de los pacientes con MM es muy variable, desde unos pocos meses hasta más de 10 años, con una mediana de 3 años^{1, 6}. Esta variabilidad está asociada a una serie de factores pronósticos, y su conocimiento es importante con una triple finalidad: (1) proporcionar una información más individualizada a cada paciente sobre el pronóstico de su enfermedad; (2) identificar grupos de riesgo con el fin de adaptar los tratamientos a cada grupo en particular; y (3) detectar asociaciones entre las características biológicas del clon tumoral y el comportamiento clínico con el fin de entender mejor la patogenia de la enfermedad.

Se dispone de una gran cantidad de información sobre las características clínicas y biológicas del MM que influyen en la supervivencia de los pacientes, aunque sólo algunas pocas constituyen factores pronósticos independientes.

1.3.1. Factores relacionados con el paciente

Uno de los principales factores pronósticos es la edad. De hecho, los pacientes entre 60-70 años tienen una supervivencia más prolongada que aquellos con mayor edad ⁵⁴⁻⁵⁵. Además se ha descrito que los pacientes menores de 40 años con una función renal normal y con niveles bajos de β 2-microglobulina tienen una mediana de supervivencia de 8 años ⁵⁶. Por otra parte, un estado general bueno (ECOG \leq 2) confiere un pronóstico favorable a los pacientes con MM ⁵⁷.

1.3.2. Factores relacionados con el clon tumoral

1.3.2.1. Morfología de la célula mielomatosa

Varios grupos han demostrado una asociación entre la morfología plasmoblástica y un peor pronóstico ⁵⁸⁻⁶² por lo que se considera que el MM plasmoblástico es una entidad particular con un comportamiento agresivo y corta supervivencia ⁶³. Asimismo, la presencia de un patrón difuso de infiltración de la MO también se ha relacionado con un peor pronóstico ⁶⁴.

1.3.2.2. Índice proliferativo de la célula plasmática

La capacidad proliferativa de la célula mielomatosa evaluada mediante el índice proliferativo ha demostrado ser uno de los factores pronósticos más importantes en los pacientes con MM ⁶⁵⁻⁶⁸. Las mutaciones de RAS y los niveles elevados del receptor soluble

de la IL-6 contribuyen a un mayor índice proliferativo de la célula plasmática tumoral y a una menor supervivencia ⁶³. Aunque algunos estudios han sugerido que su efecto adverso desaparece con altas dosis de quimioterapia ¹, otros señalan que un índice proliferativo alto, así como la presencia de CP circulantes en SP se asocia con una supervivencia más corta tras trasplante autólogo ⁶⁹⁻⁷⁰. La presencia de CP con elevada tasa proliferativa en SP probablemente refleja la independencia de señales de crecimiento por parte de las CP en las fases terminales de la enfermedad, lo que condiciona un pronóstico más adverso ⁷⁰⁻⁷¹.

1.3.2.3. Alteraciones citogenéticas

Los estudios citogenéticos desempeñan un importante papel en la evaluación pronóstica de numerosas neoplasias hematológicas, especialmente de las leucemias agudas mieloblásticas y linfoblásticas, y en muchos casos proporcionan una información decisiva en la toma de decisiones terapéuticas ⁷²⁻⁷³. Sin embargo, debido a la dificultad que entraña el análisis citogenético en el MM, por la escasez en el número de metafases de las células plasmáticas mielomatosas, los estudios con conclusiones relevantes sobre la influencia de las alteraciones citogenéticas en la evolución y pronóstico de estos pacientes son escasos ⁷⁴⁻⁷⁵. Los estudios más recientes, en los que el análisis citogenético se ha complementado con la técnica de HISF, han aportado una información más amplia sobre la influencia de las alteraciones genéticas en el pronóstico de esta enfermedad ⁷⁶⁻⁸⁰.

En el MM la hipodiploidia y la presencia de cariotipos complejos influyen de manera negativa en el pronóstico ⁸¹⁻⁸³. Por el contrario, las trisomías de los cromosomas 9, 11 y 17 se asocian con una mejor supervivencia ⁸⁰.

Las traslocaciones de IGH también tienen un profundo significado pronóstico en el MM. La t(11;14)(q11;q32) está asociada a una mejor supervivencia en algunos estudios, especialmente en pacientes tratados con altas dosis de quimioterapia y trasplante de

progenitores hematopoyéticos⁸⁴⁻⁸⁵ mientras que en otros trabajos se asocia con una supervivencia similar a la que tienen los enfermos sin alteraciones citogenéticas^{76, 86}. Sin embargo, dada la elevada frecuencia de la t(11;14)(q11;q32) en las líneas celulares de MM parece que en algunos casos esta traslocación puede producir un clon de crecimiento agresivo si se adquieren aberraciones genéticas secundarias⁸⁷. Las traslocaciones t(4;14)(p16;q32) y t(14;16)(q32;q23), especialmente la primera, constituyen un factor pronóstico desfavorable para los pacientes con MM tratados con dosis estándar o dosis elevadas de quimioterapia^{84, 86}. Además, según algunos resultados preliminares, la t(14;20) se asocia también con un pronóstico adverso⁸⁸.

Por otra parte, independientemente del tratamiento (dosis estándar vs dosis elevadas de quimioterapia) la delección del brazo largo del cromosoma 13 se ha asociado con una peor supervivencia y con una respuesta escasa al tratamiento^{76, 80, 89-90}. El efecto neto de la delección del cromosoma 13 en el pronóstico es mayor cuando esta alteración se observa en el cariotipo que cuando es detectada por HISF en interfase dado que las metafases anormales indican una elevada carga tumoral y un clon más proliferativo^{80, 89, 91}. Más aún, datos más recientes muestran que la delección en 13q aislada, detectada por HISF no tiene valor pronóstico⁷⁷.

Las delecciones o mutaciones del gen P53 están asociadas con progresión de la enfermedad, por lo que podrían ser .reflejo de una enfermedad más agresiva y refractaria al tratamiento. Estos pacientes tienen una supervivencia corta independientemente de la modalidad terapéutica utilizada^{76-78, 86, 92}.

Las alteraciones de C-MYC en cariotipos complejos se correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad y tienen una incidencia negativa en la supervivencia, ya que representan eventos de progresión tardíos que tienen un índice de proliferación de CP

elevado, y pronóstico más adverso²⁸⁻²⁹. Las mutaciones de K-RAS, pero no las de N-RAS, parecen asociarse con una supervivencia más baja⁹³.

1.3.2.4. Inmunofenotipo de la célula mielmatosa

La influencia pronóstica del inmunofenotipo ha sido poco estudiada^{65, 94}. Sin embargo, algunos antígenos sí han demostrado influencia en este sentido. Así la expresión de CD19 y de inmunoglobulinas de superficie (que identifican a las CP inmaduras) están asociadas a un pronóstico desfavorable⁹⁴⁻⁹⁵. Además, la baja expresión de CD44 se han asociado con la diseminación extramedular de las CP malignas⁹⁶⁻⁹⁷, y la expresión de CD28 esta relacionada con una fase altamente proliferativa de la enfermedad^{95-96, 98}. Por el contrario la presencia de CD117 (receptor de c-kit) y CD56 se asocian con pronóstico favorable⁹⁵.

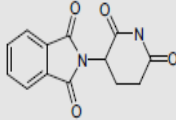
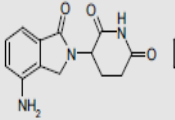
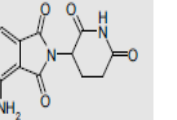
2. IMiDs en MIELOMA MÚLTIPLE

2.1. Talidomida

La talidomida es un derivado del ácido glutámico que a principios de 1960 se utilizó en mujeres embarazadas para prevenir los vómitos, y que fue responsable de uno de los mayores desastres farmacológicos de la historia (aparición de focomelia). Recientemente éste fármaco ha despertado un renovado interés debido a sus propiedades antiangiogénicas e inmunomoduladores. En el MM se empezó a utilizar basándose en ese potencial efecto antiangiogénico⁹⁹. No obstante, la talidomida tiene otros mecanismos de acción además de los dos ya mencionados: regula la expresión de moléculas de adhesión, inhibe la producción de TNF- α , estimula la proliferación de células T citotóxicas, favorece el bloqueo del ciclo celular en fase G1 e induce apoptosis¹⁰⁰⁻¹⁰². El hecho de que la talidomida no sea una fármaco citotóxico, y su potencial

sinergismo “*in vitro*” con otros agentes (especialmente dexametasona) ha motivado el diseño de múltiples combinaciones.

Tabla 3. Características de Talidomida y sus análogos: Lenalidomida y Pomalidomida¹⁰³

Characteristic	Thalidomide	Immunomodulatory compounds	
		Lenalidomide	Pomalidomide
Structure			
Plasma C _{max} , μM ^{7,8}	5.4	2.2 ^a	0.19
Tumoricidal properties Inhibition of DNA synthesis in MM.1S cell line, IC ₅₀ , μM ⁹	>100	0.1-1	0.01-0.1
Immunomodulation Interleukin-2 enhancement, EC ₅₀ , μM ¹⁰	>100	0.15	0.010
Antiangiogenesis Inhibition of sprout formation from human umbilical artery ring explants, IC ₅₀ , μM ¹¹	~0.1	~1.0	0.1-1.0

^a C_{max} reported in ng/mL.

Obtenido de Faith Davies, Rachid Baz (2010)

2.2. Análogos de la Talidomida: IMiDs

Con el fin de disminuir los efectos secundarios de la talidomida y aumentar su eficacia, se está investigado el diseño de fármacos con un mecanismo de acción análogo. La búsqueda de análogos de la Talidomida con aumento de la actividad inmunomoduladora y un mejor perfil de seguridad llevó a probar añadir un grupo amino al cuarto carbono del anillo phthaloyl de la talidomida, obteniendo análogos 4-amino (Tabla 3). Estos fármacos son conocidos como IMiDs (inmunomoduladores), poseen una potencia 50 a 200 veces superior a la de la talidomida para estimular los linfocitos T citotóxicos, y las células NK, y para disminuir la adhesión de las células plasmáticas al estroma, con la consiguiente reducción en la producción de citocinas e inducción de apoptosis^{16, 104-105}. Los resultados de un estudio multicéntrico fase II con uno de estos análogos (CC5013 o Lenalidomida)¹⁰⁶, en el que se incluyeron, 100 pacientes con MM

refractario o en recaída, que habían recibido un promedio de cuatro líneas de quimioterapia previa (incluyendo un trasplante en el 40% de los casos y talidomida en el 65%), mostró una tasa de respuestas globales del 37%, (10% RC, 12% RP, y 15% mR). Además, en el 41% de los pacientes que no habían respondido a lenalidomida, la adición de dexametasona favoreció la obtención de respuestas.

La introducción de fármacos inmunomoduladores (IMiDs) que presentan un mecanismo de acción pleiotrópico, está en línea con el enfoque actual de la terapia contra el cáncer que persigue una triple acción: la inducción de apoptosis directa frente a células tumorales malignas, la interferencia con las interacciones del tumor con el microambiente celular, y el aumento de la respuesta inmune anti-tumoral. Además de su efecto sobre el sistema inmune, los IMiDs como agentes anti-mieloma, también presentan un mecanismo anti-proliferativos y promueven la interrupción de las interacciones del Mieloma Múltiple (MM) con las células del microambiente del estroma medular (BMSC). Dado que el MM sigue siendo una enfermedad incurable, los avances futuros en el uso de estos agentes en MM deberán optimizar el “enfoque de las tres vertientes”, mediante la exploración de sinergias y alternancias entre los IMiDs, otros agentes terapéuticos nuevos y quimioterapia convencional.

2.2.1. Efectos tumorocidas de IMiDs y sobre la interacción con el microambiente

El efecto tumorocidas de los IMiDs se produce a través de varios mecanismos, incluyendo la disminución de la producción de citoquinas y de factores de crecimiento que conducen a la interrupción de la ayuda del estroma, la inducción de genes

supresores de tumores que conduzca a la parada del ciclo celular y la activación de las caspasas con inducción de apoptosis como se observa en la figura 2 ^{104, 107-109}.

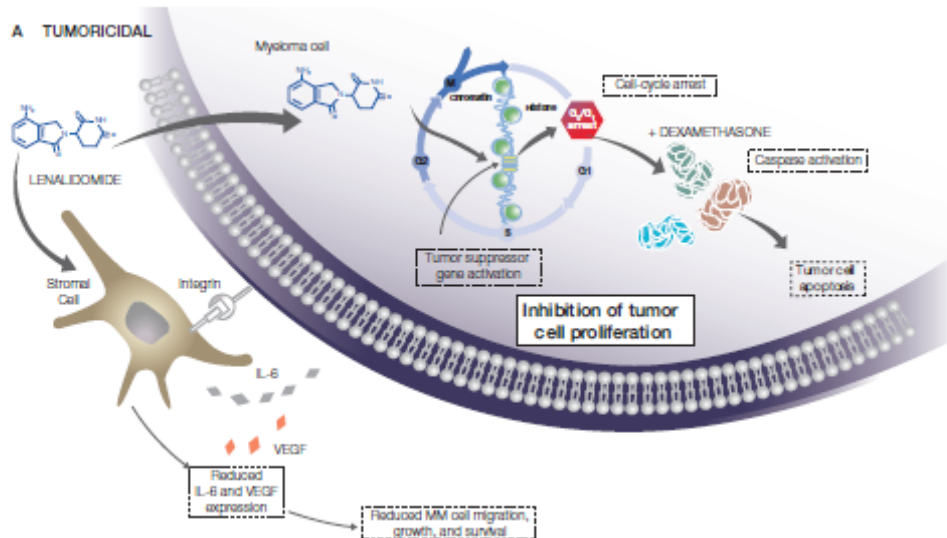


Figura 2. Mecanismos responsables del efecto Tumoricida de Lenalidomida ¹⁰³.

Obtenido de Faith Davies, Rachid Baz (2010)

Los IMiDs tienen un efecto directo sobre la proliferación de las células de MM a través de la regulación positiva de genes supresores tumorales ^{32, 109}. En un estudio realizado por Gandhi et al., la Lenalidomida inhibía el crecimiento celular tumoral por la inducción de ciclinas dependientes de kinasas (CDK), por la inhibición de p15, p16, p21 y p27, y por la respuesta temprana a los factores de transcripción EGR1, EGR2 y EGR3, en células derivadas de pacientes con MM ¹⁰⁷. Lenalidomida también indujo p15, p21, EGR1, EGR2 y EGR3 expresión en varias líneas de células MM.

Por otra parte, la Lenalidomida en combinación con Dexametasona, induce de forma sinérgica la sobreexpresión de estos genes supresores de tumores, lo que produce la inhibición de la fosforilación de la proteína retinoblastoma, la parada del ciclo celular G0/G1, y el inicio de apoptosis. Un estudio reciente ha demostrado que la mayor expresión de p21 que se produce por el tratamiento con Lenalidomida y Pomalidomida

es debida a la reducción de metilación y la acetilación de histonas en el promotor de p21, lo que aumenta el acceso de factores de transcripción al ADN ¹¹⁰.

Además, se ha demostrado que Lenalidomida y Pomalidomida activan las caspasas y sería un segundo mecanismo tumoricida. En el estudio realizado por Gandhi et al. Lenalidomida activaba caspasas 3 y 8 en diferentes grados y en diferentes células MM líneas. Por otra parte, la Lenalidomida más Dexametasona produce la activación sinérgica de las caspasas 8 y 9 y la inducción final de la apoptosis.

Por último, la interrupción de la interacción del estroma con la célula plasmática en el mieloma es, también, una importante estrategia en el tratamiento. Los IMiDs han demostrado que son capaces de disminuir la secreción de la IL-6 y de VEGF inducida por las interacciones MM y BMSC ^{104, 111}; esta acción tendría efectos posteriores en la migración celular, el crecimiento y la supervivencia de la célula mielomatosa.

2.2.2. Efectos inmunomoduladores de IMiDs

Además de los efectos tumoricidas, Lenalidomida ofrece la posibilidad de controlar la enfermedad de MM mediante la activación de la respuesta inmune. Un mecanismo por el que la Lenalidomida tiene efectos inmunomoduladores es a través de un incremento de los linfocitos CD8 + lo que origina una respuesta antígeno-específica de células T ¹¹².

Otro importante mecanismo por el cual Lenalidomida ejerce la inmunomodulación es por el aumento de las células NK ¹¹³. Lenalidomida es capaz de estimular la actividad de NK a través de los receptores Fc- γ de señalización, que, a su vez, conduce a una mayor producción de Granzima B y al aumento de la expresión de FAS-ligando en las células NK. Lenalidomida también ha demostrado tener efectos

beneficiosos sobre las células NK ¹¹⁴. Las células NK activadas por lenalidomida tienen una mayor capacidad de secretar interferón IFN γ , lo cual se asocia con la actividad antitumoral de las células NK. La figura 3 muestra una representación esquemática de estos efectos en una revisión reciente de la literatura.

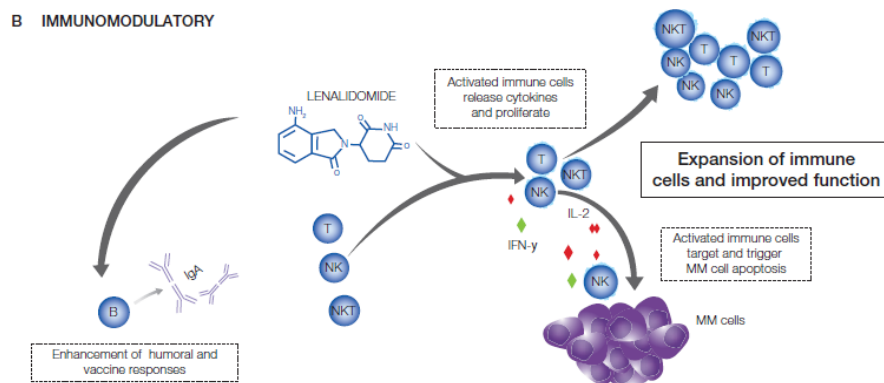


Figura 3. Efectos Inmunomoduladores de Lenalidomida ¹⁰³

Obtenido de Faith Davies, Rachid Baz (2010)

2.2.3. Diferencias en el modo de actuación de la Talidomida e IMDS

La tabla 3 proporciona una visión general de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la Talidomida y los IMDS (Lenalidomida y Pomalidomida). Es de destacar que Lenalidomida y Pomalidomida tienen un mayor efecto tumoricida que Talidomida. En un estudio “*in vitro*” en células MM1S, la síntesis de ADN se inhibió en un 50% con Pomalidomida a concentración 0.01-0.1 mM y con Lenalidomida a 0,1-1,0 nM; Sin embargo, sólo el 15% se inhibió con Talidomida a dosis de 100 mM ¹⁰⁴.

Lenalidomida también tiene un efecto más potente sobre el sistema inmune, específicamente por el aumento de la estimulación de la proliferación de células T y la producción de citoquinas ¹¹⁵. Además, este fármaco es 100-1000 veces más potente en la estimulación de la proliferación de células T e IFN- γ y en la producción de IL-2 que

Talidomida ¹¹⁶. Lenalidomida y Pomalidomida presentan perfiles de toxicidad más bajos que Talidomida, exhibiendo menor somnolencia, estreñimiento, y neuropatía periférica aunque la mielosupresión es más frecuente ¹¹⁵.

2.3. Influencia de Dexametasona en el efecto de IMiDs

2.3.1 Dexametasona

La Dexametasona ha sido tradicionalmente el fármaco más utilizado en el tratamiento del MM ¹¹⁷, pero a menudo las células plasmáticas tumorales adquieren resistencia a esta terapia ¹¹⁸. La Dexametasona induce la activación de la Caspasa-9 a través de la liberación de Smac/Diablo, pero no provoca la liberación de Citocromo-C ^{115, 119-120}. El tratamiento con dexametasona induce un aumento temprano y transitorio de los receptores de IL-6 (IL-6R) ¹¹⁹ de la célula plasmática, aumentando así la unión a la IL-6 liberada por las células estromales. IL-6 e IGF-1, estimulan el crecimiento de la célula plasmática y proporcionan resistencia frente a la muerte inducida por dexametasona, a través de la activación de las vías de MAPK y PI3K/Akt ¹²¹⁻¹²³, que inhiben la liberación de Smac/Diablo, y de la activación de NF-κB, que induce las IAPs ^{44, 108, 124-125} (Figura 8). La combinación de Dexametasona con agentes que inducen la liberación de Citocromo-C, o con inhibidores específicos de IL-6R e IGF-1R, podría aumentar la actividad antimielomatososa de este fármaco y romper la inducción de la señal protectora.

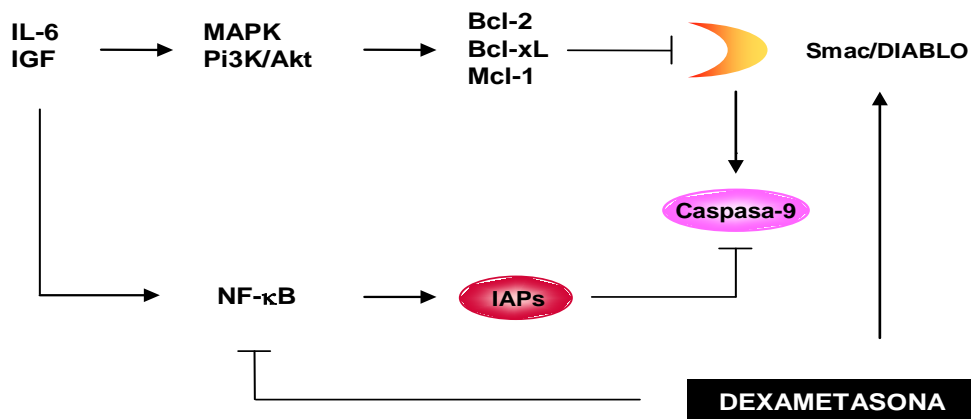


Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de Dexametasona.

2.3.2 Administración conjunta de IMiDs y Dexametasona

La administración conjunta de la Dexametasona puede alterar los efectos de la Lenalidomida especialmente el inmune ^{104, 107}. Lenalidomida en combinación con Dexametasona inhibe el crecimiento de células de mieloma de forma sinérgica, a través de la activación de las caspasas 8 y 9, que promueven la inducción de apoptosis. Por tanto en este sentido, Dexametasona mejora los efectos citotóxicos directos de Lenalidomida como agente único. Sin embargo, la Dexametasona puede antagonizar los efectos inmunomoduladores del tratamiento con Lenalidomida al inhibir IL-2, que es estimulador primario de producción de los linfocitos T y, además Lenalidomida inhibe IFN γ que afecta a la producción de células NK. En este sentido, probablemente el uso de dosis bajas Dexametasona proporcione efectos antiproliferativos sinérgicos sin antagonizar los efectos inmunes de Lenalidomida, lo que, junto con la menor toxicidad inducida, puede explicar el beneficio de supervivencia observado ¹⁰⁷.

3. Mecanismo generales de resistencia a drogas

El objetivo de todo tratamiento contra el cáncer es la erradicación de las células tumorales mientras se preserva o se infringe el mínimo daño posible a los tejidos normales. Esto se consigue de varias formas, bien inhibiendo directa o indirectamente las señales necesarias para la proliferación y viabilidad de las células tumorales o bien estimulando una respuesta inmune. La resistencia a drogas continúa siendo uno de los mayores problemas en el tratamiento de las neoplasias, ya que al final, la mayoría de los pacientes morirán por progresión de su enfermedad, al ser ésta refractaria a los tratamientos administrados. Así la comprensión de los mecanismos implicados en la resistencia a la quimioterapia y su reversión constituye uno de los principales retos de la oncología actual.

En la actualidad, en la resistencia a fármacos (MDR) se han identificado diferentes mecanismos celulares que de forma aislada o combinada confieren resistencia tanto en células individuales como en poblaciones específicas (Figura 5)¹²⁶. De entre estos mecanismos merece la pena destacar:

- Mecanismos celulares de transporte y eliminación de fármacos
- Mecanismos de inactivación de drogas a través de vías metabólicas.
- Señalización intracelular de receptores de tirosina kinasa (RTK).
- Resistencia farmacológica mediada por el citoesqueleto
- Resistencia farmacológica mediada por el bloqueo de las señales apoptóticas.
- Resistencia farmacológica mediada por mecanismo de reparación del ADN.

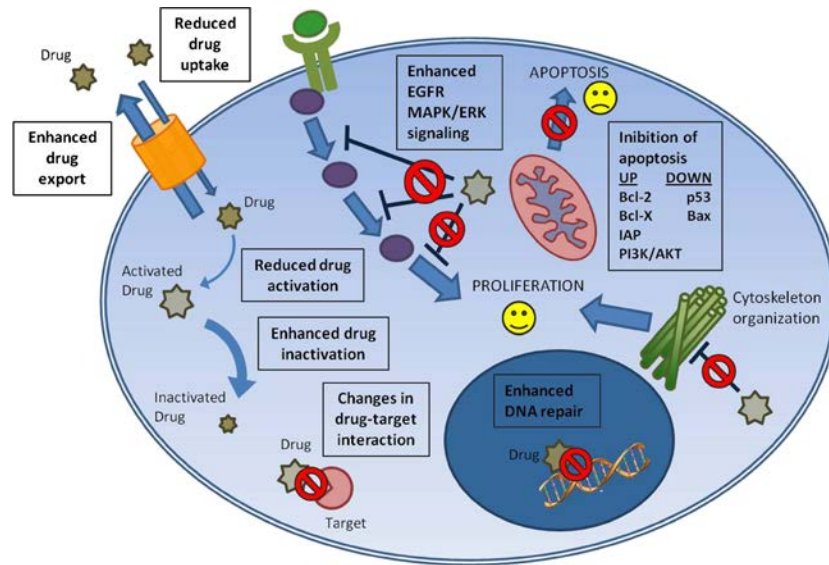


Figura 5. Mecanismo de resistencia a Fármacos ¹²⁶.

Obtenido de: Fondale et al, 2011.

3.1. Mecanismos celulares de transporte y eliminación de fármacos

En el transporte y eliminación de fármacos al medio extracelular y en su redistribución núcleo-citoplasmática intervienen de forma activa distintas proteínas transportadoras. Habitualmente se distinguen dos grandes grupos: 1) las proteínas transportadoras dependientes de ATP y 2) otras proteínas cuya función no depende de ATP.

3.1.1. Proteínas transportadoras dependientes de ATP

Uno de los mecanismos responsables de la resistencia a múltiples agentes citotóxicos hidrofóbicos y derivados de productos naturales resulta en parte de la expresión de proteínas capaces de transportar sustancias a través de la membrana citoplasmática en contra de gradiente de concentración, disminuyendo la cantidad intracelular de fármaco ¹²⁷. Para realizar esta función como bomba de reflujo dichas

proteínas requieren de la hidrólisis de ATP, perteneciendo a la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) ya que cada uno de sus miembros contiene una zona de unión a ATP¹²⁸. Estas proteínas muestran un importante grado de homología estructural y comparten parte de su secuencia incluyendo las regiones citoplasmáticas donde se localizan los dominios capaces de unir ATP^{127, 129}. Hasta ahora, se han identificado 48 genes humanos que codifican las distintas proteínas de esta superfamilia, agrupadas en 7 subfamilias distintas (ABCA a ABCG) dependiendo de su homología y de la organización de sus dominios.

De esta superfamilia de proteínas destaca la Glicoproteína-P o proteína de resistencia a fármacos tipo 1 (gp-P ó MDR1) que es el producto de la expresión del gen MDR-1 localizado en la región q21 del cromosoma 7 humano. La gp-P actúa sobre un amplio abanico de sustratos, incluyendo muchos fármacos antineoplásicos como: drogas polimerizantes de tubulina (Colchicina), antraciclinas (Doxorrubicina) o epipodofilotoxinas (Etopósido). Otra proteína de interés dentro de esta superfamilia es la proteína asociada a resistencia MRP1 (multidrug resistance protein 1) que está localizada en la región p13.1 del cromosoma 16 humano. MRP1 tiene la capacidad de transportar y eliminar fármacos conjugados con el glutatión tales como antraciclinas (Doxorrubicina, Daunorrubicina), Metrotexato y alcaloides de la Vinca (Vinblastina, Vincristina).

3.1.2. Proteínas transportadoras no dependientes de ATP

Existen otras proteínas celulares capaces de conferir resistencia a fármacos sin la necesidad de consumir ATP. De ellas merece mención especial la proteína asociada a resistencia pulmonar (LRP), identificada en 1993 en la línea celular de carcinoma de

pulmón de células pequeñas SW-1575/2R120. Teniendo en cuenta su distribución intracelular se cree que LRP estaría implicada en el transporte vesicular y nucleoplasmático de diferentes fármacos antineoplásicos.

3.2. Mecanismos de inactivación de drogas a través de vías metabólicas.

En este mecanismo de resistencia están implicadas enzimas metabólicas y de desintoxicación que influyen en la respuesta farmacológica.

Este proceso puede dividirse en 3 pasos. El primero es mediado por el citocromo P450 (CYP450), que es una superfamilia de enzimas que catalizan la oxidación de sustancias orgánicas. El segundo paso es el la formación de conjugados entre estas sustancias orgánicas y el glutatión, el ácido glucorónico, o sulfato debido a la acción enzimática de la S-glutatión transferasa (GST), la UDP-glucuronosil transferasa, y sulfatasa, respectivamente. Estas enzimas son expresadas en todos los tejidos, pero fundamentalmente en el hígado. El tercer paso de este proceso de detoxificación consiste en el exportación de sustancias metabolizadas por las bombas transmembrana tales como MDR1 y MRP1 ¹²⁶.

3.3. Señalización intracelular de receptores de tirosina kinasa (RKT).

Durante la progresión del cáncer y durante el tratamiento farmacológico, es muy frecuente que las células cancerosas sufran la activación de diferentes miembros de la superfamilia de receptores de tirosina kinasa (RKT) ¹²⁶. Estos receptores conducen a la activación de las principales rutas de supervivencia como PI3K/AKT ¹³⁰⁻¹³¹, RAS/RAF/MEK/ERK ¹³⁰⁻¹³² y JAK/STAT ¹³¹, lo que confiere a las células cancerosas una elevada resistencia a los fármacos empleados para el tratamiento de las neoplasias.

3.4. Resistencia farmacológica mediada por el citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura dinámica que mantiene la plasticidad celular y es responsable de los cambios estructurales que la célula sufre en los procesos de división celular y migración celular. Por eso es objeto de diana terapéutica para muchos fármacos anticancerígenos. La resistencia farmacológica que desarrollan los microtúbulos del citoesqueleto se produce a través de varios mecanismos como MDR1 y MPR1, alteración de la composición y organización estructural de los microtúbulos y una deficiente señalización de la apoptosis mediada por p53, Bcl-2 y Bclx.¹³³

3.5. Resistencia farmacológica mediada por el bloqueo de las señales de muerte por apoptosis.

El objetivo de todos los quimioterápicos es la muerte selectiva de las células cancerosas. La eficacia del tratamiento depende no sólo del deterioro directo de las células, sino también de la capacidad de responder a estos daños mediante la inducción de la maquinaria apoptótica. Es decir, el efecto de las drogas se asocia con el aumento de la expresión de “genes de muerte” (SMAC / DIABLO, PTEN, p53) y la disminución expresión de “genes de supervivencia” como las IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis), algunos miembros de la familia de Bcl-2, la proteína p53 y otras proteínas implicadas en la ruta PI3K/AKT¹³⁴. La resistencia farmacológica en este contexto sería el resultado del bloqueo de las señales de activación de la maquinaria apoptótica, es decir un desequilibrio en la señalización de la apoptosis donde la resistencia produciría un aumento de la expresión de “genes de supervivencia” y una disminución o inhibición de la expresión de “genes de muerte”.

3.6. Resistencia farmacológica mediada por mecanismo de reparación del ADN

Las células para sobrevivir deben para reparar los daños ocasionados en el ADN por los fármacos genotóxicos, pero si el daño es muy grave y no se puede revertir la célula entraría en apoptosis. Sin embargo en las células tumorales este proceso fisiológico puede inhibirse a través de la acción de las enzimas reparadoras del daño al DNA con lo cual se generaría un mecanismo de resistencia y supervivencia celular. Los nucleótidos de reparación de excisión (NFR) son uno de los mecanismos más importantes implicados en la reparación del daño a DNA, como el inducido por agentes alquilantes y platino. Existen 12 proteínas implicadas en NFR y la sobreexpresión de alguna de ellas incrementaría la actividad celular de reparación de DNA, induciendo, por tanto resistencia farmacológica ^{126, 135}.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La aparición de nuevos fármacos como los inhibidores de proteasomas y los agentes inmunomoduladores en el tratamiento del mieloma múltiple ha resultado en una clara mejora de la supervivencia y de la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad. Sin embargo, el arsenal terapéutico del que se dispone actualmente es limitado y el mieloma múltiple continúa siendo considerado una enfermedad incurable, debido principalmente al desarrollo de resistencias.

Para solucionar esto, en los últimos años están apareciendo fármacos derivados de aquellos agentes que demostraron eficacia en estos pacientes, como son los nuevos inhibidores de proteasoma (Carfilzomib, NPI-0052 o MLN-9708) o los nuevos fármacos inmunomoduladores (Pomalidomida). Sin embargo, dado que son fármacos basados en los mismos mecanismos de acción que sus predecesores, no está claro si tienen perfiles de eficacia, toxicidad y resistencia sustancialmente diferentes o si simplemente se diferencian en la potencia antitumoral.

Por ello, en el presente trabajo nos hemos planteamos el estudio preclínico comparativo de la eficacia, el mecanismo de acción y las características y mecanismos de resistencia de dos agentes Inmunomoduladores (IMiDs) (Lenalidomida y Pomalidomida) sólo y en combinación con dexametasona. Nuestra hipótesis es que esta comparación permitirá conocer mejor lo que es común al mecanismo de los diferentes agentes inmunomoduladores y qué es específico de cada uno de los derivados. Además, el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencias, utilizando un modelo “*in vivo*” y basándonos inicialmente en uno de estos grupos farmacológicos con un mecanismo de actuación novedoso y poco conocido (fármacos inmunomoduladores) permitirá conocer mejor la patogenia de la enfermedad

y también diseñar mejores estrategias terapéuticas, que posiblemente estarán basadas en combinaciones de fármacos que permitan vencer esas resistencias.

2. Objetivos

1. Estudiar de forma comparativa la eficacia y el mecanismo de acción de dos fármacos inmunomoduladores, Lenalidomida y Pomalidomida, tanto solos como en combinación con dexametasona en líneas celulares y células procedentes de pacientes con mieloma múltiple.
2. Analizar la posible potenciación de dichos fármacos inmunomoduladores con otros fármacos, tanto clásicos como nuevos, empleados en el mieloma múltiple.
3. Desarrollar un modelo “*in vivo*” de resistencia adquirida a fármacos inmunomoduladores con un doble fin:
 - 3.1 Investigar las características de la resistencia adquirida a fármacos inmunomoduladores.
 - 3.2 Estudiar algunos de los principales mecanismos implicados en la generación de resistencia adquirida a fármacos inmunomoduladores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Líneas celulares.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de MM: MM1S, MM1R (del Dr. S.T. Rosen, Chicago, IL), MM144, OPM1, OPM2 (del Dr. Rudikoff, Bethesda, MD), U266, U266LR7 y RPMI8226 (del Dr. W. Dalton, Tampa, FL). La línea celular MM1S-luc que tiene de forma estable actividad luciferasa fue facilitada por el doctor CS. Mitsiades (Boston, MA.) Todas ellas fueron cultivadas en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ a 37°C, en medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos (penicilina a 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml) (Invitrogen Corporation (Gaithersburg, Md.), en placas de 9 cm de diámetro. Las características de cada línea celular se resumen en la Tabla 4.

2. Células procedentes de pacientes.

Se aisló la fracción mononucleada procedente de aspirados de médula ósea (MO) (ver protocolo de lisado en el apartado 5.1.2 Estudios “*ex vivo*” de células procedentes de pacientes) de pacientes con MM al diagnóstico o en recaída. Las células se cultivaron en frascos de 75 cm² en las mismas condiciones que las líneas celulares, excepto en la cantidad de FBS, que fue del 20%.

Tabla 4. Características de las líneas celulares empleadas.

Tabla 4. Características de las líneas celulares empleadas.

Línea celular	Procedencia	Citogenética/Genes implicados	Características funcionales	Variantes/Característica
MM1	SP, MM (IgA λ), (P, T)	t(14;16)(q32;q23)/IGH/MAF	Sobreexpresión de Maf. Secreción de Ig λ	MM1.S/Sensible a dexametasona MM1.R/Resistente a dexametasona MM1S-luc Expresión de Luciferasa
U266	SP, MM (), (R, T)		Secreción de IgE, IL-6 y TNF- β	U266LR7/Resistente a melfalán U266DOX4/Sensible a doxorubicina
OPM-2	SP, MM (Ig λ), (R, T)	t(4;14)(q16;q32)/FGFR3-MMSET-IGH	Delección de PTEN	
RPMI8226	SP, MM (IgG λ), (D)		Secreción de Ig λ y TGF- β Expresión de c-Kit (CD117)	

SP: Sangre periférica.
Estado de la enfermedad: P: Progresión. **T:** Terminal. **R:** Recaida. **D:** Diagnóstico.

Referencias: Robin E. et al., 1988; Drexler HG. et al., 2000; Greenstein S et al., 2003.

3. Estudios “*in vivo*”

Para estos estudios se empleó un modelo murino de plasmocitoma subcutáneo humano en ratón inmunodeprimido.

3.1 Material, reactivos y equipos

- Pie de rey digital para medir el diámetro tumoral.
- Balanza analítica para pesar el ratón.
- Línea celular MM1S (del Dr. S.T. Rosen, Chicago, IL)
- Matrigel (BD biosciences)
- Ratones CB17-SCID (con deficiencias en células B y T) hembras, con una edad de 4-6 semanas, procedentes del laboratorio de Charles River
- Fármacos: Dexametasona (Merk), Lenalidomida (Celgene) y Pomalidomida (Celgene), reconstituidos según el laboratorio fabricante.

3.2. Inducción del plasmocitoma (tumor)

Se inyectaron de forma subcutánea en el flanco derecho de ratón un total de 3×10^6 células MM1S contenidas en 100 μ l RPMI (Gibco-Invitrogen) + 100 μ l Matrigel (BD biosciences).

3.3. Vía de administración del fármaco

Una vez que el tumor se hizo palpable (aproximadamente 30-45 días tras la inoculación), los ratones fueron randomizados para iniciar el tratamiento con los fármacos en estudio.

Estos fármacos se administraron por vía intraperitoneal, 5 días a la semana de lunes a viernes. Las dosis empleadas se detallan en el siguiente apartado.

En la técnica de inyección intraperitoneal se tuvo en cuenta los siguientes aspectos:

- 1) Usar jeringas de insulina de 1 ml con agujas estériles de 25-27 Ga y de bisel lo más pequeño posible.
- 2) Recoger la cantidad de preparado según diseño de experimento asegurándose de que no hay burbujas de aire.
- 3) Sacar al ratón de la jaula y apoyar sobre una superficie rugosa contra la que pueda ejercer resistencia. Coger al animal por la cola (procurar agarrarlo en el inicio de la cola para un mejor manejo y cuidado del animal).
- 4) Sin soltar la cola, tomar de forma rápida, suave y firmemente, la piel del cuello con los dedos índice y pulgar y luego sujetar la cola entre el dedo meñique y la palma de la mano.
- 5) Inclinar al ratón con la cabeza hacia abajo y boca arriba. De esta manera evitamos pinchar vísceras.
- 6) Introducir la aguja a una profundidad de medio centímetro cerca de la línea media y por encima de las rodillas del animal con un ángulo de inclinación de 30° y el bisel hacia arriba. Inyectar el preparado muy despacio y una vez inoculado esperar y sacar muy despacio la aguja.

3.4. Monitorización del Ensayo

Durante el desarrollo del estudio se monitorizó tanto la toxicidad de los fármacos como su eficacia de la siguiente manera:

- a. Toxicidad: control del peso corporal, mediante pesada del ratón en balanza analítica y evaluación de parámetros clínicos (postura, actividad, estado del pelo)
- b. Eficacia: control del volumen tumoral, media la medición del diámetro del plasmocitoma, usando un pie de rey digital. Tras la medida de los diámetros se aplica la siguiente fórmula matemática para la obtención del volumen.
$$\text{Volumen} = \frac{\text{Diámetro mayor} \times \text{Diámetro menor} \times \text{Diámetro menor} \times \text{PI}()}{6}$$

3.5. Experimentos “*in vivo*” realizados

3.5.1. Actividad anti-MM de los IMiDs

Este experimento tiene como objetivo comparar la actividad anti-MM “*in vivo*” de Lenalidomida y Pomalidomida, individualmente y en combinación con Dexametasona.

Las dosis de Lenalidomida y Dexametasona que se eligieron se basaron en experimentos anteriores en los que se comprobó la toxicidad. La dosis de Pomalidomida empleada fue una dosis equivalente, teniendo en cuenta la mayor eficacia de Pomalidomida y la menor biodisponibilidad respecto a Lenalidomida.

Se establecieron 6 grupos con 2 ratones por grupo:

- 1) Control sin tratamiento (vehículo de administración del fármaco)
- 2) Lenalidomida 25 mg/Kg (L)
- 3) Dexametasona 1 mg/Kg (D)

- 4) Pomalidomida 5 mg/Kg (P)
- 5) Lenalidomida 25 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (LD)
- 6) Pomalidomida 5 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (PD)

3.5.2. Estudio de la resistencia adquirida a IMiDs + Dexametasona en un modelo de MM

Este experimento presenta los siguientes objetivos:

1. Generar células resistentes a IMiD's usando un modelo de plasmocitoma humano en ratón inmunodeprimido.
2. Estudiar las características biológicas de la Resistencia adquirida a IMiDs + Dexametasona
3. Analizar los mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencias "*in vivo*" a IMiDs.

Las dosis de los fármacos utilizadas fueron iguales a las del experimento anterior, únicamente que Dexametasona fue administrada sólo los lunes y martes debido a la toxicidad a largo plazo observada en el experimento anterior.

Una vez que el tumor empezó a crecer se procedió a randomizar los ratones (n=66) en función del tamaño del plasmocitoma en 9 grupos de tratamiento:

- 1) Control sin tratamiento (vehículo de administración del fármaco) (n=14), 6 de estos ratones iniciaron el tratamiento cuando el tumor alcanzó gran tamaño (2.000 mm³) con el fin de obtener células de tumores tratados y sensibles al tratamiento de Lenalidomida 25 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (LD) (n=3) y Pomalidomida 5 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (PD) (n=3)
- 2) Lenalidomida 25 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (LD) (n=8)
- 3) Pomalidomida 5 mg/Kg + Dexametasona 1 mg/Kg (PD) (n=8)

- 4) Tratamiento alternante semanalmente
 - A) LD→PD (comienzo experimento por LD)
 - B) PD→LD (comienzo experimento por PD)

- 5) LD 1 cambio; Se comienza tratamiento con LD y cuando el ratón se hace resistente (1.500 mm^3) se cambia a PD, manteniendo este tratamiento hasta el final del experimento (n=8).

- 6) PD 1 cambio; Se comienza tratamiento con PD y cuando el ratón se hace resistente (1.500 mm^3) cambio a LD, manteniendo este tratamiento hasta el final del experimento (n=8).

- 7) LD 2 cambios; Se comienza tratamiento con LD y cuando el ratón se hace resistente (1.500 mm^3) se cambia a PD. Tras un periodo de sensibilidad inicial el tumor volvió a crecer, realizándose un nuevo cambio al tratamiento inicial LD, y manteniéndolo hasta el final del experimento (n=5).

- 8) PD 2 cambios; Se comienza tratamiento con PD y cuando el ratón se hace resistente (1.500 mm^3) se cambia a LD. Tras un periodo de sensibilidad inicial el tumor volvió a crecer, realizándose un nuevo cambio al tratamiento inicial PD, y manteniéndolo hasta el final del experimento (n=5).

Algunos de los ratones fueron sacrificados con el fin de realizar estudios biológicos sobre células control, sensibles a las combinaciones o resistentes a las mismas. En estos estudios se analizaron básicamente los siguientes parámetros:

- 1) Cambios en el perfil inmunofenotípico con diferentes anticuerpos monoclonales.

- 2) La sensibilidad/resistencia al tratamiento “*ex vivo*”.
- 3) Cambios en la expresión de genes (GEP).
- 4) Cambios en proteínas mediante Western blot.

4. Medida de la viabilidad y proliferación celular

4.1. MTT

El ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide) es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables ¹³⁶. Las células metabólicamente activas reducen en la mitocondria la sal de tetrazolium (MTT), que pasa entonces de ser hidrofílica y de un color amarillo, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la reacción del MTT, las células se lisan y se solubiliza el formazán con Isopropanol-Ácido clorhídrico. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables ¹³⁶.

Reactivos

- MTT; (Sigma), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide, 5mg/ml disuelto en PBS.
- Isopropanol-Ácido clorhídrico (Isopropanol:HCl), 480ml Isopropanol + 20ml HCl 1N

Procedimiento

1. Sembrar 30.000 células (100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos.
2. Después del tratamiento con cada fármaco a diferentes concentraciones y tiempos, añadir 10 µl de MTT a cada pocillo e incubar durante 2 horas a 37°C.

3. Añadir 100 μ l de Isopropanol:HCl, mezclando hasta resuspender el botón celular.

La absorbancia se midió en un lector de placas (TECAN infinite F500), a una longitud de onda: $\lambda=570$ nm, utilizando una λ de referencia de 630 nm. Se analizaron 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado, los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de cuadruplicados. El IC₅₀ se calculó con el programa Microsoft Office Excel.

4.2. Análisis de la viabilidad tras co-cultivo con células de estroma de médula ósea

Para analizar la eficacia de diferentes fármacos en presencia de un modelo de micromedioambiente se co-cultivaron células de estroma de médula ósea (BMSC) procedentes de pacientes con MM junto con la línea celular MM1S-luc.

Las BMSC se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10^4 células/pocillo. Tras ser plaqueadas se incuban durante 24 horas en atmósfera húmeda en presencia de 5% de CO₂ a 37°C y medio RPMI-1640 completo, con el objeto de que formen una capa confluyente en el fondo del pocillo. Tras esta 24 horas de incubación de se plaquean sobre las BMSC, las células MM1S-luc (actividad luciferasa) con o sin los fármacos cuya actividad se pretende evaluar.

Tras el tiempo de cultivo, se añade luciferina (Caliper life Sciences, Hopkinton, MA) a una concentración de 150 mg/ml. La inhibición de la proliferación celular de los fármacos en estudio se midió por Bioluminiscencia utilizando una cámara IVIS Imaging System 50 Series (Caliper Life Sciences). Los valores obtenidos en la medición

luminiscente se evalúan mediante el programa Excel transformándolos en unidades relativas de luminiscencia (RLU).

5. Estudios de apoptosis por citometría de flujo multiparamétrica

5.1. Anexina V-Ioduro de Propidio

Durante la apoptosis ocurren cambios tempranos en la superficie celular, que llevan al reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas. Estos cambios en la superficie celular como la pérdida de residuos de ácido siálico y la pérdida de la asimetría en los fosfolípidos de la membrana, principalmente por la externalización de la fosfatidilserina (PS), alteran la carga e hidrofobia de la misma. En una célula normal, estos residuos están en la cara interna de la membrana y son inaccesibles para la anexina V. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan expuestos en la cara externa de la membrana, con acciones procoagulantes y proinflamatorias, manteniéndose la integridad de la membrana celular¹³⁷. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos cargados negativamente, dependiente de Ca^{++} , que se une con gran afinidad a los residuos de fosfatidilserina de la membrana celular¹³⁸, por lo que permite medir la pérdida de polaridad de la membrana celular, y, por tanto, ser usada como marcador de apoptosis incluso antes de que la integridad de la membrana celular se haya perdido e incluso antes de la aparición de cambios morfológicos asociados con la apoptosis¹³⁹⁻¹⁴¹.

Por el contrario, cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza, y el IP es capaz de marcar el ADN del

núcleo. Este marcaje adicional nos permite diferenciar las células en apoptosis tardía y las células necróticas (Figura 6) ¹⁴².

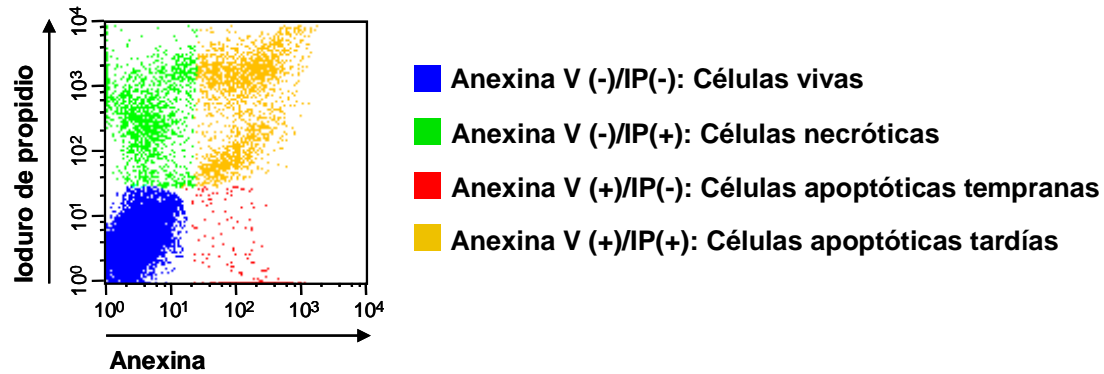


Figura 6. Análisis de las diferentes etapas de la apoptosis por citometría de flujo.

5.1.1. Estudio en líneas celulares y células extraídas de plasmocitoma de ratón

Tanto para el estudio de las líneas celulares como para las células extraídas de plasmocitoma de ratón se realizó el siguiente protocolo para la detección de la apoptosis.

Reactivos:

Para el marcaje utilizamos el siguiente “kit”: Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (Immunostep), que contiene Anexina, IP (20 µg/ml) y tampón de unión (Hepes/NaOH, 10 mM, pH 7,4, NaCl, 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM).

Procedimiento:

Para la detección de apoptosis se marcaron 1×10^6 células, control y tratadas con cada fármaco a diferentes tiempos y dosis. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

1. Recoger y centrifugar a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con D-PBS (Gibco) que contiene CaCl₂ y MgCl₂ y diluir en 200 µl de tampón de unión.
3. Añadir 10µl de Anexina y 10 µl de IP e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se adquirieron un total de 30.000 células en un citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa CellQuest™ (BD Biosciences). Para el análisis fenotípico se utilizó el programa Paint A Gate-PRO™ (BD Biosciences) e Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España). Las CP se identificaron basándonos en las características típicas de dispersión de luz-tamaño celular (FSC, “forward scatter”) y complejidad interna (SSC, “side scatter”).

5.1.2. Estudios “*ex vivo*” en células procedentes de pacientes

La población total de células obtenidas de aspirados de MO fue lisada para eliminar los hematíes.

Reactivos:

- Tampón de lisis que contiene: EDTA, KHCO₃ y NH₄Cl.
- RPMI-1640.
- RPMI-1640 con L-glutamina 2 mM, 20% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. (Invitrogen Corporation. Gaithersburg, Md.).

Procedimiento:

1. Mezclar 2 ml de la muestra de MO con 7 ml de tampón de lisis y mantener a 4°C durante 15 minutos.
2. Centrifugar a 300 g, durante 10 minutos a 4°C.
3. Lavar dos veces con RPMI-1640.
4. Cultivar en RPMI-1640 al 20% de SBF.
5. Plaquear 400.000 células por pocillo en 1 ml de medio y en placas de 6 pocillos.
6. Añadir cada fármaco a las dosis y tiempos determinados.
7. Recoger las células y lavar con 1 ml de PBS.

Para diferenciar las células plasmáticas mielomatosas de otros tipos celulares, realizamos un marcaje multiparamétrico basado en la combinación de Anexina V-FITC y tres anticuerpos monoclonales contra antígenos asociados al MM (CD38, CD56 y CD45). El uso de los tres primeros permite la identificación de las CP, y muestra las diferentes aberraciones fenotípicas; CD45 contribuye a la identificación de otras poblaciones hematopoyéticas, en la misma muestra. Al mismo tiempo, se calculó la fracción de células positivas para anexina V, en cada población antes y después del tratamiento con los fármacos (Figura 7).

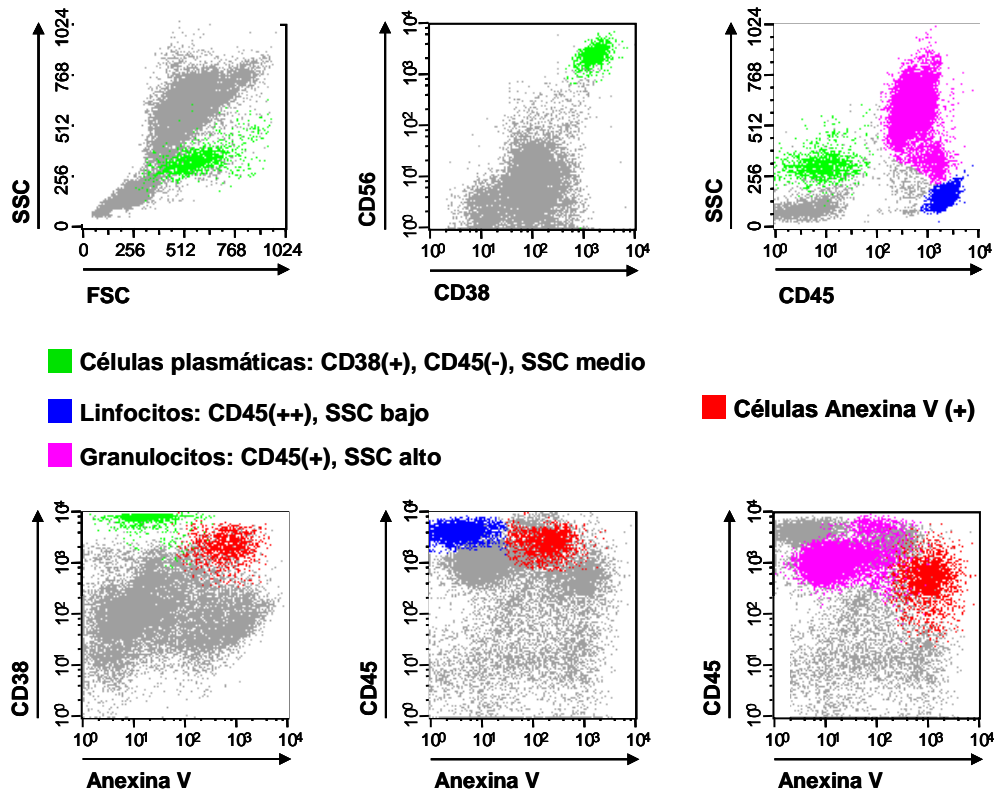


Figura 7. Medida de la apoptosis en células de pacientes.

Reactivos:

- Anti-CD56-PE (BD Biosciences).
- Anti-CD45-APC (BD Biosciences).
- Anti-CD38-perCP/Cy5 (BD Biosciences).
- Anexina V-FITC (Immunostep).

Procedimiento:

1. Añadir 10 µl de anti-CD56-PE, 5 µl de anti-CD45-APC, 8 µl de anti-CD38-perCP/Cy5 y 5 µl de Anexina V-FITC.
2. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Adquirir 50.000 células en el citómetro.

Las poblaciones celulares apoptóticas se seleccionaron en función de su expresión antigénica y del marcaje con Anexina V.

5.2. Potencial de Membrana Mitocondrial

La disfunción mitocondrial dentro del proceso apoptótico está frecuentemente asociada con la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial (PMM), que ocurre durante las primeras fases de la apoptosis¹⁴³⁻¹⁴⁴. Una técnica para medir alteraciones en la membrana es el marcaje con 3,3'-di-hexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆), que es un fluorocromo catiónico que se acumula en la mitocondria¹⁴⁵. La disminución del PMM se asocia con la disminución de la captación de DiOC₆¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Reactivos:

- DiOC₆ (3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide). (Molecular Probes).

Procedimiento:

1. Recoger y centrifugar 500.000 células a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS y resuspender en 200 μ l.
3. Incubar con DiOC₆ 20 nM, durante 20 min, a 37°C, en oscuridad.
4. Lavar con PBS.
5. Añadir 10 μ l de IP (20 μ g/ml).

A continuación se procedió a la medida del potencial mitocondrial utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa InfinicytTM (Cytognos, Salamanca, España). (Figura 8).

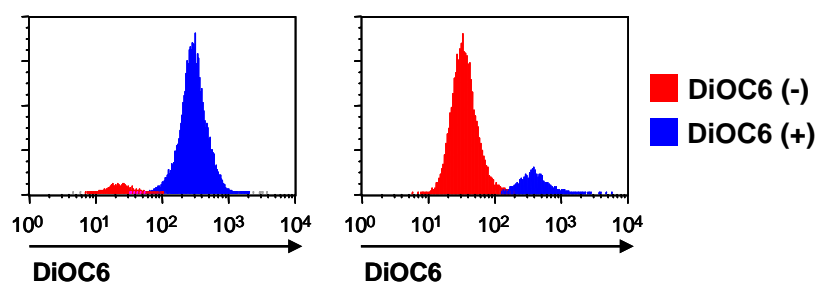


Figura 8. Análisis del potencial mitocondrial por citometría de flujo antes y después del tratamiento.

6. Estudio del ciclo celular

La cuantificación del contenido ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. La distribución celular de una población se analiza por citometría de flujo utilizando colorantes de ADN que se unen a los ácidos nucleicos de forma estequiométrica incrementando su fluorescencia. La cantidad de colorante unido y, por tanto la cantidad de fluorescencia emitida, es proporcional a la cantidad de ADN de cada célula.

El fluorocromo más utilizado para este tipo de estudios es el yoduro de propidio. Sus ventajas principales son la facilidad de uso, estabilidad y espectro de absorción/emisión, que le hace válido para la mayoría de citómetros de flujo. Se excita con luz en torno a los 480 nm (para lo cual resulta válido un láser de Argón-ión) y emite fluorescencia roja (620 nm). Las moléculas de yoduro de propidio se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN, por lo cual es necesario eliminar éste último por procesos enzimáticos (RNAsa) si se quiere una determinación lo más exacta posible de la cantidad de ADN ¹⁴⁹.

Se sembraron 2×10^6 células (1×10^6 células/ml) para cada tratamiento en placas de 6 pocillos.

Reactivos y procedimiento:

1. Recoger y centrifugar las células en tubos limpios a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS, y resuspender en 700 μ l etanol frío al 70%, e incubar durante toda la noche a 4°C.
3. Lavar las células tres veces y resuspender en 1 ml de PBS.

4. Añadir 500 μ l de la solución PI/RNase (Immunostep) que contiene 15 μ g de yoduro de propidio (IP) y 0,5 mg de ARNasa A. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad.

A continuación se procedió a la medida del ciclo celular utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur y el programa CellQuest (BD Biosciences). Para el análisis de los datos se utilizó el programa InfinicytTM (Cytognos, Salamanca, España) y ModFit LTTM (Verity Software House, Inc, Maine, USA) (Figura 9).

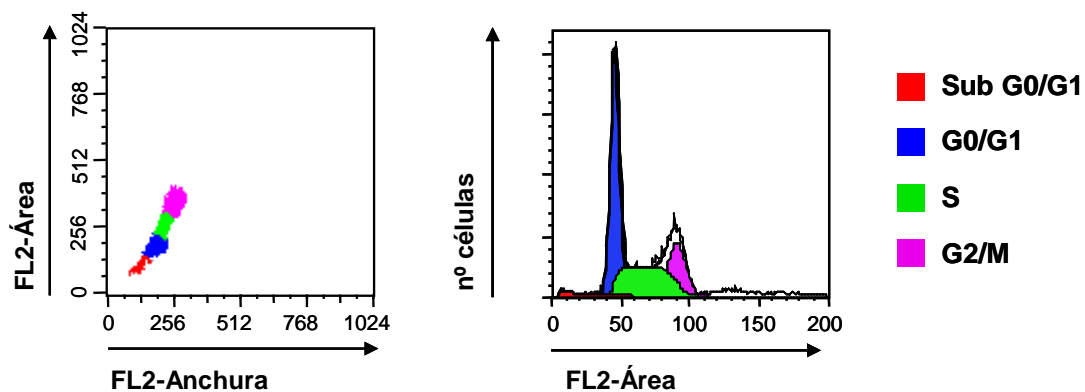


Figura 9. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

7. Estudios de combinación de drogas

La combinación de drogas es una estrategia común en el tratamiento de las enfermedades oncológicas; y también en el MM. Los principales objetivos son lograr la sinergia para aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad por el empleo de dosis más bajas. Además este tratamiento combinado también garantiza el retraso o la minimización de la aparición de resistencias¹⁵⁰.

Con el fin de cuantificar el grado de potenciación de las diferentes combinaciones empleadas, se utilizó el programa CalcuSyn que nos ofrece

automáticamente gráficos de los datos y genera informes con las estadísticas de resumen de todos los fármacos, con análisis detallado de las interacciones de drogas, incluyendo el índice de combinación, la dosis-efecto, la mediana efecto e isobologramas.

En función del índice de combinación (IC), podemos cuantificar la potenciación de las combinaciones de los fármacos tal y como se describe en la Tabla 5:

Tabla 5. IC para el programa Calculusyn.

Rango índice combinación IC	Descripción
< 0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1-0,3	Sinergismo fuerte
0,3-0,7	Sinergismo
0,7-0,85	Sinergismo moderado
0,85-0,90	Sinergismo leve
0,9-1,10	Aditivo
1,10-1,20	Antagonismo leve
1,20-1,45	Antagonismo moderado
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Antagonismo fuerte

8. Western Blot

8.1. Obtención de la fracción proteica

Para obtener la fracción proteica total utilizamos 10^7 células por muestra (10^6 células/ml).

Reactivos:

- Tampón de lisis: NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, glicerina 10%, Nonidet P-40 1%, Tris pH 8,0 20 mM, PMSF 1mM, pepstatina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, sodio ortovanadato 1 mM.

Procedimiento:

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con cada droga (de 1 a 48 horas), recoger y centrifugar a 300 g durante 3 minutos.
2. Lavar con PBS frío.
3. Añadir 800 μ l de tampón de lisis, centrifugación a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C.
4. El sobrenadante que contiene las proteínas se recoge y se conserva a -20°C.

8.2. Cuantificación protéica de los extractos celulares

Se utilizó el método diseñado por Bradford ¹⁵¹.

Reactivos:

- *Bio-Rad Protein Assay.*
- BSA (seroalbúmina bovina)

Procedimiento:

1. Preparar alícuotas con BSA a 0, 100, 250, 500 y 750 $\mu\text{g/ml}$, para la recta patrón.
2. Diluir cada muestra en 1 ml de *Bio-Rad Protein Assay*.
3. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro, que es directamente proporcional a la cantidad de proteína.

8.3. Electroforesis en geles de acrilamida

Los extractos una vez cuantificados, se utilizaron para realizar la electroforesis.

La técnica llamada SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*) permite separar las proteínas de una muestra en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Reactivos:

- Acrilamida:Bisacrilamida.
- Tris-HCl pH 8,8, 1,5M.
- Tris-HCl pH 6,8, 1M.
- TEMED
- APS (persulfato amónico)
- Tampón de carga: 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol.
- Tampón electrodo 1X: 25mM Tris -HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1%SDS.
- Marcador de peso molecular de amplio rango (6,5-200 KDa) (BioRad).

Procedimiento:

1. Los geles se prepararon según *Laemmli*, a un determinado porcentaje entre el 6 y 12% de acrilamida, en función del peso molecular de la proteína.
2. Mezclar la muestra con tampón de carga y calentar durante 3-5 minutos a 100°C antes de cargar en el gel. El tampón de carga es desnaturizante y el SDS que contiene confiere carga neta negativa a las proteínas.
3. La electroforesis se realizó con tampón de electrodo 1X, en cubetas Mini-PROTEAN®III (Bio-Rad), o en cubetas grandes de tipo Sturdier, a voltaje constante de hasta 120 V o 200 V respectivamente.

8.4. Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF

Después de correr la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polivinilideno difluoruro).

Reactivos:

- Tampón de transferencia 1X: 20 mM Tris, 192 mM glicina, 0,02% SDS y 10% metanol.
- Membranas de PVDF (Immobilon-P®, Millipore).

Procedimiento:

La transferencia se realiza a una corriente constante de 500 mA durante un tiempo variable en función del grosor y porcentaje de acrilamida del gel.

8.5. Bloqueo, marcaje con anticuerpos y revelado.

Reactivos:

- Tampón de bloqueo TBST-BSA (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%; BSA 1%, N₃Na 0.05%).
- Tampón de lavado TBST (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%).
- Anticuerpos primarios: anti-p21, anti-p16, anti-pErk, anti-Erk1/2, anti-Caspasa-3, (Santa Cruz, CA); anti-Caspasa-8, anti-Caspasa-9, anti-PARP (BD Biosciences); anti-p53, (Oncogene Science); anti-caspasa-7, anti-MEK, anti-pAKT y anti-RAF (Cell Signalling); anti-RAS p90 (Millipore).
- Anticuerpos secundarios: IgG anti-conejo-HRP e IgG anti-ratón-HRP (Amershan).
- Solución de revelado: TRIS 0,1 M pH: 9,35, Luminol, *p*-Iodophenol, H₂O₂ (1:20.000)

Procedimiento:

1. Bloquear la membrana al menos durante una hora a temperatura ambiente.
2. Incubar al menos 2 horas con el anticuerpo correspondiente diluido en TBST.
3. Lavar las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
4. Incubar con el correspondiente anticuerpo secundario, durante 30 minutos.
5. Lavar las membranas con TBST (3 lavados de 7 minutos).
6. Incubar 1 minuto con la solución de revelado.
7. Revelar.

9. Microarrays de ARN

Se analizaron los cambios inducidos por los diferentes fármacos en los perfiles de expresión génica de las CP al inicio de la muerte celular, y por tanto, cuando las células todavía son viables y mantienen un ARN de buena calidad. Para ello se realizaron estudios de tiempo-respuesta con Anexina /IP con el fin de determinar las condiciones que inducían un mínimo de apoptosis (15 %) con cada fármaco.

9.1. Extracción del ARN total

Se congelaron 10^7 células en 1 ml de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD) a -80°C . Posteriormente se procedió a la extracción del ARN.

Reactivos y procedimiento:

1. Descongelar la muestra en un baño a 37°C y homogeneizarla con una jeringa con aguja de 0,5 mm.
2. Añadir 500 μl de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 13.000 g, durante 10 minutos a 4°C , lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 75% y centrifugar a 11.000 g durante 5 minutos a 4°C .
4. Eliminar el etanol, y dejar secar el ARN en hielo.
5. Disolver el ARN en 100 μl de H_2O DEPC (Ambion).

9.2. Purificación del ARN

Con este proceso se pretende mejorar la calidad del ARN y asegurar una mejor hibridación sobre los microarrays de Affymetrix[®]. Se realizó mediante las columnas “RNeasy[®] Mini”, (Qiagen, Valencia, CA).

Reactivos y procedimiento:

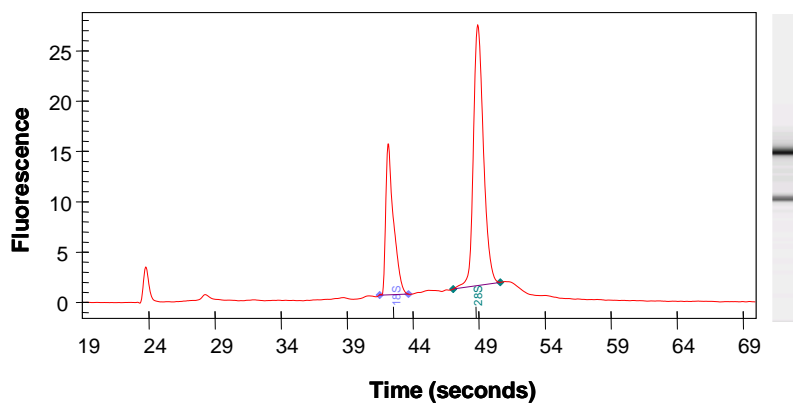
1. Añadir 350 μ l de *solución RLT* y mezclar.
2. Añadir 250 μ l de etanol 100% y mezclar.
3. Pasar el volumen total a una columna de purificación.
4. Centrifugar a 9.000 *g* durante 15 segundos.
5. Lavar con 500 μ l de *solución RPE*.
6. Centrifugar a 9.000 *g* durante 15 segundos.
7. Repetir el lavado con *RPE*.
8. Añadir 30 μ l de agua DEPC, y pasar el ARN a un tubo nuevo.

9.3. Medida de la concentración y calidad del ARN

La evaluación de la integridad del ARN es un paso crítico en los análisis de la expresión génica. Para medir la concentración y al mismo tiempo valorar la calidad del ARN, se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) con el kit “RNA 6000 Nano LabChip”, en el que se pueden medir hasta 12 muestras (1 μ l por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250 ng/ μ l.

Para cada muestra el bioanalizador calcula automáticamente la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1. Este valor puede ser utilizado como un parámetro de la calidad de la muestra. La variación de esta ratio puede indicar degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma. En los casos de completa degradación las bandas llegan a desaparecer.

Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 29 segundos y la fracción 18S ha de ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN (Figura 10).



Fragment	Star Time	End Time	Area	% of total Area
18S	41.47	43.66	24.14	20.16
28S	47.04	50.59	46.76	39.06

RNA Area: 119.71
 RNA Concentration(ng/ul): 340.63
 rRNA Ratio [28S / 18S]: 1.94

Figura 10. Cuantificación de ARN y determinación de su calidad.

9.4. Procedimiento desarrollado de GENE 1.0 ST y EXON ST Arrays de Affymetrix

Para todo ese proceso se siguieron las recomendaciones de la casa comercial comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974).

9.4.1. Preparación de las diluciones de controles Poly-A

Se preparan diluciones de los controles Poly-A en función de la cantidad de RNA total de partida.

9.4.2. Síntesis primera cadena ADNc (1º Ciclo)

- 1- Preparar la siguiente mezcla (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): First Strand Buffer Mix 4µl y First Strand Buffer Enzyme 1µl.
- 2- Mezclar y añadir 5 µl a cada tubo de con ARN total + Poly-As. Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo: 25°C 60 min; 42 °C 60 min; 4 °C 2 min. Centrifugar brevemente, poner hielo y proceder con la síntesis de la segunda cadena de ADNc.

9.4.3. Síntesis segunda cadena ADNc (1ºCiclo):

- 1- Preparar la siguiente mezcla (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): Agua nucleasa free 32,5 µl, Second Strand Buffer Mix 12,5 µl y Second Strand Buffer Enzyme 5 µl.
- 2- Mezclar y añadir 50 µl a cada tubo anterior. Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo: 16°C 60 min; 65 °C 10 min; 4 °C 2 min. Centrifugar brevemente, poner hielo y proceder con la síntesis de ARNc.

9.4.4. Síntesis ARNc

- 1- Mezclar en un tubo eppendorf a temperatura ambiente (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): IVT Buffer Mix 24 μ l y IVT Enzyme 6 μ l.
- 2- Mezclar y transferir 30 μ l a la muestra resultante del paso anterior. Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo: 40°C 16 horas; 4 °C indefinido.
- 3- Proceder a la purificación de ARNc siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974).
- 4- Cuantificar el ARNc obteniendo mediante espectofotómetro Nanodrop. La cantidad de ARNc obtenida del tipo de tejido de procedencia.

9.4.5. Síntesis ADNc (2ºCiclo)

- 1- Mezclar en un tubo el ARNc resultante del paso anterior con los Random Primers de la siguiente manera: ARNc 10 μ g de volumen variable, Random Primers (3 μ g/ μ l) y agua RNase-free hasta completar 24 μ l.
- 2- Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo: 70°C 16 5 min; 25 °C 5 min y 4 °C 2min.
- 3- Preparar la siguiente mezcla (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): 2nd-cycle Buffer Mix 8 μ l y 2nd-cycle Enzyme 8 μ l.
- 4- Mezclar y añadir 16 μ l a cada muestra. Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo: 25°C 10 min; 42°C 90 min; 70°C 10 min; 4 °C 2 min. Centrifugar brevemente, poner hielo y proceder con

la síntesis de ARNc. Después de la incubación, dar un breve spin, poner hielo y proceder con la hidrólisis inmediatamente.

9.4.6. Hidrólisis y limpieza de ADN SS (+)

- 1- Añadir 2 μ l de RNasa H a cada muestra, mezclar e incubar en un termociclador según el siguiente protocolo: 37°C 45 min; 95°C 5 min; 4°C menos de 2 min.
- 2- Proceder a la purificación de ADN siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Ambion WT Expresión kit (Ambion, P/N 4411974).
- 3- Cuantificar el ADN obteniendo mediante espectofotómetro Nanodrop (ND 1000). Si el proceso ha sido correcto debe haber > 5,5 μ g de ADN SS (+) por muestra.

9.4.7. Fragmentación del ADN SS (+)

- 1- Preparar en un tubo el ADN resultante del paso anterior de la siguiente manera: ADNss (+) 5,5 μ g; agua RNase-free hasta completar 31,2 μ l.
- 2- Preparar la siguiente mezcla (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): agua RNase-free hasta completar 10 μ l; 10X ADNc fragmentation buffer 4,8 μ l; UDG 10U/ μ l 1 μ l; APE 1 1000 U/ μ l 1 μ l.
- 3- Mezclar y transferir 16,8 μ l a cada muestra. Mezclar, dar un breve spin e incubar en termociclador según el siguiente protocolo (programa Gene 7): 37°C 60 min; 93°C 2 min; 4 °C 2 min.
- 4- Mezclar, centrifugar y transferir 45 μ l a un nuevo tubo de 1,5 ml. Con el material restante analizar mediante Agilent (PNT-GEN-01). Si el proceso ha

sido correcto el ADN fragmentado debe mostrar la mayoría de los fragmentos entre 40 y 70 pares de bases.

9.4.8. Marcaje del ADN fragmentado

- 1- Preparar la siguiente mezcla (multiplicar las cantidades por el número de muestras a procesar): 5X TdT buffer 12 μ l; TdT 20U/ μ l 2 μ l.; DNA labeling Reagent, 5mM 1 μ l.
- 2- Mezclar y transferir 15 μ l a cada muestra.
- 3- Incubar en bloques térmicos siguiendo el siguiente patrón: 37°C 60 min; 70°C; enfriar en hielo 2-10 min.

9.4.9. Hibridación del array (I)

- 1- Sacar los arrays a temperatura ambiente una hora antes.
- 2- Mezclar en un tubo Eppendorf: ADN fragmentado marcado 27 μ l; Control oligonucleotide B2 1,7 μ l; 20X eukaryotic Hybridization controls 5 μ l; 2X Hybridization buffer 50 μ l; DMSO 7 μ l; Agua RNase-free hasta completar 100 μ l.
- 3- Incubar sonda 5 min a 99°C
- 4- Incubar sonda 5 min a 45°C
- 5- Centrifugar sonda 1min a máxima velocidad
- 6- Inyectar 80 μ l de la solución de hibridación en el array correspondiente.
- 7- Dejar 17-18 horas a 60 rpm a 45°C en el horno de hibridación affymetrix.

9.4.10. Hibridación del array (II)

- 1- Una vez transcurridas las 17-18 horas de hibridación, retirar la solución de hibridación de los arrays y guardar a -80°C. Pinchar el array con 100 µl de Wash A (Gene chip hybridization, wash and satín kit P/N 900720).
- 2- Colocar los arrays y las soluciones de tinción (Gene chip hybridization, wash and satín kit P/N 900720) en la Fluidics station y desarrollar protocolo de lavado adecuado según el tipo de array y según las especificaciones de la casa comercial (www.affymetrix.com)
- 3- Una vez finalizado el lavado se escanean los arrays utilizando el GenChip Scanner 3000.

9.5. Análisis de datos

Los valores de expresión absolutos para cada sonda se calcularon mediante el software MAS 5.0. En todos los casos se cumplían los criterios de una hibridación de buena calidad: *Scaling factor* (SF) menor de tres, es decir, el SF más elevado no superaba en 3 veces al más bajo; proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5; y número de sondas presentes en el chip superior al 40%.

Los análisis comparativos se realizaron mediante el programa Dchip (Harvard School of Public Health and Dana-Farber Cancer Institute), el algoritmo SAM (Significance analysis microarray) y el software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood, CA). Los genes con cambios de expresión superiores a 2 veces (FC: *Fold Change*) tanto en sentido positivo como negativo se consideraron significativos.

Los colorgramas funcionales se realizaron con el “software” GeneCluster2 (Cancer genomics Group, Whitehead Institute for Biomedical Research).

10. Estudios de inmunofenotipo mediante citometría de flujo

Se analizó la expresión de los diferentes antígenos de membrana mediante la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD). Esta técnica consta de los siguientes pasos:

- Se depositaron en cada tubo $\approx 2 \times 10^6$ células en un volumen máximo de 200 μL /test y se añadieron hasta saturación 5-10 μL del correspondiente AcMo de la combinación antigénica especificada.
- Se mezcló bien y se incubó a T^a ambiente y en oscuridad durante 15 minutos.
- Se lisaron los hematíes añadiendo 2 mL de una dilución 1/10 de la solución de lisis “FACS Lysing Solution” (Becton/Dickinson, San José, CA, USA) con agua destilada e incubando durante 10 minutos en oscuridad y T^a ambiente.
- El producto lisado se centrifugó durante 5 minutos a 540 g, el sobrenadante obtenido se decantó y el botón leucocitario se resuspendió en 2 mL de PBS.
- Se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 540 g y se resuspendieron las células en 0,5 mL de PBS.
- Se procedió a la lectura en el citómetro de flujo.

10.1. Panel de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) empleados en este estudio (Tabla 6) estaban conjugados con uno de los siguientes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), pteridil-clorofil-proteína/cianina5.5 (PerCP/Cy5.5) y alofocianina (APC).

Se evaluó en las CP la expresión de marcadores de superficie asociados a línea B -CD19 -, así como de antígenos relacionados con células NK -CD56-, con la célula stem -CD117- y otras moléculas implicadas en vías de maduración -CD27- y activación B/T -CD28-, en procesos de adhesión -CD138- y activación celular -CD38,CD45.

El panel fue diseñado elaborando cuádruples combinaciones de AcMo; en todos los tubos se incluyó el AcMo anti-CD38 para identificar las CP. También se incluyó en el panel un tubo control para evaluar la autofluorescencia de las CP.

Tabla 6. Panel de anticuerpos monoclonales.

Tabla: Cuádruples Combinaciones de AcMo para el Estudio de las CP			
FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
CD38	Control	Control	Control
CD38	CD56	CD19	CD45
CD38	CD27	CD138	CD28
β 2-microglobulina	CD81	CD38	CD117

RESULTADOS

1. Capítulo I. Comparación de la eficacia y mecanismo de acción de dos fármacos inmunomoduladores (Lenalidomida y Pomalidomida) sobre células mielomatosas

1.1. Análisis de la eficacia en líneas celulares de MM

En primer lugar se determinó el efecto de cada fármaco en la supervivencia de células de MM. Para ello se utilizaron diferentes líneas celulares; tanto sensibles (MM1S, MM1R y MM144) como resistentes (RPMI-8226, U266, U266LR7, OPM1 y OPM2) a fármacos convencionales.

Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de cada fármaco y la viabilidad celular fue cuantificada mediante el ensayo de MTT. Los resultados se describen comparando el efecto de cada fármaco sobre cada línea celular a diferentes tiempos, y tomando como 100% la absorbancia de células control cultivadas solamente con el vehículo. En este sentido se realizaron diferentes experimentos.

1.1.1. Actividad de ambos IMIDs en monoterapia en líneas celulares de Mieloma Múltiple

Para comprobar si el efecto de Lenalidomida y Pomalidomida era dosis y tiempo dependiente se evaluó la viabilidad de la línea celular MM1S utilizando diferentes concentraciones de ambos fármacos (1 nM hasta 100 μ M) a diferentes tiempos (1 día hasta 5 días).

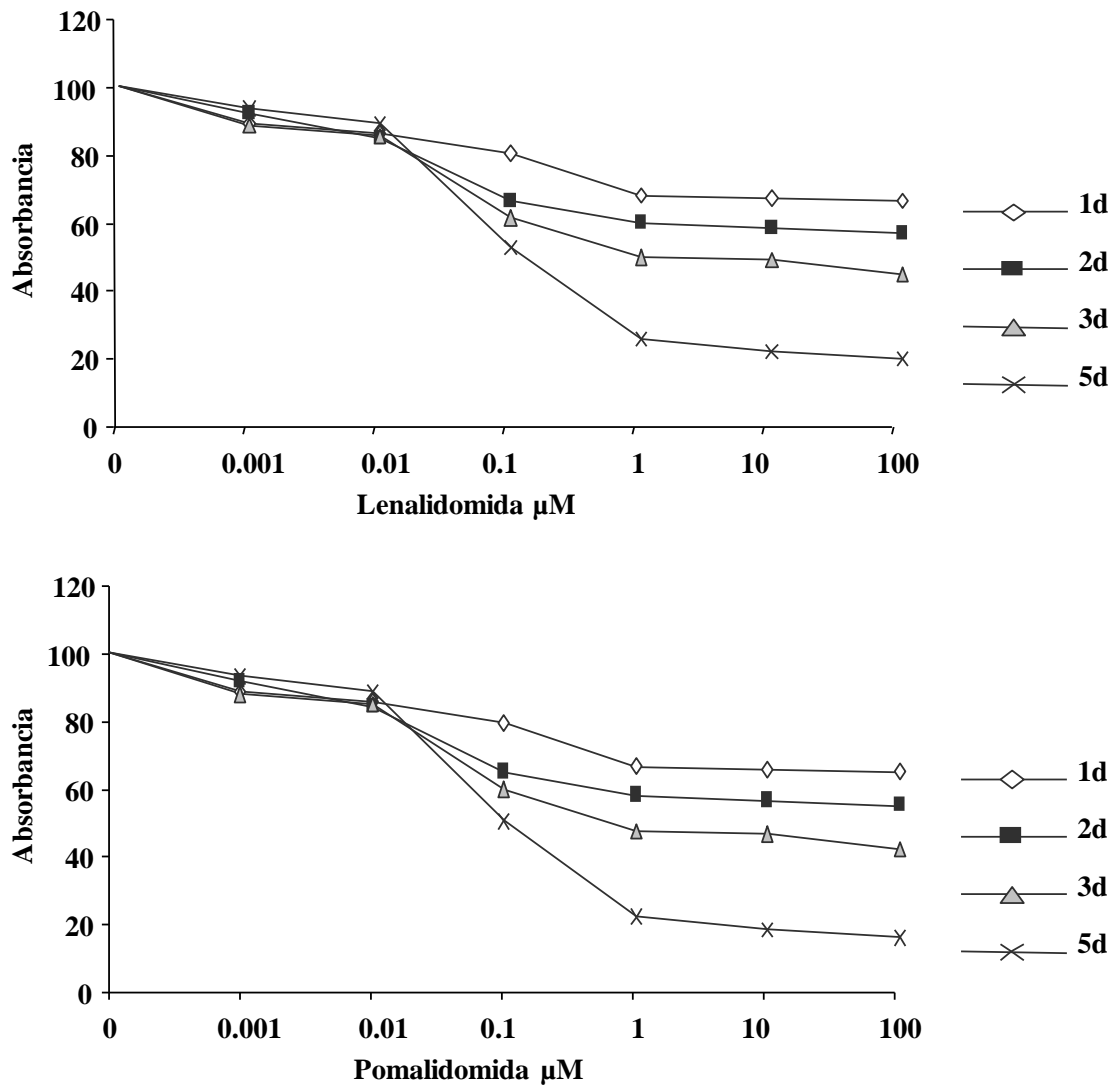


Figura 11. Efecto de Lenalidomida y Pomalidomida en MM1S a diferentes concentraciones y tiempos.

Como se observa en la figura 11, Lenalidomida y Pomalidomida inducen citotoxicidad de manera tiempo y dosis dependiente en la línea celular MM1S, con un IC₅₀ a los 3 días de 10 μM para Lenalidomida y 1 μM para Pomalidomida; siendo el IC₅₀ a los 5 días de 1 μM en Lenalidomida y 100 nM en Pomalidomida.

De este experimento se pueden extraer dos conclusiones fundamentales: Por una parte, estos fármacos precisan largos tiempos de exposición para ejercer un efecto citotóxico directo y, en segundo lugar, Pomalidomida es más potente que Lenalidomida.

Una vez definida que la mayor respuesta de estos fármacos se alcanza tras 5 días de cultivo, se analizó la eficacia a este tiempo de ambos IMIDs en distintas líneas celulares de MM, con características biológicas y patrones de sensibilidad a fármacos diferentes, como se observa en la figura 12.

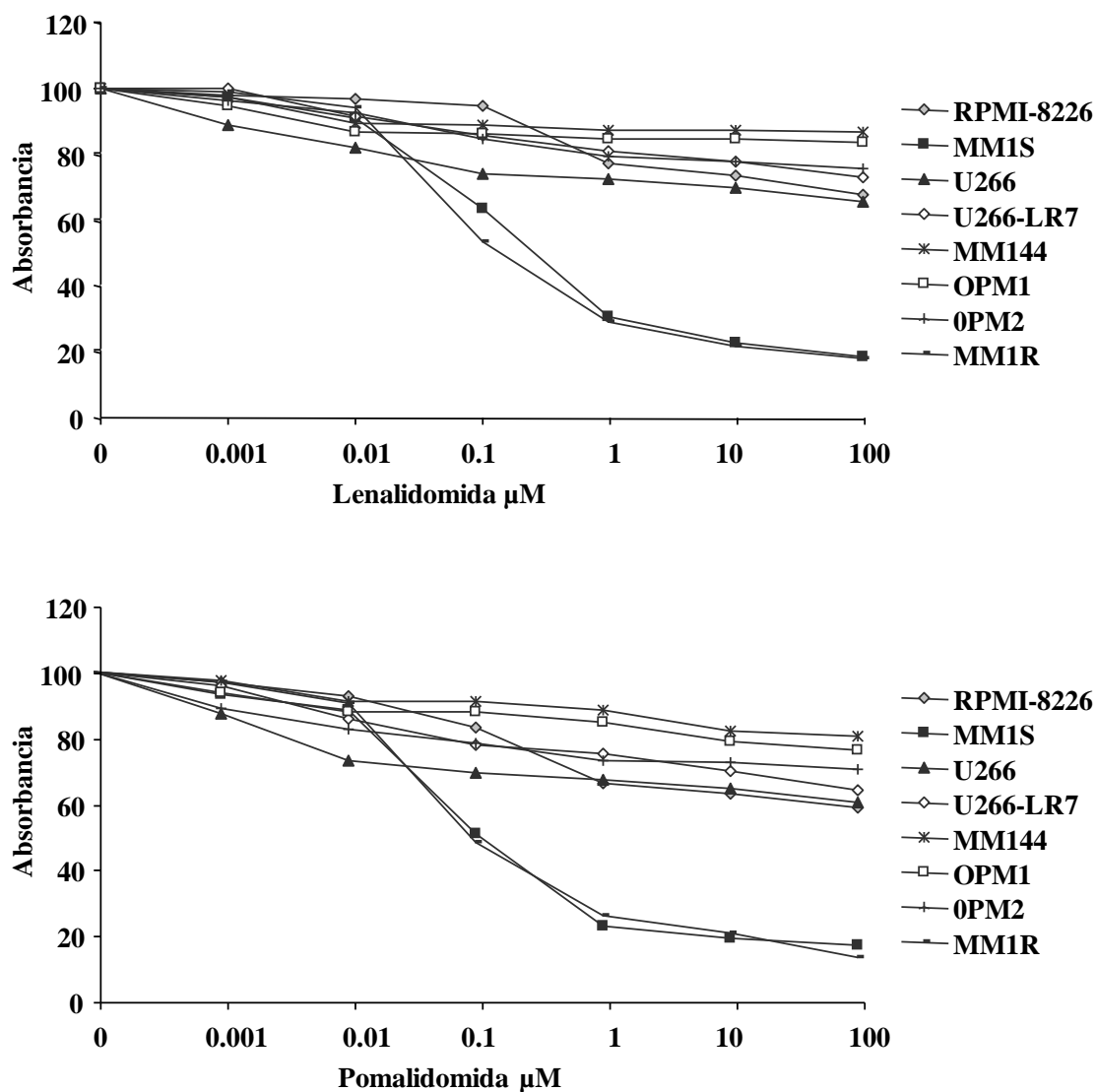


Figura 12. Dosis respuesta de Lenalidomida y Pomalidomida tras 5 días de tratamiento en diferentes líneas de MM.

En este experimento se observan dos patrones de sensibilidad: MM1S y MM1R fueron sensibles a ambos fármacos con IC50 de 1 μ M en Lenalidomida y 100 nM en Pomalidomida mientras que el resto de líneas celulares fueron casi completamente resistentes, reduciéndose la viabilidad un máximo del 30% a dosis de 10 y 100 μ M de Pomalidomida y Lenalidomida, respectivamente.

1.1.2. Actividad de ambos IMDs en combinación con Dexametasona en líneas celulares

Es bien conocido el efecto sinérgico de los esteroides cuando se combinan con IMiDs, tanto desde el punto de vista pre-clínico ^{105, 107, 152}, como clínico. Así con Lenalidomida más Dexametasona ²⁰⁻²¹ se presentaron dos ensayos clínicos en fase III con 351 pacientes en recaída cada uno obteniendo un 66% de respuestas parciales. Con Pomalidomida más Dexametasona ¹⁵³ se presentó un ensayo en fase II con 60 pacientes, obteniendo 65% de respuestas parciales. Ambos ensayos mostraron una eficacia similar en pacientes en recaída, aunque el ensayo de Pomalidomida se realizó en pacientes con enfermedad más avanzada.

Por ello, y dado que, como se ha descrito en el apartado anterior, la actividad citotóxica “*in vitro*” de Lenalidomida y Pomalidomida es limitada, posiblemente porque requieren ser metabolizados y porque requieren la presencia de células NK para generar la respuesta inmune (efecto inmunomodulador), posteriormente decidimos explorar comparativamente la capacidad de la Dexametasona para potenciar el efecto citotóxico de Lenalidomida y Pomalidomida.

Con el fin de abarcar un amplio rango de concentraciones y tiempos de la combinaciones de IMIDs más Dexametasona, y poder comparar el efecto sinérgico mediante el programa Calculusyn, establecimos concentraciones de los fármacos a ratio constante desde 0,01 μM hasta 100 μM tanto para Lenalidomida como para Pomalidomida y desde 0,1 nM hasta 1.000 nM para Dexametasona; a diferentes tiempos (12, 24, 48, 72, y 120 horas) en la línea celular MM1S.

Las figuras 13 y 14 muestran un ejemplo representativo de la actividad, medida mediante ensayo de MTT, de los fármacos Lenalidomida y Pomalidomida, ambos a 1 μM , como agentes individuales o en combinación con Dexametasona (10 nM), a los diferentes tiempos de tratamiento. Se puede observar que la adición de la Dexametasona es capaz de mejorar la eficacia de ambos IMIDs.

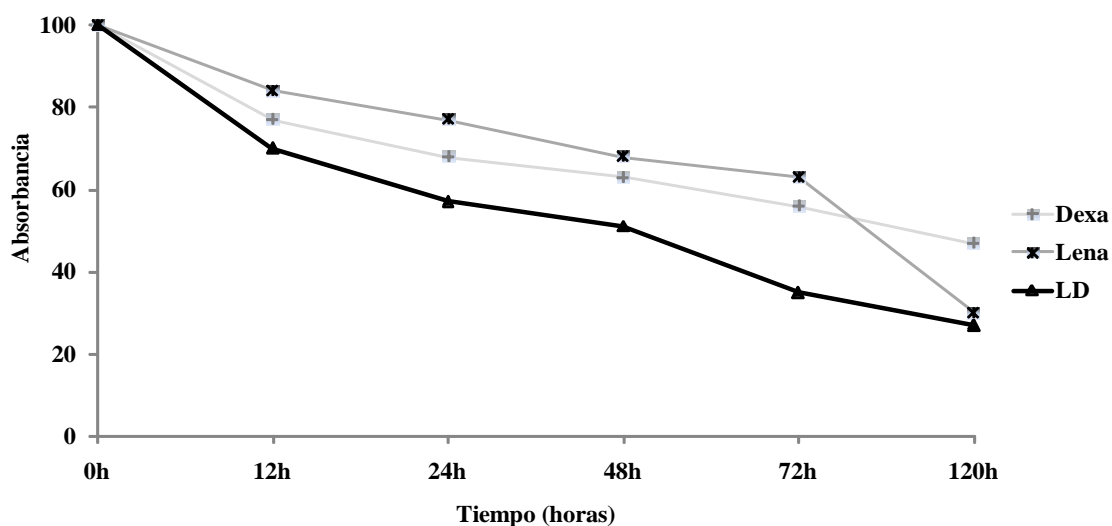


Figura 13. Tiempo Respuesta de la combinación de Lenalidomida + Dexametasona

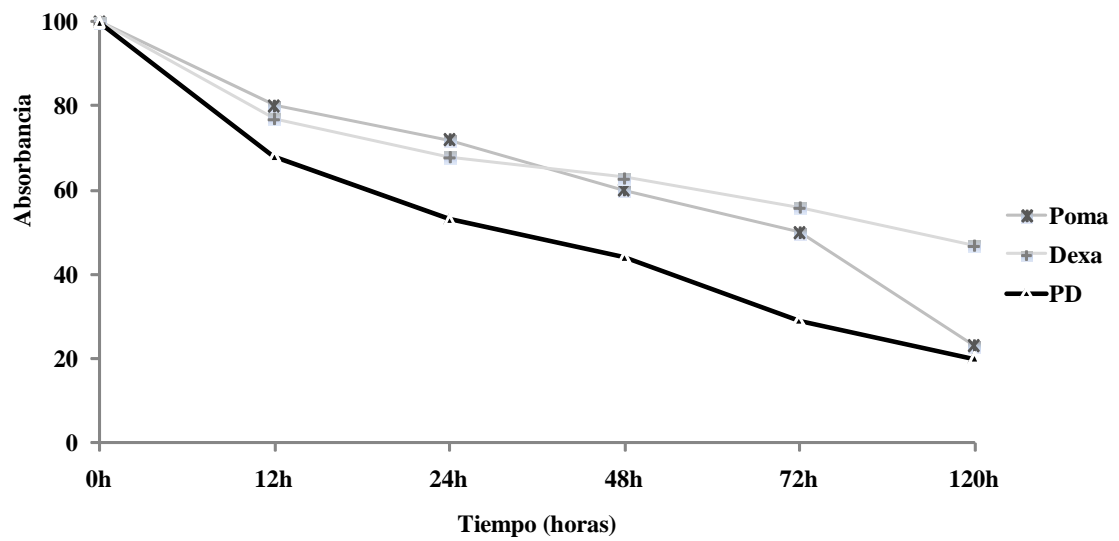


Figura 14. Tiempo Respuesta de la combinación de Lenalidomida + Dexametasona.

Cuando el efecto de la combinación fue cuantificado mediante el método de Chou Talalay con el programa Calcsyn, todas las combinaciones con Lenalidomida o Pomalidomida más Dexametasona, revelaron una gran potenciación, con índices de combinación en rangos altamente sinérgicos (muchos de ellos menores a 0,1 lo que indica un sinergismo muy fuerte). No se demostraron diferencias significativas en cuanto a potenciación entre Lenalidomida y Pomalidomida.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia e índices de combinación de la combinación de Lenalidomida o Pomalidomida más Dexametasona a distintas dosis y tiempos

Dosis: Lena μM / Dexa nM			Lenalidomida + Dexametasona				
			0,01/0,1	0,1/1	1/10	10/100	100/1000
12h	% Supervivencia	Lena	95	89	80	74	62
		Dexa	91	86	77	72	62
		Lena+Dexa	75	72	68	60	55
	Índice de Combinación (IC)		0,01	0,02	0,1	0,24	1,13
24h	% Supervivencia	Lena	91	75	73	60	54
		Dexa	83	71	68	65	55
		Lena+Dexa	67	64	52	47	44
	Índice de Combinación (IC)		0,02	0,1	0,03	0,12	0,3
48h	% Supervivencia	Lena	88	70	60	52	47
		Dexa	76	66	63	56	48
		Lena+Dexa	58	51	44	41	36
	Índice de Combinación (IC)		0,01	0,01	0,04	0,06	0,24
72h	% Supervivencia	Lena	82	65	50	42	39
		Dexa	64	61	55	45	41
		Lena+Dexa	54	41	29	24	20
	Índice de Combinación (IC)		0,07	0,01	0,01	0,03	0,14
120h	% Supervivencia	Lena	77	50	23	19	17
		Dexa	59	52	47	18	12
		Lena+Dexa	43	30	20	10	7
	Índice de Combinación (IC)		0,11	0,16	0,35	0,22	0,71
Dosis: Poma μM / Dexa nM			Pomalidomida + Dexametasona				
12h	% Supervivencia	Poma	97	91	84	78	67
		Dexa	91	86	77	72	62
		Poma+Dexa	78	74	70	63	59
	Índice de Combinación (IC)		0,01	0,02	0,08	0,18	0,74
24h	% Supervivencia	Poma	95	82	77	71	64
		Dexa	83	71	68	65	55
		Poma+Dexa	71	70	57	54	48
	Índice de Combinación (IC)		0,01	0,03	0,02	0,06	0,41
48h	% Supervivencia	Poma	89	79	68	59	53
		Dexa	76	66	62	56	48
		Poma+Dexa	60	56	51	44	40
	Índice de Combinación (IC)		0,004	0,01	0,01	0,1	0,37
72h	% Supervivencia	Poma	88	69	53	46	42
		Dexa	64	62	55	45	41
		Poma+Dexa	58	44	34	29	24
	Índice de Combinación (IC)		0,02	0,005	0,004	0,01	0,04
120h	% Supervivencia	Poma	80	63	30	22	18
		Dexa	60	52	47	18	12
		Poma+Dexa	49	36	27	14	10
	Índice de Combinación (IC)		0,06	0,08	0,12	0,08	0,25

1.2. Análisis de la eficacia en células procedentes de pacientes con MM

Una vez estudiados la actividad “*in vitro*” de ambos fármacos y sus combinaciones con Dexametasona en líneas celulares de MM, se analizó su efecto en células procedentes de aspirados de médula ósea (MO) de pacientes con MM. Gracias a nuestro método basado en citometría de flujo multiparamétrica, fue posible evaluar simultáneamente el efecto que estos fármacos causaban en diferentes poblaciones celulares como son las células plasmáticas (CP) tumorales y los linfocitos no tumorales.

1.2.1. Actividad “*ex vivo*” de ambos de IMiDs en monoterapia en células procedentes de pacientes

Se analizaron muestras de 6 pacientes, 2 de ellos de nuevo diagnóstico y 4 en recaída, que fueron tratados “*ex vivo*” con dosis crecientes de Lenalidomida y Pomalidomida, durante 48 horas. En todos los pacientes se observó un efecto dosis respuesta que fue similar para Lenalidomida y Pomalidomida, sin embargo fueron precisas dosis altas (100 μ M) para alcanzar una apoptosis superior al 30%. Además en ningún caso la apoptosis superó el 50% (Figura 15).

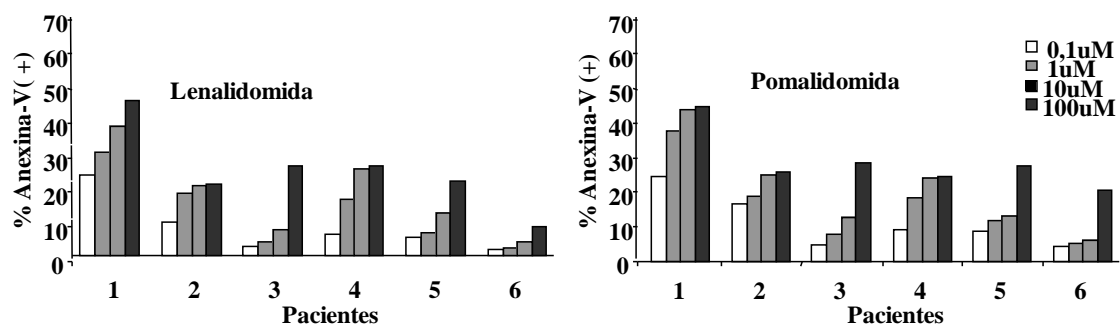


Figura 15. Efecto de ambos IMiDs en monoterapia, sobre células plasmáticas procedentes de pacientes.

Por el contrario ninguno de los dos fármacos indujo toxicidad en los linfocitos normales de los pacientes (Figura 16), indicando que Lenalidomida y Pomalidomida tienen una selectividad sobre la célula plasmática tumoral con escasa citotoxicidad sobre linfocitos.

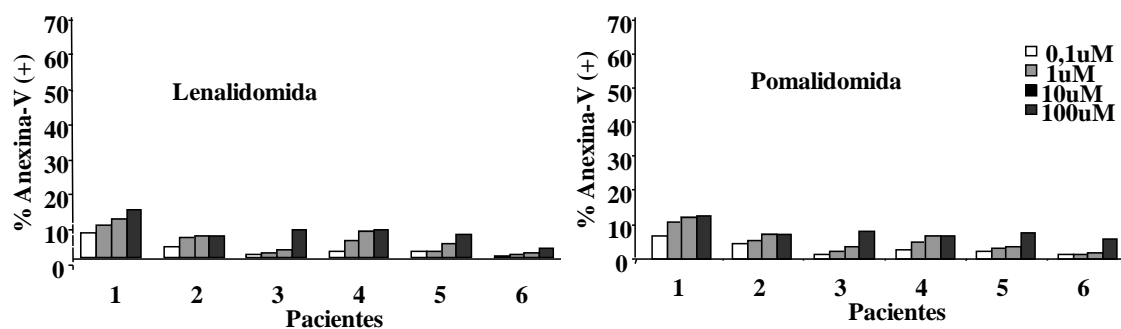


Figura 16. Efecto de ambos IMiDs en monoterapia, sobre linfocitos normales procedentes de pacientes.

1.2.2. Actividad “*ex vivo*” de ambos IMiDs en combinación con Dexametasona en células procedentes de pacientes

Para evaluar el efecto de la combinación se trataron células de 12 pacientes, 5 de nuevo diagnóstico y 7 en recaída, con Lenalidomida o Pomalidomida (10 μ M) en combinación con Dexametasona (20 nM) durante 48 horas. Como se observa en las figuras 17 y 18, en todos los casos la combinación de IMiDs con Dexametasona, tuvo mayor efecto anti-mieloma que los fármacos individuales. De nuevo el patrón de sensibilidad fue similar para las combinaciones de Lenalidomida o de Pomalidomida, demostrándose una especial potenciación en los pacientes 1, 2, 4, 5, 7 y 11 en el caso de Lenalidomida y 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11 para Pomalidomida.

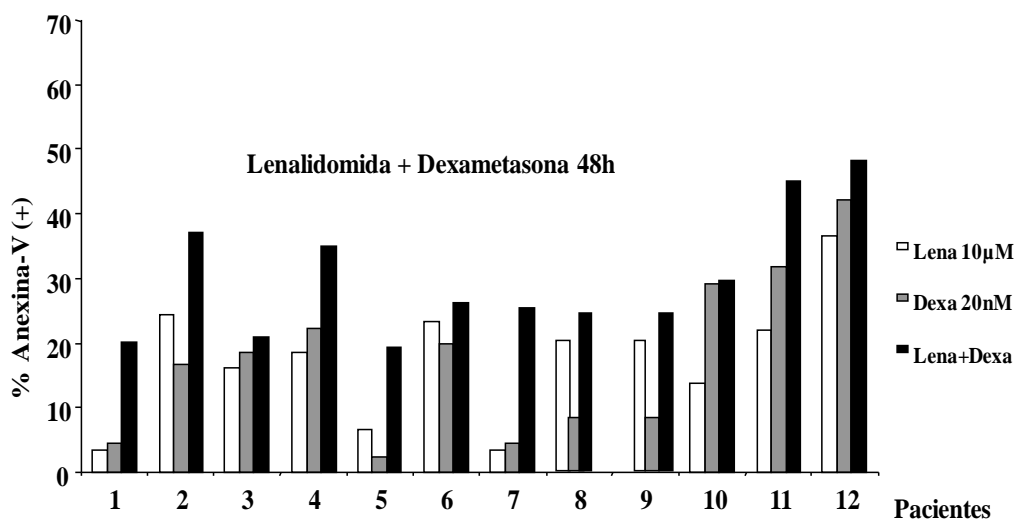


Figura 17. Efecto de Lenalidomida más Dexametasona en células procedentes de pacientes.

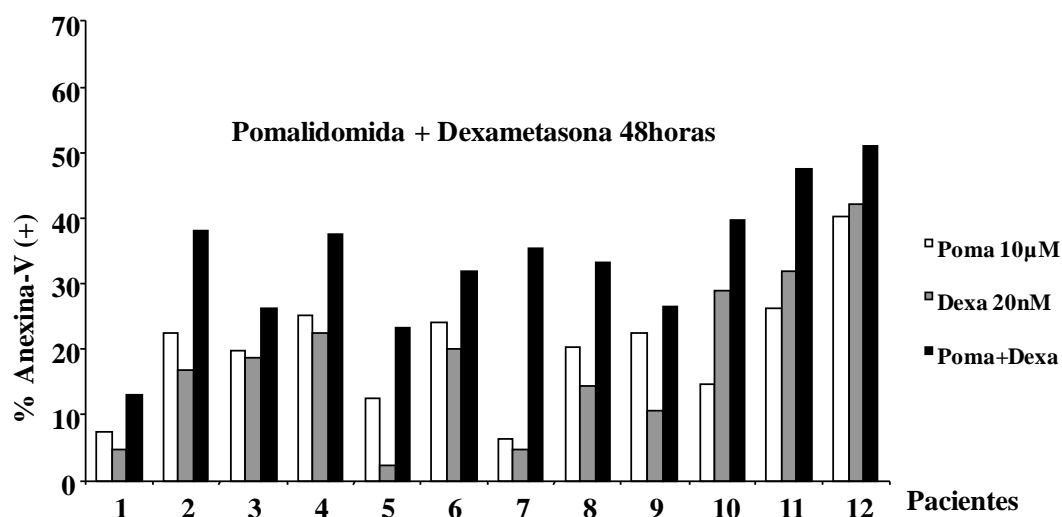


Figura 18. Efecto de Pomalidomida más Dexametasona en células procedentes de pacientes.

Con respecto a la toxicidad de linfocitos no tumorales, la dosis de Dexametasona de 20 nM produce una ligera citotoxicidad frente a ellos, pero como se observa en las figuras 19 y 20, la adición de IMiDs no aumenta el efecto citotóxico, lo que indica que, a diferencia de lo que ocurre con las células plasmáticas, no existe sinergismo en el efecto tóxico de la combinación frente a los linfocitos.

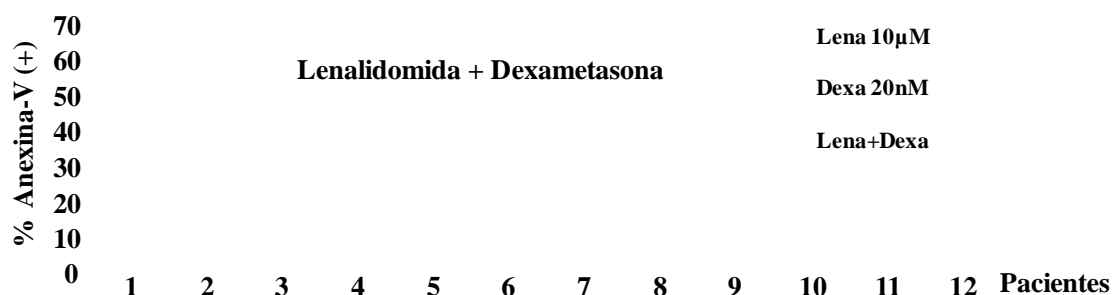


Figura 19. Efecto de Lenalidomida más Dexametasona en linfocitos normales procedentes de pacientes.

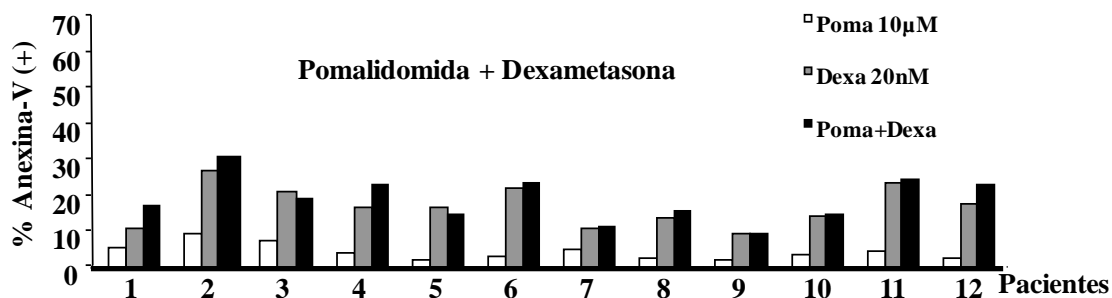


Figura 20. Efecto de Pomalidomida más Dexametasona en linfocitos normales procedentes de pacientes.

1.3. Estudio del efecto de los IMiDs, individualmente o en combinación con Dexametasona, en presencia del micromedioambiente

En el Mieloma Múltiple, el micromediambiente de la médula ósea, estimula la proliferación y confiere a la célula plasmática tumoral mecanismos de resistencia a drogas.

La adhesión de las células mielomatosas a las células estromales de la médula ósea (BMSC) de la MO provoca la secreción de citocinas y factores de crecimiento

como IL-6 ó IGF-1³⁷ que disparan diferentes vías de señalización como PI3K/AKT/mTOR, MEK/ERK o NF- κ B y confieren ventaja proliferativa a la célula tumoral.

En primer lugar se comprobó que la adición tanto de IGF-1 (10 nM) como de IL-6 (10 nM) provocó un aumento de la proliferación de MM1S. Con la técnica de MTT se observó que, tras 5 días de tratamiento ambos factores produjeron un aumento de entorno al 50%-60% en la viabilidad celular. Sin embargo, tanto Lenalidomida como Pomalidomida fueran capaces de vencer de forma dosis dependiente la ventaja proliferativa conferida por estas citocinas (Figuras 21, 22, 23 y 24).

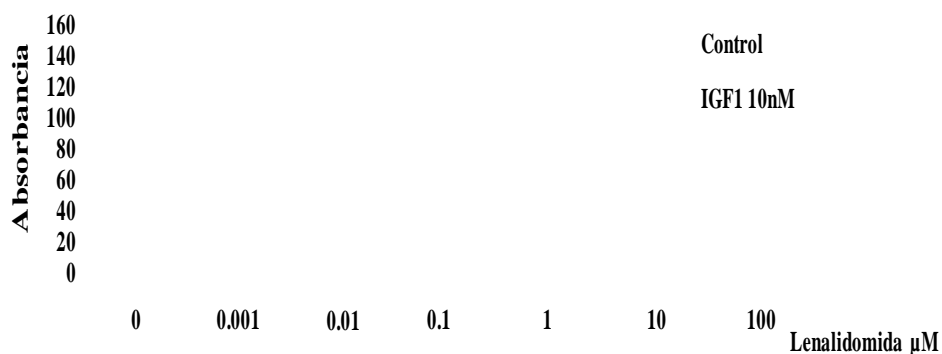


Figura 21. Efecto de Lenalidomida en células MM1S en presencia de IGF-1.

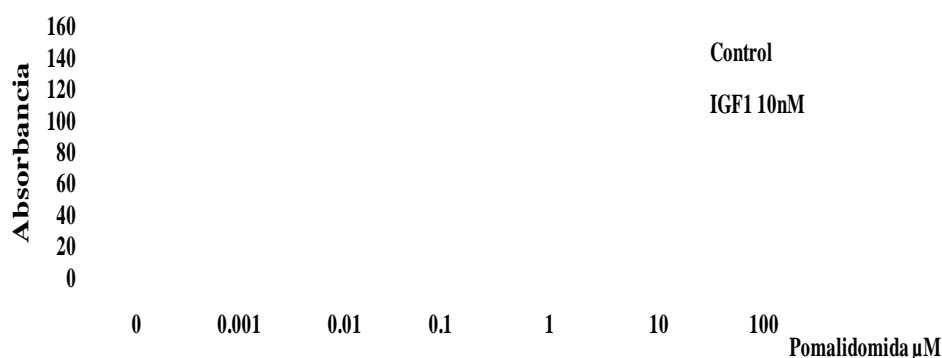


Figura 22. Efecto de Pomalidomida en células MM1S en presencia de IGF-1.

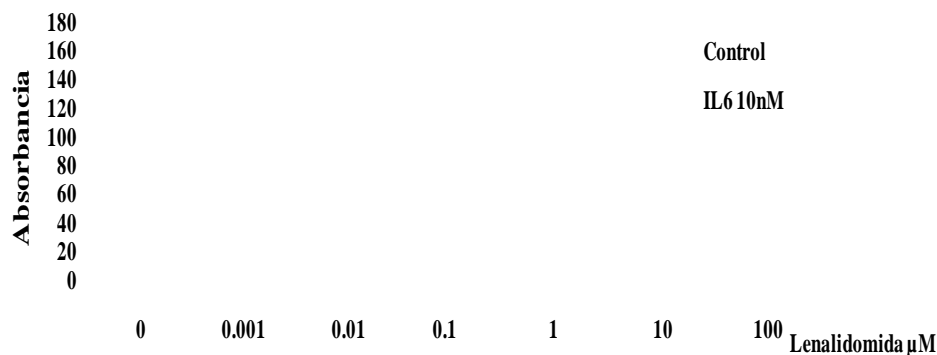


Figura 23. Efecto de Lenalidomida en células MM1S en presencia de IL-6

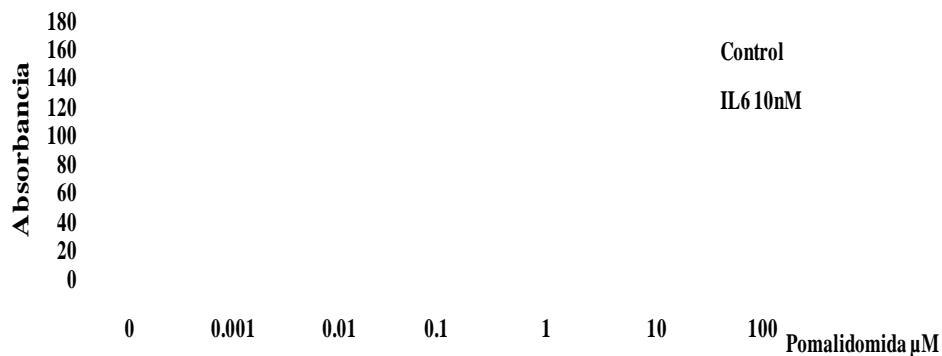


Figura 24. Efecto de Pomalidomida en células MM1S en presencia de IL-6.

Una vez conocida la actividad de ambos IMIDs en presencia de IGF-1 e IL-6, se analizó si también eran capaces de vencer el efecto protector mediado por la adhesión de las células mielomatosas a las células estromales de médula ósea (BMSC).

Para ello, se incubaron células MM1S trasfectadas con un vector de luciferasa con las BMSC procedentes de un paciente con MM y añadimos IMIDs a concentraciones crecientes. Tras 5 días de tratamiento se detectó mediante luminiscencia, un aumento de proliferación de más de un 100% de las MM1S que estaban en contacto con las BMSC. De nuevo, ambos IMIDS fueron capaces de vencer, al menos parcialmente, esta ventaja proliferativa, como se observa en las figuras 25 y 26.

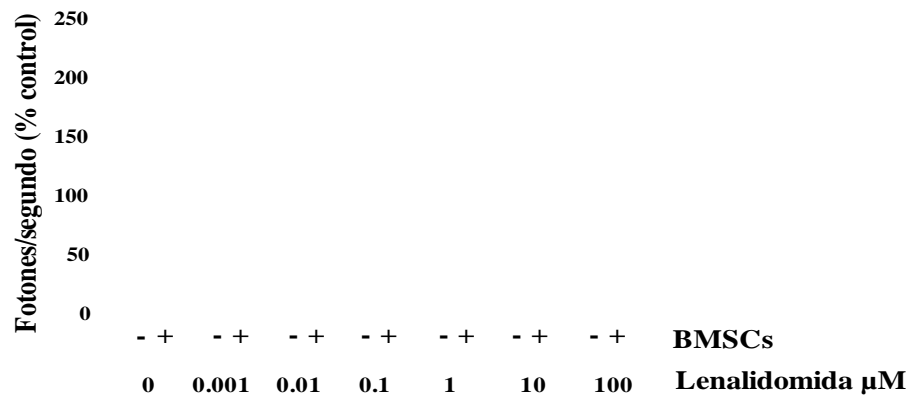


Figura 25. Efecto de Lenalidomida en células MM1S-luc en contacto con BMSC.

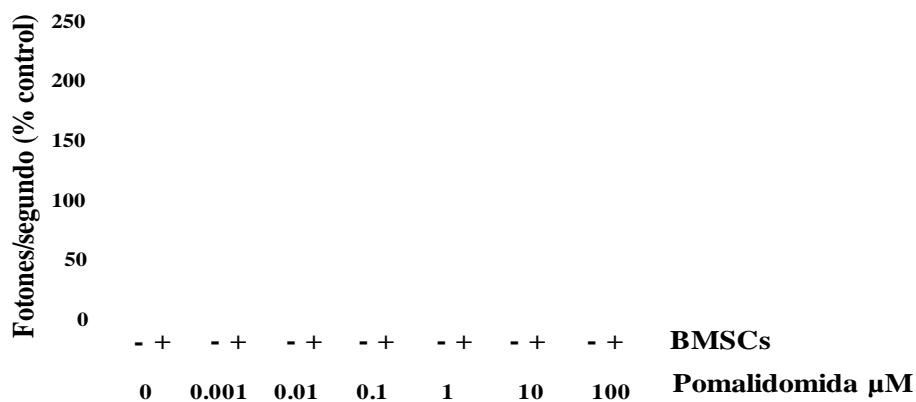


Figura 26. Efecto de Pomalidomida en células MM1S-luc en contacto con BMSC.

Así mismo se comprobó el efecto potenciador de la Dexametasona con ambos IMIDs en presencia del micromedioambiente representado por la adición de IGF-1 e IL-6 (figuras 25 y 26) y en co-cultivo con BMSC (figura 29). Una vez más se observó que la combinación es superior a los fármacos individuales.



Figura 27. Efecto de ambos IMIDs en combinación con Dexametasona en células MM1S en presencia de IGF-1.



Figura 28. Efecto de ambos IMIDs en combinación con Dexametasona en células MM1S en presencia de IGF-1.

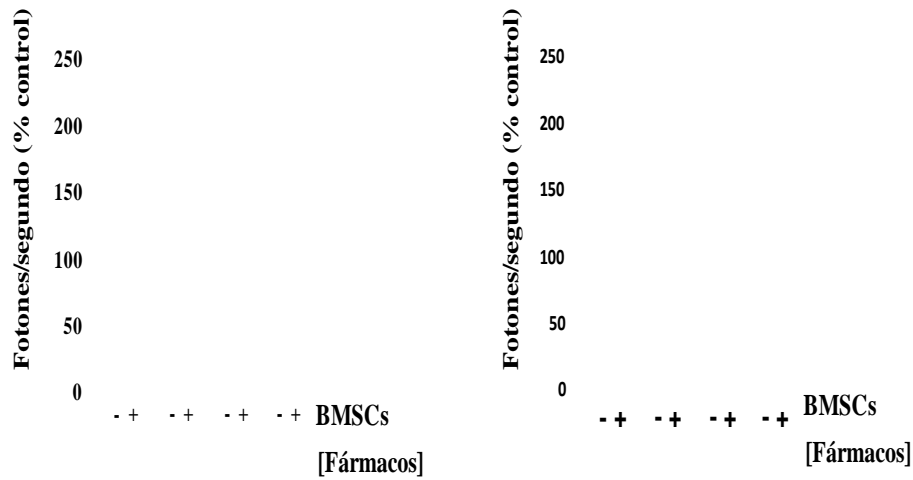


Figura 29. Efecto de ambos IMIDs en combinación con Dexametasona en células MM1S en presencia de BMSC.

Finalmente se confirmó que ni los IMIDs, ni la Dexametasona, ni tampoco las combinaciones de IMIDs con Dexametasona disminuían la viabilidad de las BMSC, después de 5 días de tratamiento (Figuras 30, 31 y 32).

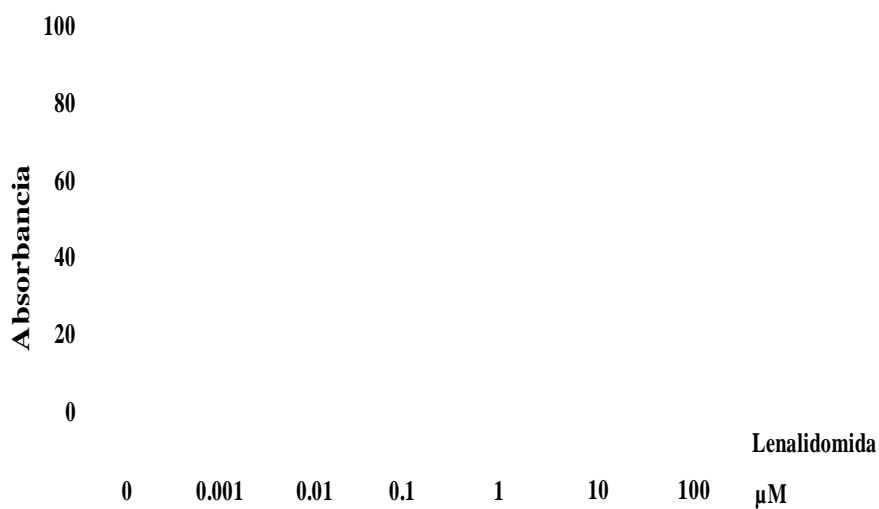


Figura 30. Efecto de Lenalidomida sobre células estromales de médula ósea.

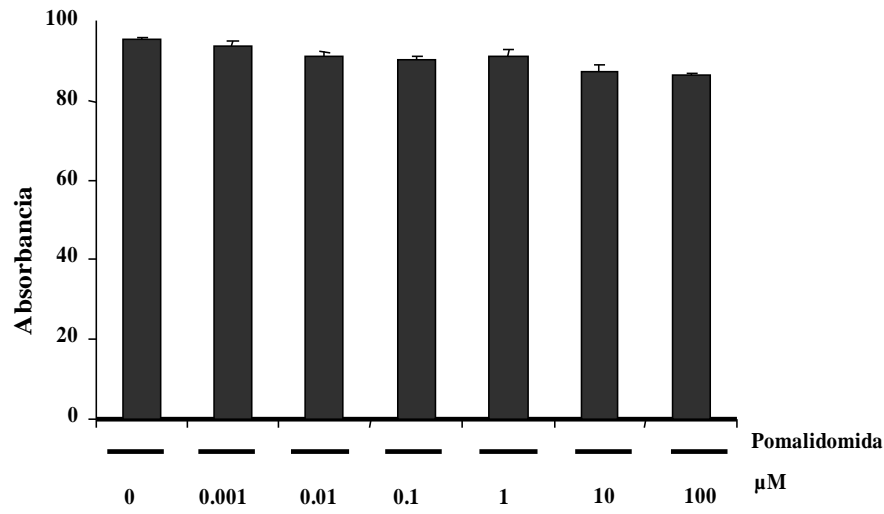


Figura 31. Efecto de Pomalidomida sobre células estromales de médula ósea.



Figura 32. Efecto de ambos IMIDs en combinación con Dexametasona sobre células estromales de médula ósea.

1.4. Estudio de la eficacia “*in vivo*”

Para el estudio de la eficacia “*in vivo*” de Lenalidomida o Pomalidomida, usados como agentes únicos o asociados a Dexametasona, se emplearon ratones CB17-SCID en los cuales se inocularon en el flanco derecho 3×10^6 células MM1S. Se establecieron los siguientes esquemas de tratamiento: Lenalidomida 25 mg/kg, 5 veces por semana, Pomalidomida 5 mg/kg, 5 veces por semana, Dexametasona 1 mg/kg, 2 veces por semana, así como las combinaciones dobles Lenalidomida y Pomalidomida con Dexametasona, siguiendo las mismas pautas en dosis y días que con los agentes individuales.

Si analizamos la situación de los tumores a diferentes momentos de tratamiento se observa que todos los fármacos administrados fueron capaces de controlar el tumor inicialmente, al compararlo con el grupo de ratones no tratados, en los que el crecimiento tumoral se empezó a detectar entre los días +12 y +15 (Figura 33). Las primeras diferencias entre los grupos de ratones sometidos a tratamiento, se detectó a partir del día 25. En esa fecha el volumen del tumor en los ratones tratados con Lenalidomida alcanzaba 350 mm^3 y en los que recibían Dexametasona 380 mm^3 (Figura 33). El resto de los esquemas de tratamiento en el día 25 fueron capaces de controlar e incluso disminuir el volumen del tumor a valores inferiores a 100 mm^3 . En el grupo control en esa fecha el volumen tumoral era de aproximadamente 600 mm^3 (Figura 33).

En el día 50 de tratamiento, en los ratones tratados con Lenalidomida el volumen tumoral supera los 800 mm^3 y con Dexametasona los 1.000 mm^3 , observándose a partir de ese momento un crecimiento exponencial del plasmocitoma, más acusado en el grupo tratado con Dexametasona (Figura 33), lo que indica que las células tumorales

escapan completamente a la acción de estos fármacos utilizados de forma individual. Por el contrario, en la misma fecha Pomalidomida individualmente o las combinaciones de Lenalidomida con Dexametasona y Pomalidomida con Dexametasona mantienen la eficacia y son capaces de controlar el tumor presentado unos valores tumorales inferiores a 300 mm^3 . En el grupo control el volumen tumoral en ese momento era de aproximadamente 1.400 mm^3 .

A los 75 días del comienzo del experimento, en los ratones tratados con Lenalidomida más Dexametasona se observó una pérdida de eficacia terapéutica con un mayor crecimiento tumoral que en los ratones tratados con Pomalidomida o Pomalidomida más Dexametasona (Figura 33). De hecho cuando en el grupo de Lenalidomida más Dexametasona los tumores alcanzan un volumen de 1.300 mm^3 el crecimiento se hace exponencial y similar al de los controles.

A partir del día 100 se producen las primeras diferencias entre Pomalidomida y Pomalidomida más Dexametasona ya que mientras la combinación sigue controlado parcialmente el crecimiento tumoral, en el caso de Pomalidomida aislada éste se hace exponencial (Figura 33). En este punto los ratones de la combinación de Lenalidomida más Dexametasona tuvieron que ser sacrificados, al igual que se había hecho en fechas previas con los tratados con fármacos de forma individual, por alcanzar los plasmocitomas tamaños mayores de 4.000 mm^3 .

En una visión general del experimento se constata que, comparando los IMiDs individualmente, Pomalidomida es más eficaz y potente que Lenalidomida aunque la dosis utilizada sea 5 veces menor. Con respecto a la Dexametasona este fármaco fue utilizado a dosis subóptimas, ya que sólo consiguió retrasar ligeramente el crecimiento tumoral; sin embargo su combinación con Lenalidomida aumenta la eficacia de manera

considerable, lo que es un claro signo del sinergismo farmacológico entre estos fármacos. En lo que se refiere a su combinación con el otro fármaco inmunomodulador; Pomalidomida sola o en combinación con Dexametasona mantienen una eficacia similar durante los primeros 3 meses del ensayo “*in vivo*”, y solo a partir de esa fecha se observa una ventaja para la combinación, lo que indicaría posiblemente que Pomalidomida no necesita tanto como Lenalidomida de la adición de Dexametasona para controlar los plasmocitomas. También al comparar las combinaciones de ambos IMiDs con Dexametasona, aunque ambas controlen de manera similar el tumor en la primera etapa (hasta día +75), posteriormente es más eficaz la combinación de Pomalidomida.

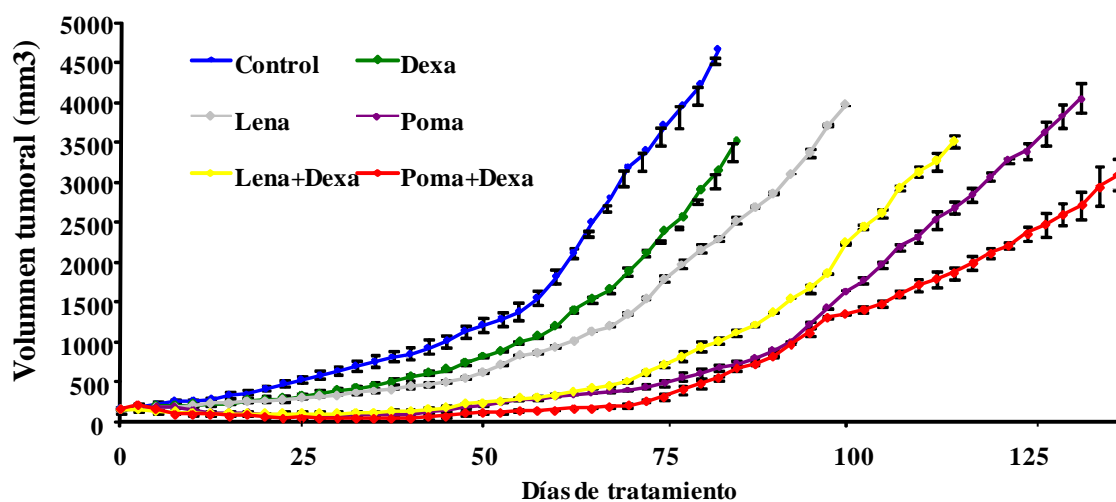


Figura 33. Evolución del tamaño tumoral de los ratones tratados.

En comparación con el grupo de ratones control, se objetivó una ventaja de 10 días para los ratones tratados con Dexametasona, de 20 días para los que recibieron Lenalidomida y de 62 días para el grupo de Pomalidomida, siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para Lenalidomida ($p=0,06$) y para Pomalidomida ($p=0,06$). Así, con respecto a las combinaciones, la adición de

Dexametasona mejoró significativamente la supervivencia de los IMiDs individualmente, siendo de 45 días para Lenalidomida más Dexametasona ($p=0,09$ en comparación con Lenalidomida) y de 100 días para Pomalidomida con Dexametasona ($p=0,09$ en comparación con Pomalidomida). Por último al comparar la supervivencia de ratones tratados con ambas combinaciones de IMiDs más Dexametasona, la supervivencia de Pomalidomida más Dexametasona fue significativamente superior ($p=0,09$).

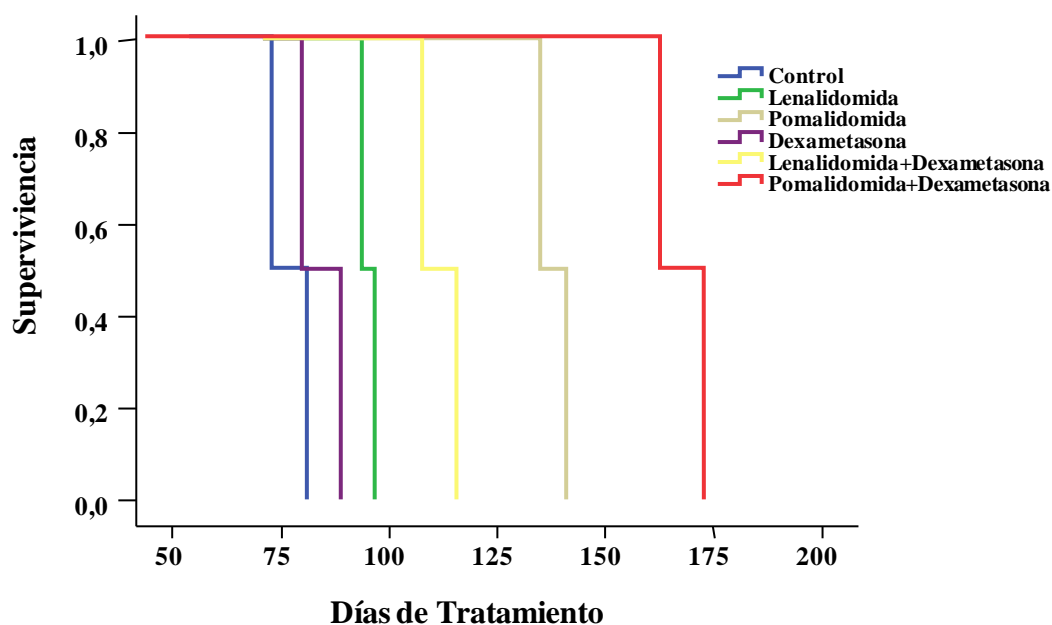


Figura 34. Supervivencia de los ratones tratados.

Debe reseñarse que ningún tratamiento de los empleados presentó toxicidad sistémica, objetivándose únicamente una ligera pérdida de peso (menor al 5%), en los ratones a los que se les administraron las combinaciones en comparación con el grupo de ratones control que no recibieron ningún tratamiento (Figura 35).

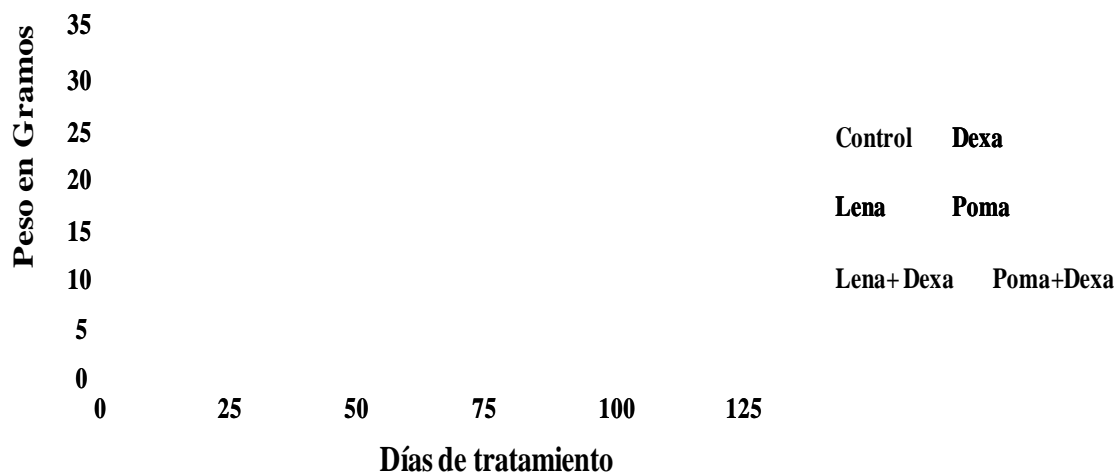


Figura 35. Evolución del peso de los ratones tratados.

1.5. Estudio del Mecanismo de Actuación de los IMiDs en monoterapia y en combinación con Dexametasona

La disminución de la viabilidad observada en los MTT puede ser debida a dos mecanismos fundamentalmente: a) la inducción de muerte, generalmente por apoptosis, y b) un descenso en la proliferación, que se manifestaría en cambios en el perfil del ciclo celular. Se han estudiado ambos mecanismos tras el tratamiento con ambos fármacos inmunomoduladores y sus combinaciones con Dexametasona.

1.5.1. Análisis del efecto sobre la apoptosis

El estudio de la potencial inducción de apoptosis por Lenalidomida y Pomalidomida, y sus combinaciones con Dexametasona, se realizó inicialmente mediante el marcaje con Anexina-V y su análisis por citometría de flujo.

Ambos fármacos en monoterapia indujeron apoptosis en las células MM1S de una forma dosis (Figura 36) y tiempo (Figura 37) dependiente. La potencia de ambos compuestos fue parecida, aunque de forma similar a lo descrito en los ensayos de viabilidad por MTT, Pomalidomida mostró una actividad ligeramente superior. Como se puede observar, de nuevo fueron necesarios tiempos de tratamiento largos (3 ó 5 días) para observar este efecto sobre la apoptosis.

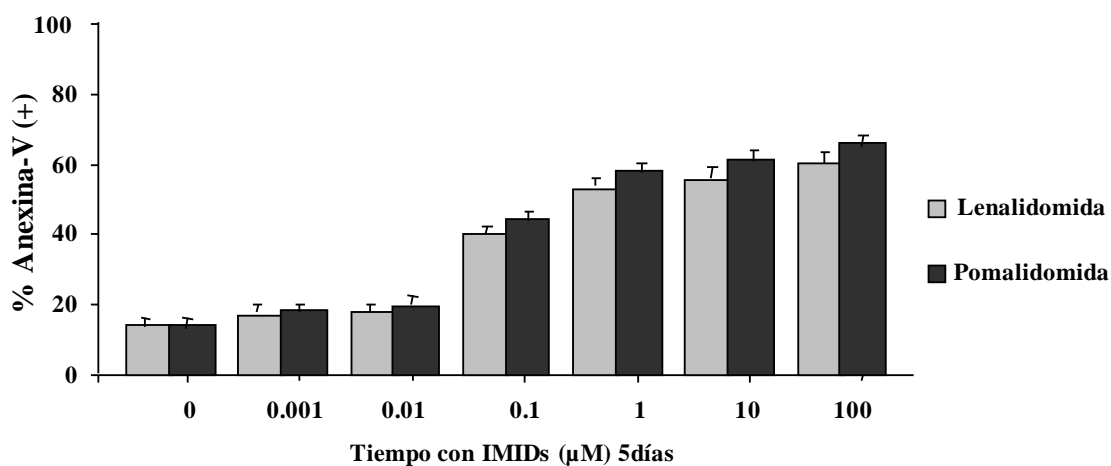


Figura 36. Dosis respuesta por Annexina-V de ambos IMiDs en células MM1S tras 5 días de tratamiento

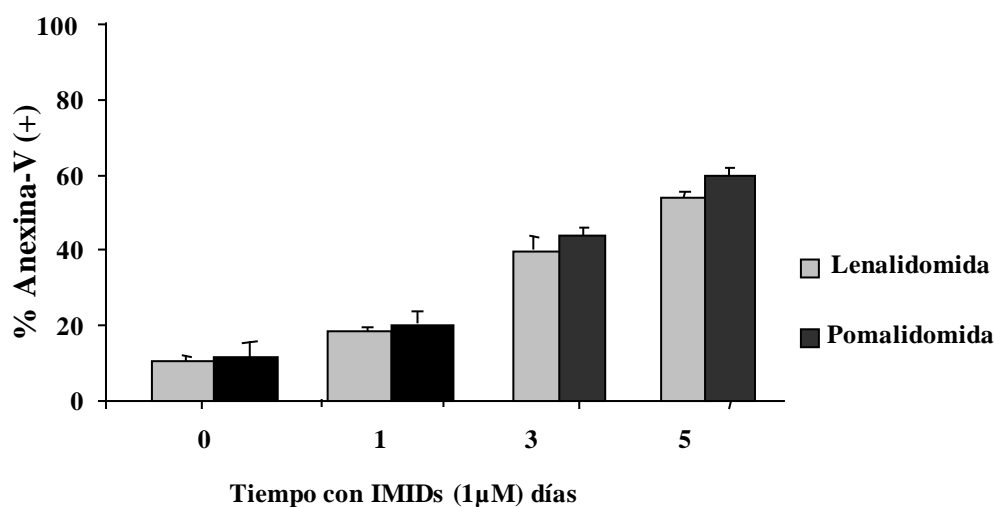


Figura 37. Tiempo respuesta de ambos IMiDs a dosis 1 μM en células MM1S.

Nuevamente se evaluó si la adición de Dexametasona era capaz de potenciar el efecto pro-apoptótico de ambos agentes inmunomoduladores. La combinación con dosis bajas de Dexametasona fue capaz de incrementar el porcentaje de células Anexina-V positivas incluso a tiempos tempranos como 1 ó 3 días, aunque este efecto se observó con mayor claridad a los 5 días de cultivo (Figura 38). De nuevo, Pomalidomida con Dexametasona mostró una potencia ligeramente superior a Lenalidomida con Dexametasona.

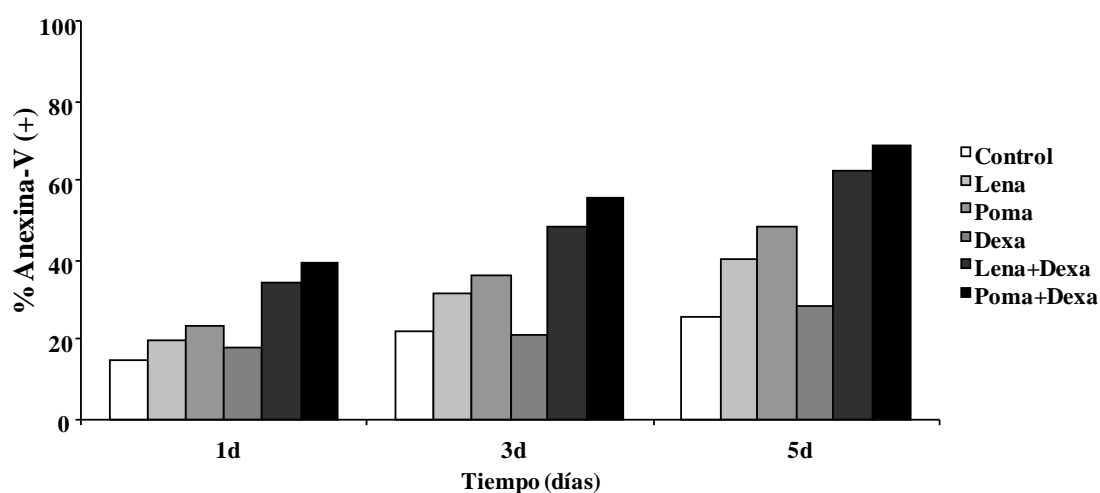


Figura 38. Tiempo respuesta por Anexina-V de la combinación de ambos IMIDs (1 μ M) con Dexametasona (2 nM) en células MM1S.

Con el fin de determinar las vías implicadas en la apoptosis inducida por estos fármacos (solos o en combinación con Dexametasona) se analizó mediante WB la modificación de las principales caspasas implicadas en este proceso.

Con respecto a los fármacos en monoterapia, ambos IMIDs indujeron procesamiento de PARP y de las caspasas efectoras (C-3 y C-7). Este procesamiento derivó fundamentalmente de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis a través de

caspasa 8 (Figura 39). Por el contrario, Dexametasona indujo el procesamiento de caspasa 9, principal representante de la vía intrínseca de la apoptosis, aunque la activación de esta vía no fue suficiente para inducir procesamiento de caspasa 3 ni de PARP (Figura 39).

La combinación de IMIDs con Dexametasona, generó la activación simultánea de ambas vías de apoptosis, tanto intrínseca como extrínseca, lo que conllevó la activación de la caspasa 3 y PARP incluso a tiempos muy cortos de tratamiento. También se observó un aumento de procesamiento de caspasa 7 con la combinación en comparación con la acción de IMIDs en monoterapia.

Estos resultados podrían contribuir a explicar el sinergismo observado en las combinaciones.

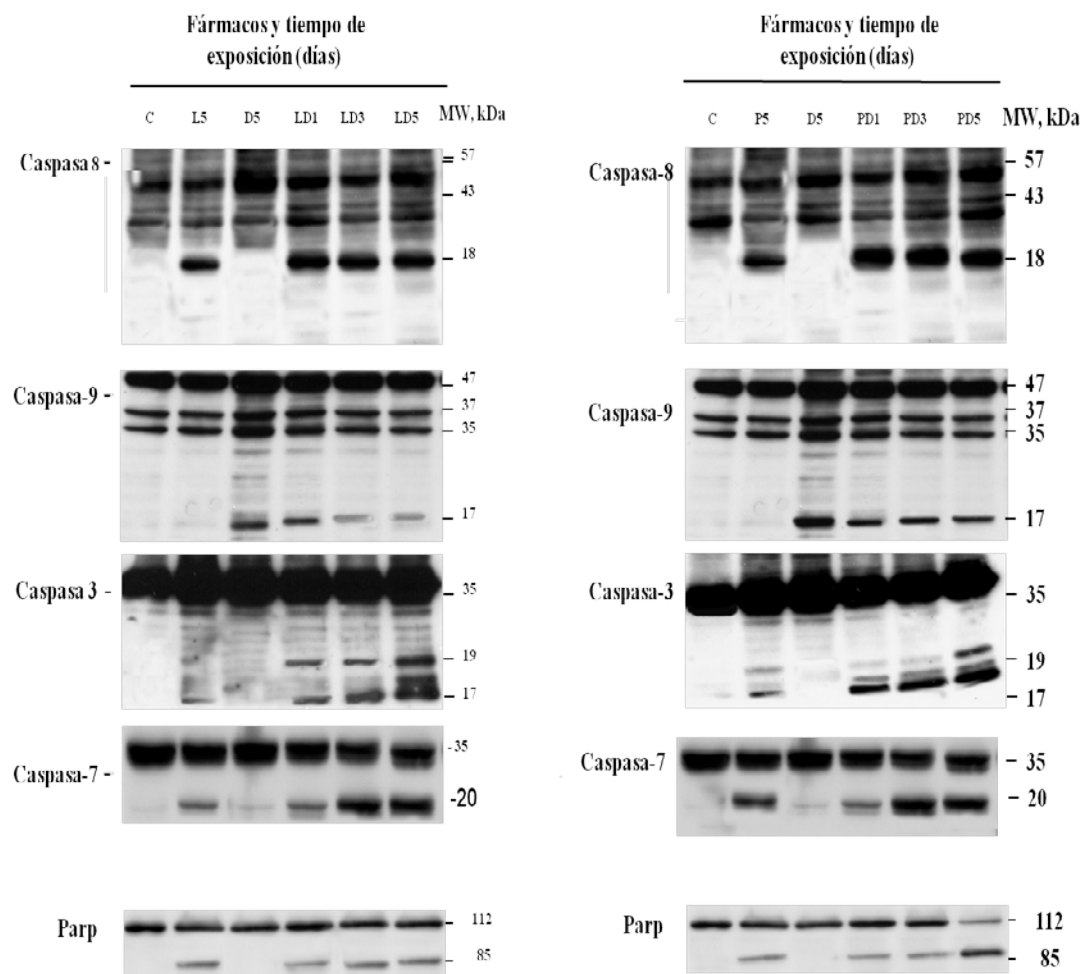


Figura 39. Análisis mediante WB de proteínas implicadas en la apoptosis tras tratamiento con Lenalidomida y Pomalidomida (1 μ M) con o sin Dexametasona (2 nM) y a 1, 3 y 5 días de tratamiento

Con objeto de profundizar y confirmar el papel de las caspasas en la apoptosis por ambos IMIDs y su combinación con Dexametasona, se evaluó la capacidad de estos tratamientos de inducir apoptosis en presencia de diferentes inhibidores de caspasas. Para ello, incubamos las células durante 60 minutos con los inhibidores de caspasas: Z-VAD-FMK (inhibidor global de caspasas), Z-IETD-FMK (inhibidor caspasa 8) y Z-LEHD-FMK (inhibidor caspasa 9) y después añadimos los fármacos Lenalidomida y Pomalidomida y Dexametasona a la dosis y tiempos indicados, como se muestra en la

figura 40. Tanto la inhibición global de caspasas como la inhibición de caspasa 8, inhiben parcialmente el efecto proapoptótico de Lenalidomida y Pomalidomida, indicando, de forma coherente con lo observado en los WB, que el procesamiento deriva fundamentalmente de la vía extrínseca de la apoptosis a través de caspasa 8. En el caso de la Dexametasona en monoterapia la apoptosis se reduce con el inhibidor global de caspasas y con el inhibidor de caspasa 9, lo que nos muestra, igual que ocurría en el WB, que la acción de Dexametasona es mediada preferentemente por caspasa 9. En las combinaciones de IMIDs con Dexametasona la apoptosis se inhibe con el inhibidor global de caspasas, y en menor medida con los inhibidores de caspasa 8 y 9, siendo mayor el efecto del inhibidor de caspasa 8. Estos resultados demuestran que la apoptosis mediada por esta combinación es el resultado del sinergismo sobre la vía extrínseca (caspasa 8) e intrínseca (caspasa 9), y apoyan la utilización conjunta de los IMIDs con Dexametasona.

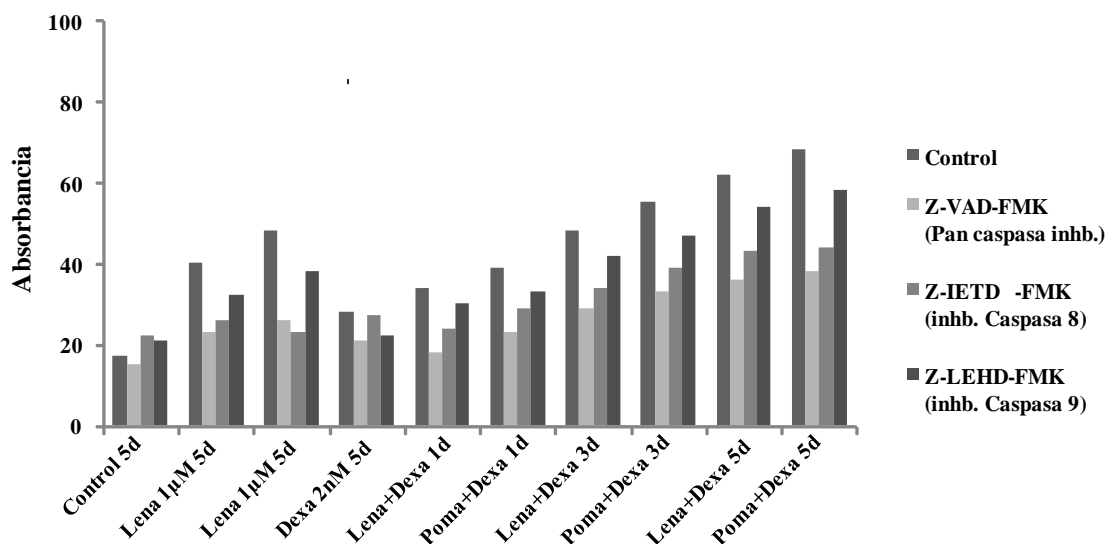


Figura 40. Actividad pro-apoptótica de ambos IMIDs con Dexametasona en presencia de inhibidores de diferentes caspasas.

Uno de los mecanismos implicados en la vía intrínseca de la apoptosis, es la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), y la subsiguiente liberación de proteínas pro-apoptóticas, por lo que también se analizó el efecto de estas combinaciones sobre esta característica. A pesar de que los IMIDs a 1 μM de forma individual produjeron solo una leve pérdida de $\Delta\Psi_m$, y que la Dexametasona a la dosis empleada de 2 nM y 5 días no indujo ninguna variación, la combinación de ambos fármacos produjo una clara potenciación del efecto, como se observa en la figura 41. El procesamiento de la Caspasa 9 y la pérdida de $\Delta\Psi_m$, indican que la vía intrínseca mitocondrial es una de las dianas de IMIDs con Dexametasona.

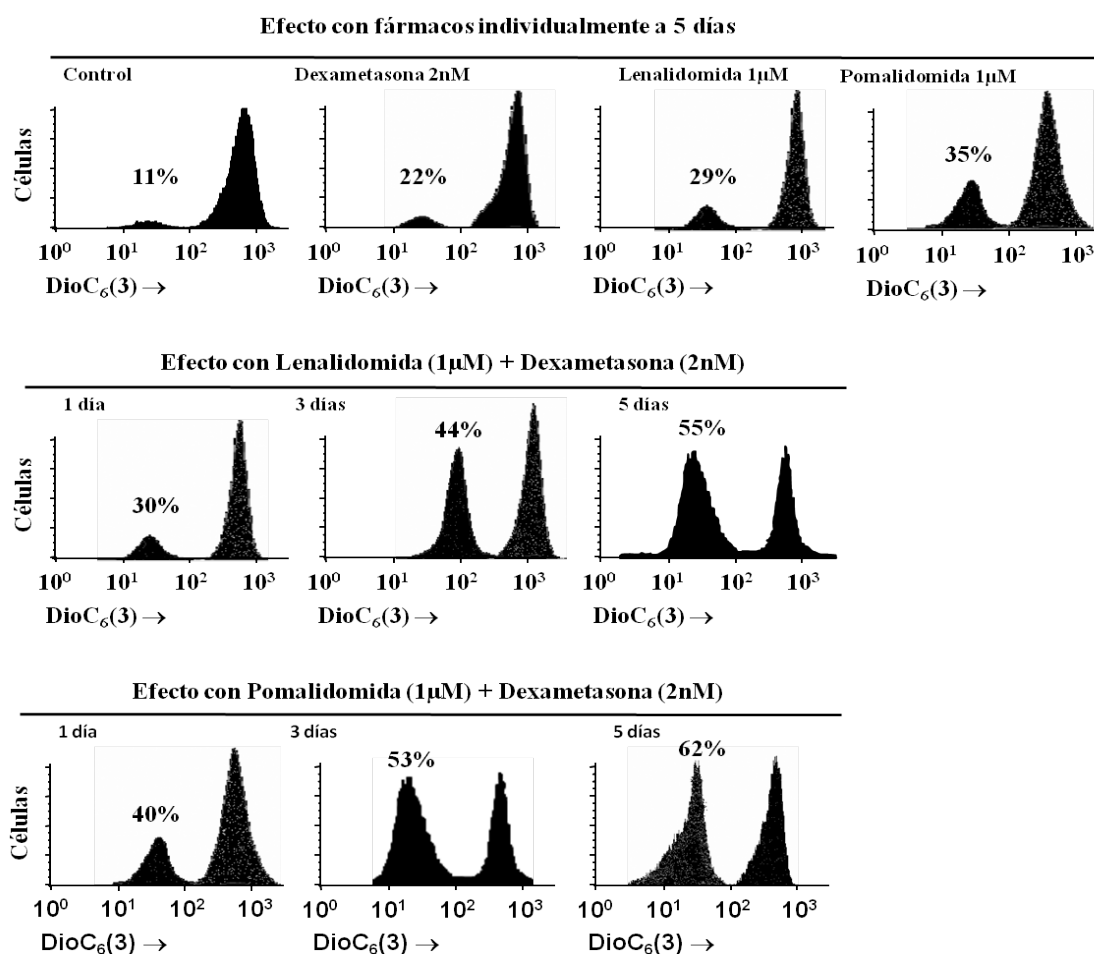


Figura 41. Efecto de ambos IMIDs con Dexametasona a diferentes tiempos en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

1.5.2. Análisis del efecto sobre el ciclo celular

Para estudiar el efecto de Lenalidomida y Pomalidomida sobre el ciclo celular tratamos la línea celular MM1S con ambos fármacos a dosis 1 μ M durante 5 días. Para el estudio de las combinaciones, empleamos Lenalidomida o Pomalidomida a 1 μ M junto a Dexametasona a 2 nM, a diferentes tiempos: 1, 3 y 5 días.

El tratamiento con Lenalidomida y Pomalidomida en monoterapia, indujo un aumento progresivo de la fase G_0/G_1 , y de forma paralela un aumento del pico apoptótico sub- G_0 . También se produjo de forma simultánea, un descenso progresivo de la fase S de síntesis junto con una disminución de la fase G_2/M respecto a las células control sin fármaco (Figura 42).

En las combinaciones de IMiDs con Dexametasona observamos un aumento progresivo de la fase G_0/G_1 , más acentuado que en monoterapia, y una disminución de las fases S y G_2/M a lo largo de los días de tratamiento (Figura 42).

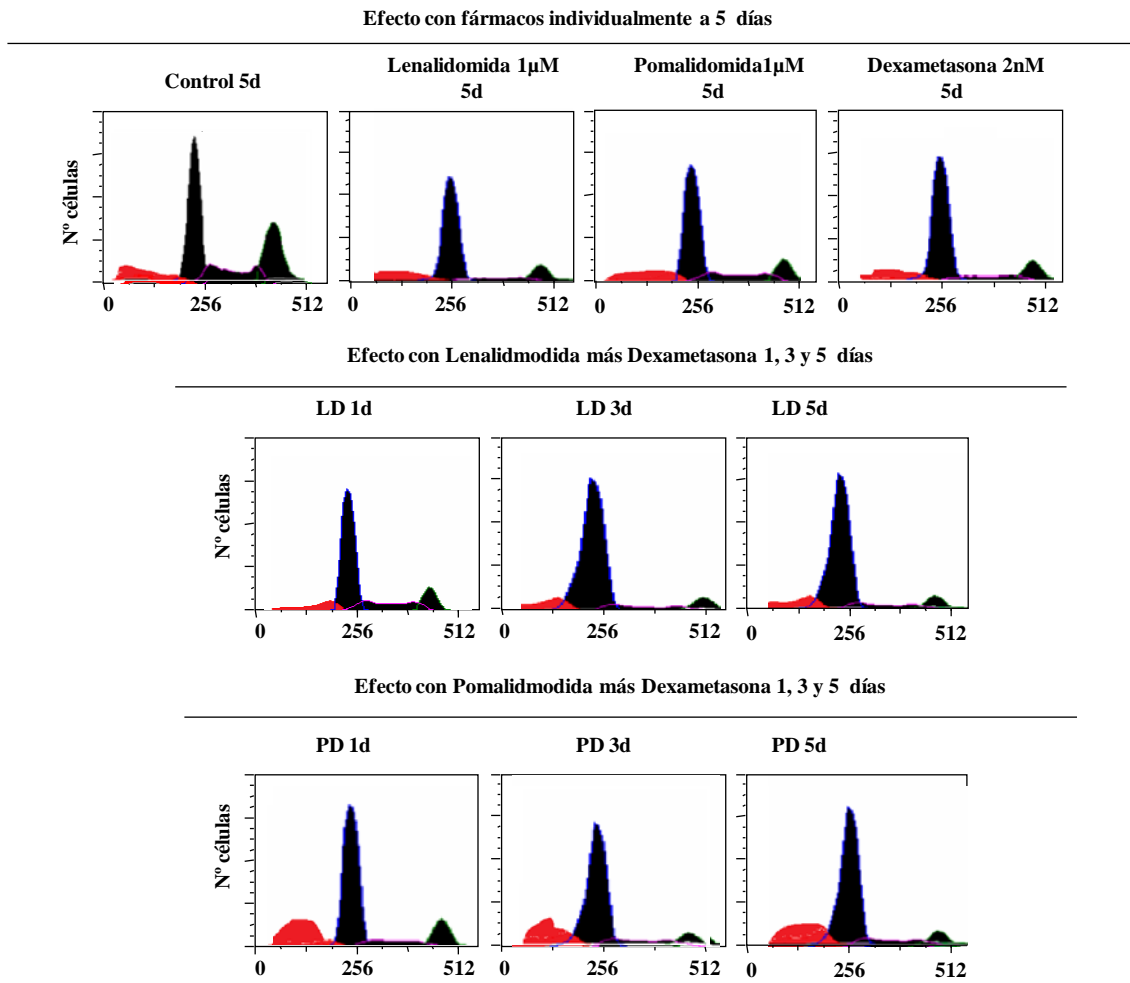


Figura 42. Efecto de ambos IMIDs con Dexametasona sobre el ciclo celular de MM1S.

Tabla 8. Efecto de ambos IMIDs con Dexametasona sobre el ciclo celular de MM1S.

Tiempo (días)		Control	Lena 1 μ M 5d	Poma 1 μ M 5d	Dexa 2nM 5d
G ₀ /G ₁		42.4	55.8	58.6	51.9
S		21.4	14.5	12.1	17.8
G ₂ /M		27.5	20.8	18.3	23.6
Sub-G0		7.91	8.9	10.9	6.56

Tiempo (días)	LD 1d	LD 3d	LD 5d	Tiempo (días)	PD 1d	PD 3d	PD 5d
G ₀ /G ₁	48.1	60.1	62.5	G ₀ /G ₁	51.7	64.31	67.47
S	21.2	8.6	8.5	S	16.2	9.2	8.15
G ₂ /M	22.4	16.6	10.3	G ₂ /M	23.8	15.9	10.1
Sub-G0	9.4	14.6	16.4	Sub-G0	7.65	10.5	14.3

Se analizaron algunas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular tras los tratamientos y, como se muestra en la figura 43, se observó un aumento progresivo de P21 y P53, siendo una vez más este efecto mucho más evidente con las combinaciones que con los fármacos individuales¹⁵⁴. También se observó un aumento de p16 respecto el control, pero sin diferencia entre fármacos individuales y combinaciones (Figura 43).

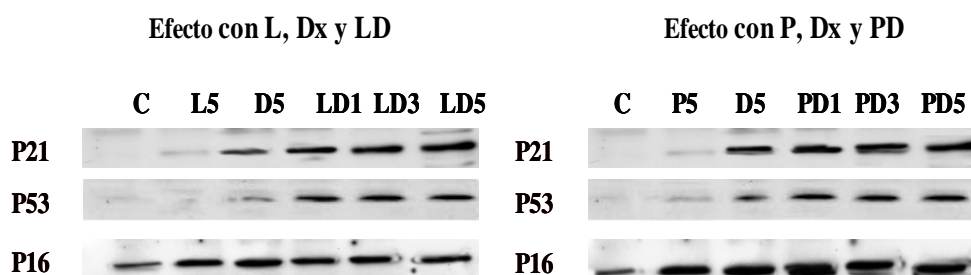


Figura 43. Análisis de proteínas implicadas en el ciclo celular mediante WB.

1.6. Estudio del Perfil de Expresión Génica

Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción de los IMiDs usados como agentes únicos o en combinación con Dexametasona, realizamos estudios de expresión génica para conocer las alteraciones inducidas por dichos fármacos a diferentes tiempos.

Un primer estudio se realizó sobre células MM1S tras 24 horas de tratamiento con Lenalidomida 1 μ M, Pomalidomida 100 nM, Dexametasona 100 nM, y las combinaciones de Lenalidomida más Dexametasona y Pomalidomida más Dexametasona; El porcentaje de apoptosis en los fármacos individuales fue del 5, 7 y 10 % para Lenalidomida, Pomalidomida y Dexametasona respectivamente. El porcentaje de apoptosis para las combinaciones fue de un 12 % para Lenalidomida más Dexametasona y de un 14 % para Pomalidomida más Dexametasona.

Utilizando un “fold change” ≥ 2 , Lenalidomida produjo una desregulación de únicamente 10 genes, de los cuales 7 estaban sobreexpresados y 3 infraexpresados; Pomalidomida desreguló 19 genes (11 aparecieron sobreexpresados y 8 infraexpresados); mientras que el tratamiento con Dexametasona desreguló 13 genes (10 sobreexpresados y 3 infraexpresados). La combinación de Lenalidomida más Dexametasona indujo la desregulación de 149 genes (102 sobreexpresados y 47 infraexpresados); mientras que la combinación de Pomalidomida más Dexametasona desreguló 95 genes (76 sobreexpresados y 19 infraexpresados).

1.6.1. Comparación de los genes desregulados por Lenalidomida y Pomalidomida

Al contrastar los genes desregulados por Lenalidomida con los genes desregulados con Pomalidomida, a tiempos cortos, lo primero que se observa es que Pomalidomida desregula casi el doble de genes que Lenalidomida, de los cuales sólo 4 genes eran comunes, mientras que 6 genes estaban desregulados exclusivamente por Lenalidomida y 15 exclusivos de Pomalidomida (Figura 44).

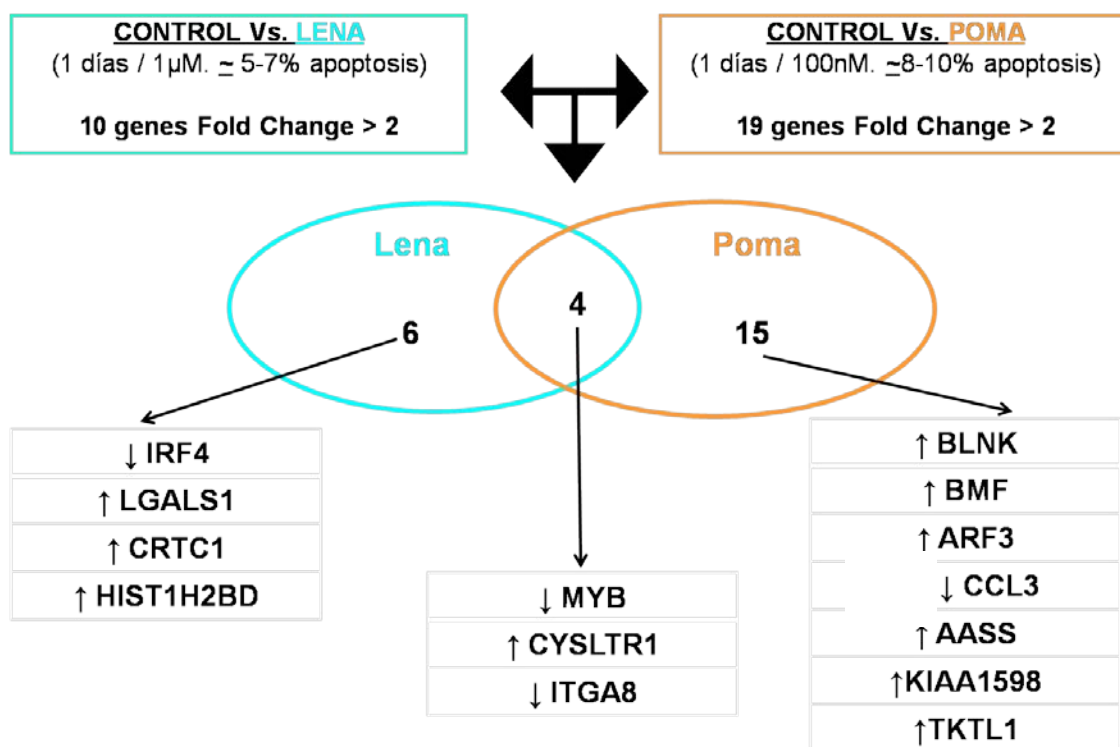


Figura 44. Representación esquemática de los genes desregulados por el tratamiento de IMiDs en monoterapia a tiempos cortos.

Entre los genes comunmente desregulados destaca MYB (Oncogen Mieloblastosis) que se encuentra infraexpresado con ambos fármacos con un F.C. de -2,03. Este gen es regulador de la trascrición con un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación de las células progenitores hematopoyéticas y su

tumorigénesis. IRF-4 (Factor regulador de Interferon 4) (F.C. de -2,02) se infraexpresa bajo tratamiento con Lenalidomida y está implicado en funciones biológicas importantes en el MM además de ser una nueva diana terapéutica en MM, mientras que LGALS-1 (F.C. 2,43), que tiene un efecto negativo sobre la proliferación, se encuentra sobreexpresado; por último dos genes implicados en apoptosis como BMF (F.C. 2,17) y BLNK (B-cell linker) (F.C. 2,22), se sobreexpresaban con Pomalidomida (Figura 44).

En un segundo paso se repitió el análisis genómico tras 5 días de incubación con Lenalidomida y Pomalidomida a la misma dosis. El objetivo de este experimento era estudiar los cambios tardíos inducidos por estos fármacos. El porcentaje de apoptosis fue del 20-25% para ambos fármacos.

Lenalidomida 1 μ M tras 5 días de tratamiento desregula 39 genes mientras que Pomalidomida 100 nM tras 5 días de tratamiento desregula 359 genes. Esto significa que Pomalidomida, a tiempos más tardíos, desregula casi 10 veces más genes que Lenalidomida. Al comparar los genes desregulados por ambos tratamientos, como muestra los diagramas de Venn de la figura 45, hay 8 exclusivos de Lenalidomida, 328 de Pomalidomida y 31 genes comunes para ambos tratamientos.

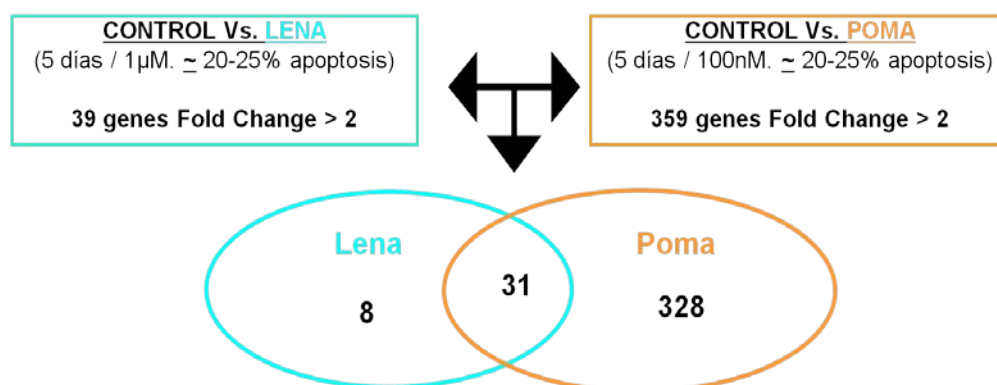


Figura 45. Representación esquemática de los genes desregulados por en tratamiento de IMIDS en monoterapia a tiempos tardíos.

Por tanto, Pomalidomida es capaz de desregular casi todos los genes modificados por Lenalidomida y además de otros 300 genes adicionales.

En relación a los 31 genes alterados en común por ambos IMIDs a 5 días. Destaca, de forma interesante, MYB (Oncogen Mieloblastosis) (F.C. -3,86) y que ya se encontró desregulado en el experimento realizado tras 1 día de tratamiento.

De los 8 genes desregulados exclusivamente con Lenalidomida, no existe ningún gen reseñable de importancia en MM y respecto a los 328 genes desregulados por Pomalidomida, encontramos varios genes de con funciones moleculares y celulares importantes para el MM, que se resumen en tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de los genes desregulados por Pomalidomida a 5 días de tratamiento

FUNCIONES MOLECULARES	GENES DESREGULADOS EXCLUSIVAMENTE POR POMALIDOMIDA (N=328)
Muerte celular y apoptosis	↑ <i>CASP5</i> ↓ <i>RAD51</i> ↓ <i>RRM2</i>
Ciclo celular	↓ <i>AURAK A</i> ↓ <i>AURAK B</i> ↓ <i>CDC 25</i> ↓ <i>CDC45</i> ↓ <i>CDCA2</i> ↓ <i>CCNF</i> ↓ <i>CCNE1</i> ↓ <i>CCNB1</i> ↓ <i>CHEK2</i>
Vías Señalización	↓ <i>ETS1</i> ↓ <i>ICMA2</i> ↑ <i>RASAI</i>
Resistencia	↑ <i>DKK1</i> ↑ <i>DDX58</i> ↑ <i>NOTCH2</i> ↑ <i>ABCA5</i> ↑ <i>ABCD2</i>

Por último y para establecer un estudio comparativo entre los genes desregulados en monoterapia a 1 día y 5 días de tratamiento encontramos únicamente 9 genes comunes a ambos tiempos, 3 desregulados por Lenalidomida y 6 por Pomalidomida. El único gen con función relevante en la patogenia del Mieloma que además es alterado comúnmente por ambos tratamientos y a los dos tiempos es MYB (Oncogen Mieloblastosis) cuya infraexpresión es mayor en los tratamientos de 5 días.

1.6.2. Efecto de la Dexametasona en la expresión génica y su aportación a la combinación con IMiDs

Los cambios a nivel genómico inducidos por Dexametasona en células mielomatosas han sido previamente estudiados por Chauhan et al y Grennstein et al ^{119, 155}, por ello nuestro interés se centró en saber qué aporta la Dexametasona cuando se combina con IMiDs.

Como agente único a 100 nM y 24h sobre MM1S, Dexametasona indujo la desregulación de 13 genes: 10 sobreexpresados y 3 infraexpresados. De estos 13 genes destacan, CXCR4 (Receptor de citocina 4) (F.C. 2,20) implicado en MM al participar en la adhesión de células hematopoyéticas al micromedioambiente; así como FKBP5 (FK506 proteína de unión) (F.C. 4,38) que tiene un papel importante en inmunoregulación. Todos los genes desregulados por Dexametasona como agente único se encuentran en las combinaciones de IMiDs más Dexametasona.

La modificación de 149 genes en la combinación Lenalidomida más Dexametasona (102 sobreexpresados y 47 infraexpresados), revela el elevado sinergismo de esta combinación, ya que por separado estos agentes farmacológicos sólo desregulaban 23 genes. De los 131 genes exclusivos de la combinación, que son los que reflejarían el sinergismo de la misma, 112 están mapeados, es decir, se conoce la función (Figura 45).

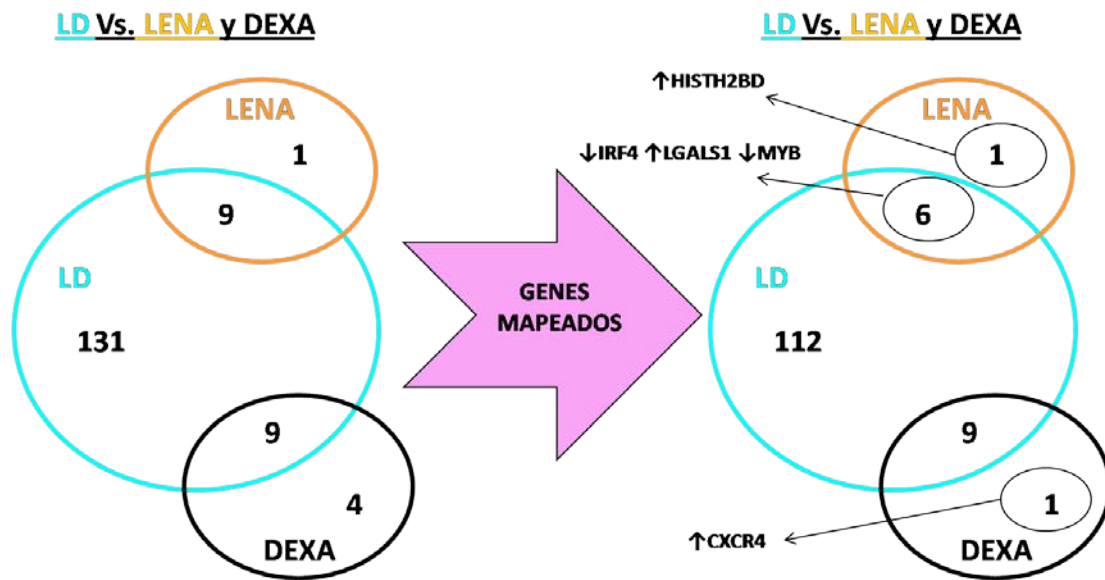


Figura 45. Representación esquemática de los genes desregulados por Lenalidomida más Dexametasona en comparación con Lenalidomida y Dexametasona por separado.

De igual forma con la combinación de Pomalidomida más Dexametasona, se desregulan 95 genes (76 sobreexpresados y 19 infraexpresados). Estos genes indican, nuevamente, un elevado sinergismo, ya que como agentes únicos Pomalidomida y Dexametasona desregulan solo 19 y 13 genes respectivamente.. De los 72 genes exclusivos de la combinación de Pomalidomida con Dexametasona, 70 están mapeados (Figura 46).

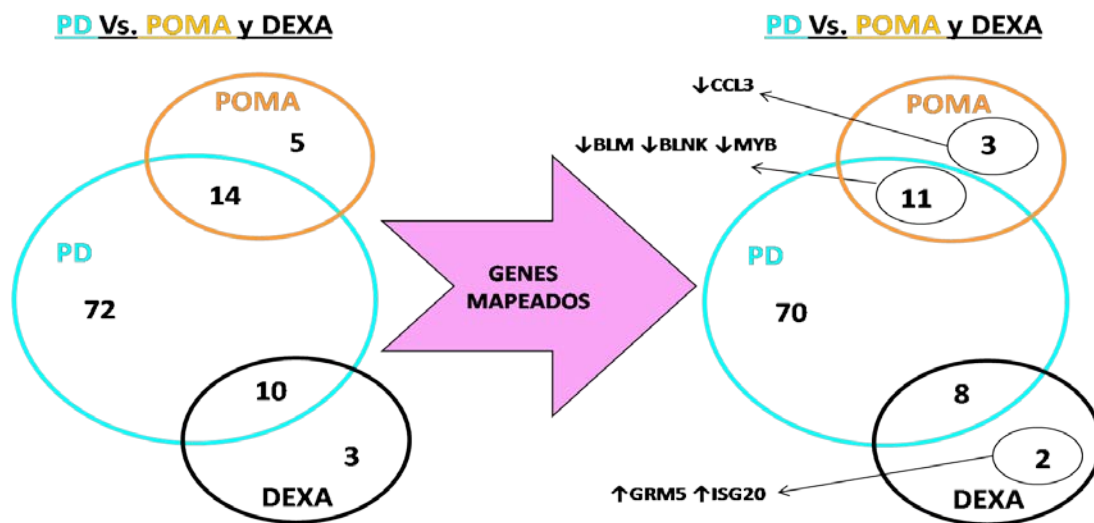


Figura 46. Representación esquemática de los genes desregulados por Pomalidomida más Dexametasona en comparación con Pomalidomida y Dexametasona por separado.

1.6.1.1. Comparación entre los genes desregulados por Lenalidomida más Dexametasona y Pomalidomida más Dexametasona

A pesar de que en nuestro estudio, Pomalidomida desregula casi el doble de genes que Lenalidomida, cuando estos fármacos se combinan con Dexametasona, el número de genes de la combinación con Lenalidomida es más elevado, lo que significa que Lenalidomida es más dependiente de Dexametasona para realizar su acción, resultado que corrobora lo anteriormente descrito en los estudios “*in vivo*”.

Comparando los 112 genes mapeados desregulados por Lenalidomida con Dexametasona frente a los 70 de Pomalidomida con Dexametasona, como se observa en la figura 47, hay 78 genes exclusivos de Lenalidomida más Dexametasona, 45 comunes a ambas combinaciones y 43 exclusivos de Pomalidomida más Dexametasona.

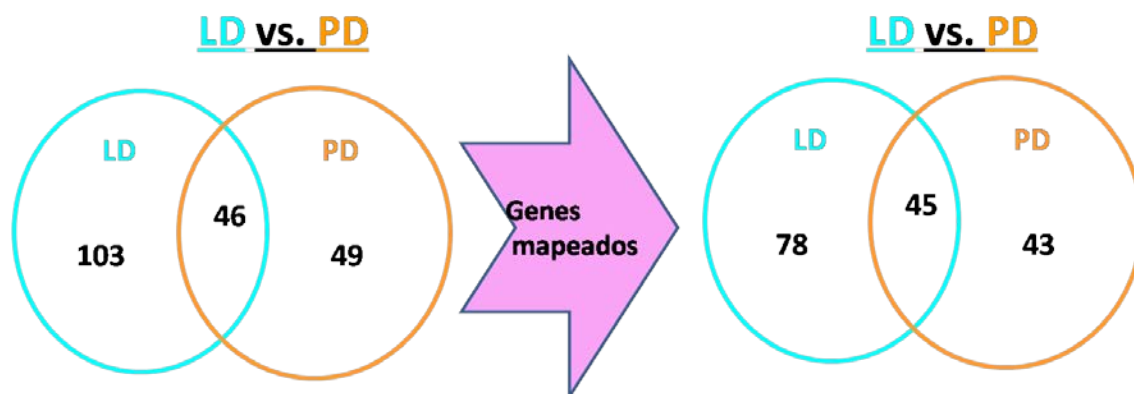


Figura 47. Representación esquemática de la comparación de los genes desregulados por Lenalidomida más Dexametasona vs Pomalidomida más Dexametasona.

Como ya se señaló previamente todos los genes desregulados por Dexametasona como agente único están incluidos en las combinaciones y por parte de los IMIDs todos los genes, excepto HITH2BD, desregulado en exclusiva por Lenalidomida y CCL3 sólo por Pomalidomida, se encuentran en las combinaciones. El resto de los genes podemos clasificarlos por las diferentes funciones relevantes en la patología del MM, como se observan en tabla 10.

Tabla 10. Clasificación de los genes más representativos desregulados en la comparación LD y PD.

Funciones moleculares	Exclusivos LD 78 genes	Exclusivos PD 43 genes	Comunes LD Y PD 45 genes
Biología MM	↓ <i>IRF4</i> ↑ <i>SELPLG</i>		↓ <i>MYB</i>
Muerte celular y apoptosis	↓ <i>BLM</i> ↓ <i>PBK</i> ↑ <i>CAPN2</i> ↓ <i>XRCC2</i>	↑ <i>ANXA4</i> ↑ <i>BNIP3L</i> ↑ <i>SMAD1</i>	↑ <i>BMF</i> ↑ <i>CASP4</i> ↑ <i>CLARF</i> ↑ <i>PARP8</i> ↑ <i>TXNIP</i>
Ciclo celular	↓ <i>BLM</i> ↑ <i>CDC2</i> ↓ <i>CDK1</i> ↓ <i>KIF20B</i> ↓ <i>TIPIN</i> ↓ <i>SMC2</i> ↓ <i>MPHOSPH6</i> ↓ <i>HSPA4L</i>	↑ <i>BTG1</i> ↓ <i>CABLE1</i>	
Vías Señalización	↓ <i>TIPIN</i> ↓ <i>MAPK6</i>		↑ <i>LGALS1</i>
Resistencia	↑ <i>ABCB9</i> ↑ <i>GSTM2</i> ↑ <i>STAT2</i>	↑ <i>IGF-1</i> ↑ <i>STAT3</i>	↑ <i>GRN</i> ↑ <i>MAP3K5</i> ↑ <i>PTK2B</i>

En este apartado remarcaremos los 45 genes que son alterados de forma común por las combinaciones de IMIDs con Dexametasona y que indicarían genes específicos de la combinación de ambos grupos farmacológicos. Destacan en este grupo el oncogen MYB que ya se ha descrito previamente, varios genes implicados en muerte celular que se encuentran todos ellos sobreexpresados (BMF, CASP4, CLARF, PARP8, TXNIP) o genes que inhiben la proliferación, como LGALS1, que está sobre expresado. Por último merece la pena destacar la sobreexpresión de una serie de genes que generan resistencia a drogas, como GRN (granulin) (F.C. 2,63) asociado a quimioresistencia, y MAP3K5 (Mitogen activated protein kinase 5) (F.C. 3,76) implicado en la vía de ERK1/2, vía de proliferación asociada a MM, o PTK2B (protein tyrosine kinase 2 β) (F.C. 2,71).

2. Capítulo II. Combinaciones de IMiDs con otros fármacos utilizados en el tratamiento del Mieloma Múltiple

Para llevar a cabo este estudio, se trató la línea celular MM1S con los IMiDs en estudio y con otros fármacos antimieloma, tanto aprobados y usados habitualmente (Melfalán, Mafosfamida (metabolito activo de la Ciclofosfamida), Doxorrubicina y Bortezomib) como en periodo de investigación (Bendamustina, Carfilzomib y Panobinostat) durante 5 días de tratamiento.

2.1. Combinaciones con fármacos convencionales

Lenalidomida potenció la acción anti-mieloma de Doxorrubicina, Melfalan, Mafosfamida y Bortezomib. Los valores de índice de combinación (CI) constatados mediante el programa Calcsyn fueron de 0,42, 0,33, 0,95 y 0,49 respectivamente (Figura 48).

Pomalidomida también potenció la acción anti-mieloma de Doxorrubicina, Melfalan, Mafosfamida y con Bortezomib con un CI de 0,20, 0,30, 0,75 y 0,45 respectivamente (Figura 48).

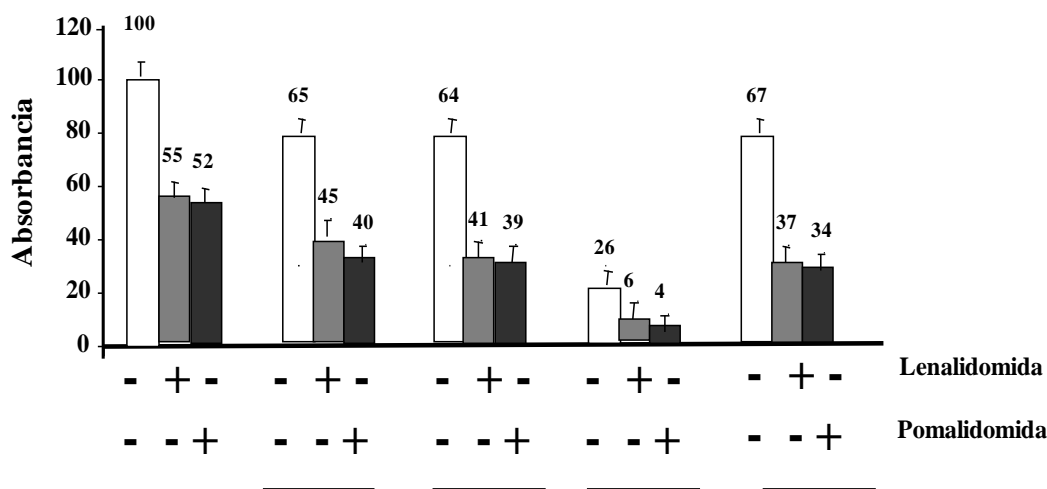


Figura 48. Combinaciones dobles de Lenalidomida y Pomalidomida con fármacos convencionales.

Posteritamente se analizó el efecto de asociar Dexametasona a las combinaciones anteriores. En las combinaciones triples, Lenalidomida potenció la acción de Dexametasona con Doxorrubicina, Melfalan, Mafosfamida o con Bortezomib (Figura 49). Destacando la potenciación de la combinación triple Lenalidomida, Dexametasona y Bortezomib.

Al igual que con Lenalidomida, en las combinaciones triples de Pomalidomida se potenciaba la actividad, de todos los fármacos convencionales (Figura 49), especialmente para la triple combinación de Pomalidomida, Dexametasona y Bortezomib.

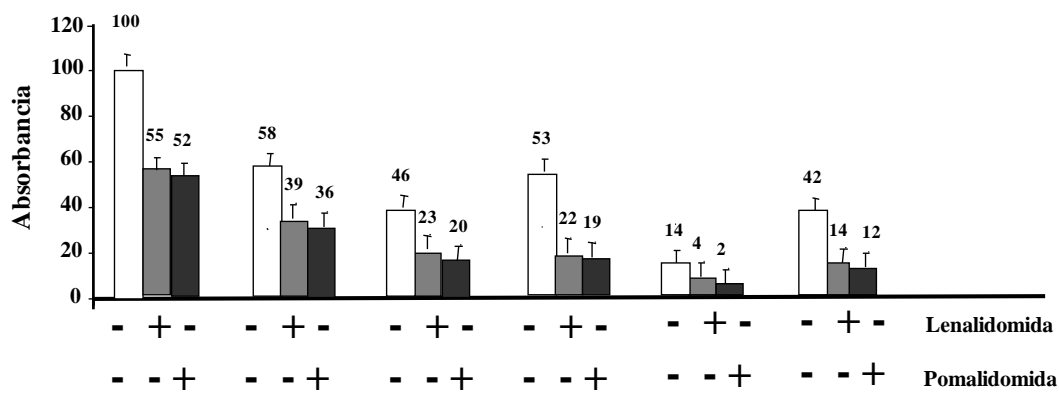


Figura 49. Combinaciones triples de Lenalidomida y Pomalidomida con fármacos convencionales.

2.2. Combinaciones con fármacos e investigación

Se realizaron también combinaciones con otros fármacos como Bendamustina (Clorhidrato de Bendamustina que es un fármaco químicamente relacionado con los agentes alquilantes, pero que incorpora un anillo benzimidazólico que otorga a la molécula propiedades como análogo de las purinas y presenta una actividad bifuncional), Panobinostat (LBH589, inhibidor de Histona Deacetilasa) y Carfilzomib (nuevo inhibidor de proteasoma).

Lenalidomida (100 nM) aumentó la acción anti-mieloma de Bendamustina (5 mg/ml) y de Carfilzomib (0,5 nM) de forma sinérgica, con índices de combinación (CI) de 0,68 y 0,27 respectivamente. La combinación con Panobinostat (2 nM) produjo una escasa potenciación siendo el efecto aditivo, con unos valores de índice de combinación (CI) de 0,95 (Figura 50).

Pomalidomida (100 nM) también aumentó la acción anti-mieloma de Bendamustina (5 mg/ml), Carfilzomib (0,5 nM) y Panobinostat (2 nM) de forma sinérgica, con unos valores del índice de combinación (CI) de 0,61, 0,13, 0,75 respectivamente, reproduciéndose el mismo efecto de potenciación, ya referido para Lenalidomida, en las combinaciones triples (Figura 50).

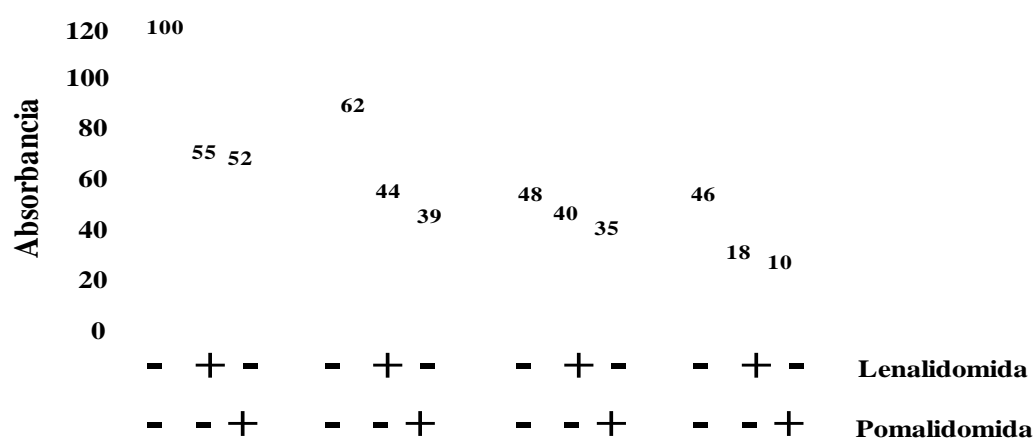


Figura 50. Combinaciones dobles de Lenalidomida y Pomalidomida con fármacos en investigación.

En todas las combinaciones triples de Lenalidomida y Pomalidomida más Dexametasona con estos nuevos fármacos en investigación se observa una potenciación del efecto respecto a las dobles (Figura 51). Sin embargo, destacó por su elevado efecto la combinación triple de IMiDs y Dexametasona más Carfilzomib.

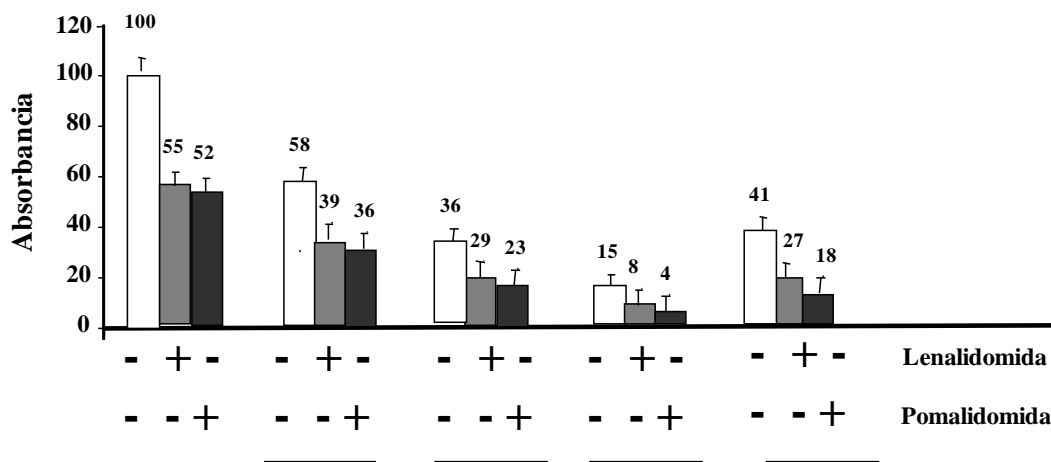


Figura 51. Combinaciones triples de Lenalidomida y Pomalidomida con fármacos en investigación.

Como se puede observar, los índices de combinación, de las combinaciones farmacológicas dobles son menores cuando empleamos Pomalidomida que Lenalidomida, es decir, el sinergismo es mayor con el primer fármaco, y lo mismo se observó en las combinaciones triples.

2.3. Combinaciones de ambos IMiDs más Dexametasona más Bortezomib en células procedente de pacientes

Por último testamos las combinación triple IMiDs, con Dexametasona y Bortezomib, de especial interés por ser una combinación muy empleada actualmente en la clínica y de elevada potencia en los estudios “*in vitro*” anteriormente expuestos, en

células procedentes de siete pacientes con MM. El estudio se realizó con la técnica de Anexina-V.

La combinación doble de Lenalidomida más Dexametasona y Lenalidomida más Bortezomib aumentó la acción anti-mieloma respecto a los agentes individuales. Sin embargo, la triple combinación de Lenalidomida, Dexametasona y Bortezomib tenía mayor efecto que las combinaciones dobles, siendo especialmente relevante en los pacientes 1, 5 y 7 (Figura 52).

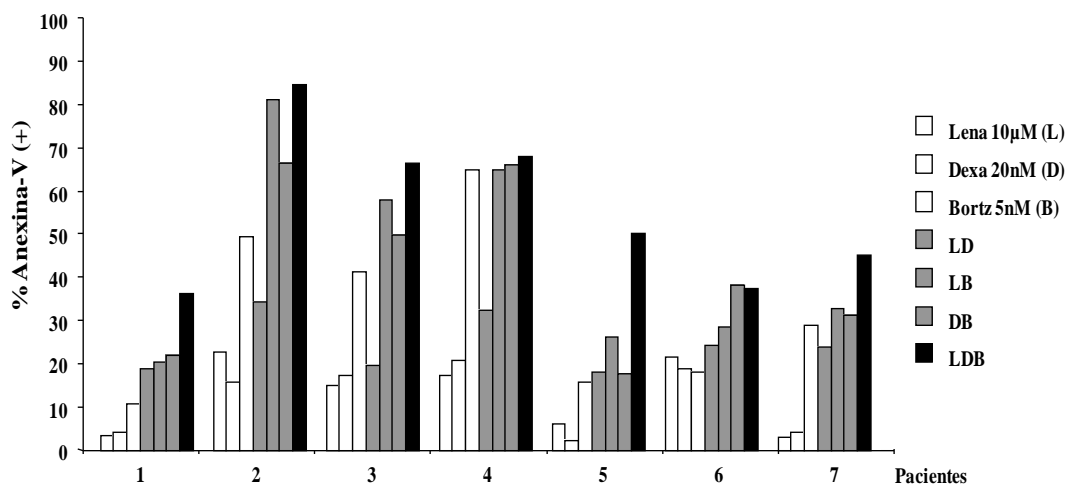


Figura 52. Combinación triple de Lenalidomida, Dexametasona y Bortezomib en células de pacientes.

El mismo patrón pero con mayor evidencia se objetivó con Pomalidomida (Figura 53).

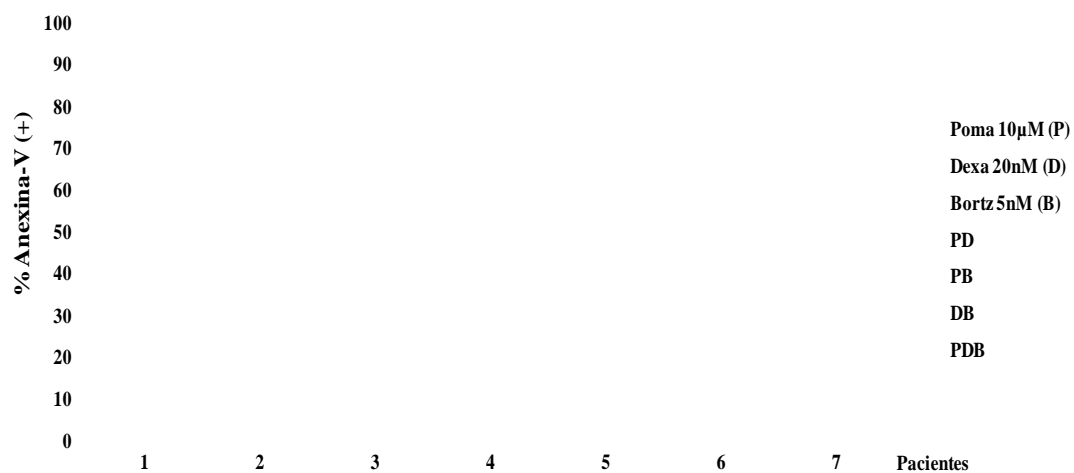


Figura 53. Combinación triple de Pomalidomida, Dexametasona y Bortezomib en células de pacientes.

De nuevo, todas las combinaciones con Pomalidomida tienen un mayor efecto sobre la célula de pacientes, incluidos la potencia individual y la capacidad de potenciación “*in vitro*” de este fármaco.

3. Capítulo III: Análisis “*in vivo*” de las características de la resistencia adquirida a las combinaciones de IMiDs + Dexametasona

3.1. Generación de un modelo “*in vivo*” de resistencia adquirida a fármacos anti-mieloma

Con el fin de dar respuesta a este objetivo del presente trabajo, desarrollamos un modelo “*in vivo*” de resistencia adquirida a fármacos antitumorales en nuestro modelo de plasmocitoma subcutáneo humano en ratones inmunocomprometidos. Para ello, como se ha descrito en detalle en el apartado de material y métodos, inyectamos de forma subcutánea en el flanco de ratones CB17-SCID, 3×10^6 células MM1S en Matrigel®. Una vez que el tumor se hizo palpable los ratones fueron randomizados a recibir las diferentes combinaciones de fármacos. En concreto los grupos de tratamiento fueron:

- Control (tratados con vehículo). n=5
- LD: Lenalidomida (25 mg/Kg L-V) + Dexametasona (1 mg/Kg L-M). n=15
- PD: Pomalidomida (5 mg/Kg L-V) + Dexametasona (1 mg/Kg L-M). n=15
- Tratamiento alternante con LD-PD (cambio semanal): n=10 (cinco empezando con LD y 5 empezando con PD)

Los fármacos fueron administrados de forma intraperitoneal y de forma continua según el esquema de tratamiento mencionado, hasta que el ratón tuvo que ser sacrificado por el elevado volumen tumoral o por los efectos tóxicos del tratamiento. Con el fin de evaluar el tiempo hasta la progresión (TTP) o para definir el momento de

cambio de tratamiento en los tumores resistentes, se consideró de forma arbitraria progresión de la enfermedad cuando el volumen tumoral sobrepasó los 1.700 mm³.

3.1.1 Demostración de la Resistencia “*in vivo*” a las combinaciones de IMiDs más Dexametasona

De forma similar a lo referido en la parte de la actividad “*in vivo*” de las combinaciones LD y PD, dichos tratamientos consiguieron controlar el crecimiento tumoral durante aproximadamente 30 días, sin embargo a partir de este momento, y a pesar de continuar el tratamiento con dichas combinaciones, los tumores comenzaron a crecer, lo que indica la aparición de resistencias adquiridas a esos tratamientos (Figura 33).

Con el fin de demostrar que estos tumores habían desarrollado esta resistencia se realizó un análisis del patrón de crecimiento tumoral en los ratones control y los tratados con LD y PD a partir de que el tumor alcanzó los 500 mm³. Como se observa en la figura 54, los tumores tratados tardaron significativamente más en llegar a un volumen de 500 mm³ (TT500 de 8 vs 42 vs 53 para los ratones control vs LD vs PD, con $p=0.01$ para LD y $p=0.001$ para PD en comparación con el control).

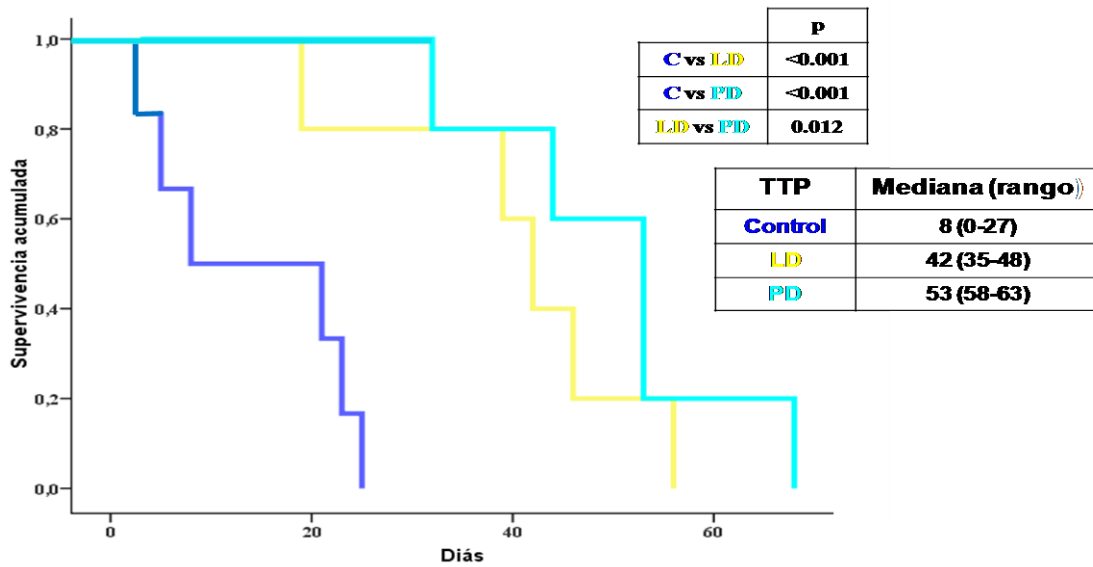


Figura 54. Tiempo hasta llegar a un volumen tumoral de 500 mm³ (TT500) en los diferentes grupos de tratamiento.

Sin embargo, una vez que llegaron a ese volumen, la velocidad de crecimiento tumoral en comparación con los controles fue similar o incluso superior para los tratados, a pesar de seguir bajo tratamiento, lo que indica la aparición de una resistencia completa a los tratamientos administrados (Figura 55).

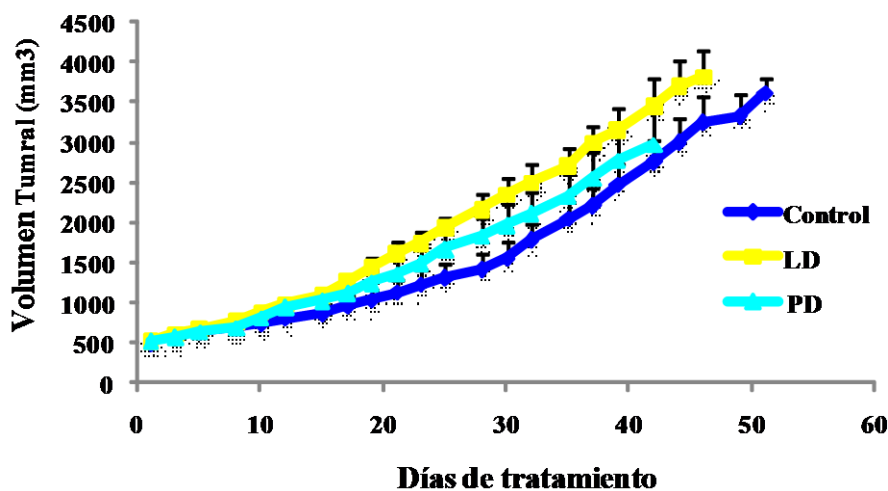


Figura 55. Cinética de crecimiento tumoral de los diferentes grupos de tratamiento una vez que los tumores llegan a 500 mm³

3.1.2 Demostración “*ex vivo*” de la resistencia generada en el modelo “*in vivo*”

Para confirmar la resistencia observada “*in vivo*”, algunos ratones fueron sacrificados una vez que el tumor fue completamente resistente y las células extraídas de dichos tumores fueron puestas en cultivo y tratadas “*ex vivo*” con Lenalidomida (10 μ M) + Dexametasona (10 nM) o con Pomalidomida (10 μ M) + Dexametasona (10 nM) durante 5 días, y la apoptosis celular fue analizada por citometría de flujo tras marcaje con Anexina V. Además, como controles, también se cultivaron y trataron de la misma manera, células procedentes de tumores no tratados (control) y células de tumores que estaban siendo sensibles al tratamiento. Para conseguir estos últimos, tumores grandes que habían crecido sin tratamiento, cuando alcanzaron un determinado volumen (1.700 mm³), empezaron a ser tratados con ambas combinaciones. Tras 5-10 días de tratamiento se observó una respuesta del tumor, y, en este momento, fueron extraídos como células bajo tratamiento y sensibles al mismo (sensibles).

Este experimento “*ex vivo*” confirmó el desarrollo de una resistencia, al menos parcial, de estos tumores a los tratamientos administrados ya que mientras el tratamiento “*ex vivo*” indujo una apoptosis en células controles y sensibles de en torno a un 70% en el caso de LD y de un 80-90% en el caso de PD, en las células de tumores considerados resistentes a cada uno de ellos, ambos tratamientos únicamente indujeron un 40% de muerte celular (Figura 56).

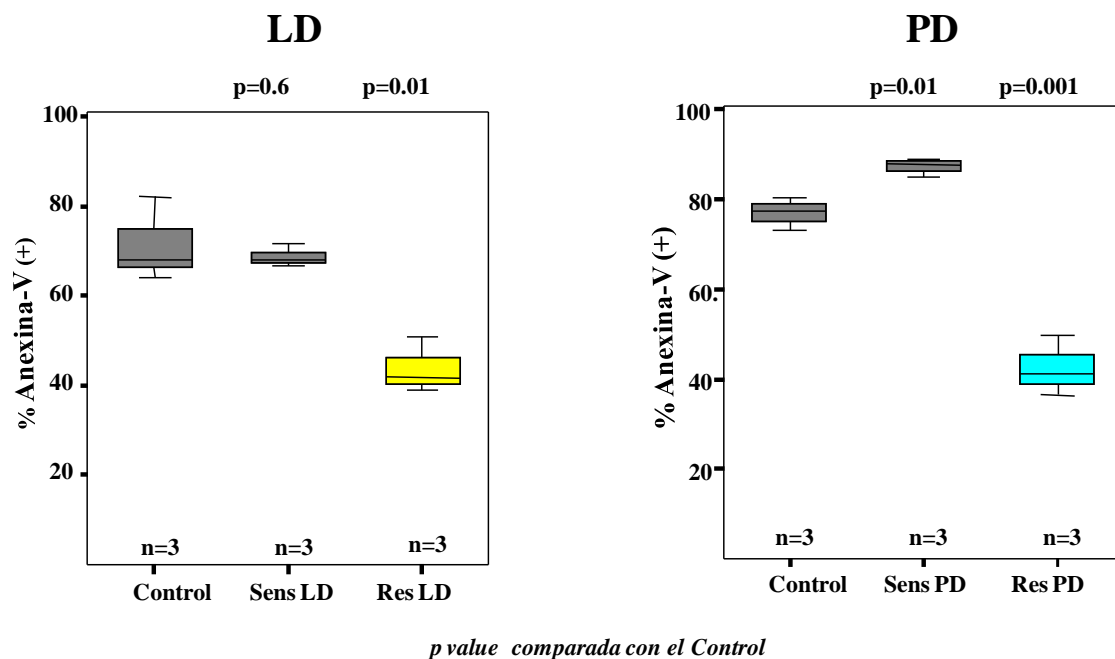


Figura 56. Análisis de la sensibilidad/resistencia “*ex vivo*” a LD y PD en células extraídas de tumores resistentes “*in vivo*” a LD y PD respectivamente.

3.2. Ausencia de resistencias cruzadas entre Lenalidomida + Dexametasona y Pomalidomida + Dexametasona

Otro de los experimentos planteados era confirmar si existía resistencia cruzada entre LD y PD, o dicho de otra forma, si el tratamiento con PD es capaz de rescatar la resistencia adquirida a LD y viceversa.

Para tratar de resolver esta cuestión, a algunos tumores ($n=10$ para cada uno de los tratamientos) que estaban siendo tratados con cada una de las combinaciones, una vez que desarrollaron resistencia al tratamiento administrado y llegaron a un volumen de 1.700 mm^3 , se les cambió el tratamiento a la combinación alternativa a la que estaban recibiendo, es decir, aquellos que ratones con tumores resistentes a LD fueron tratados con PD y viceversa. Las figuras 57 y 58 representan de forma general la evolución de algunos tumores representativos de la evolución del volumen tumoral tras el cambio de

tratamiento a LD (Figura 58) o a PD (Figura 57), donde se puede observar que dichos cambios de tratamiento son capaces de controlar el crecimiento de los tumores resistentes. El análisis detallado de la respuesta en dichos tumores se realizará en los apartados siguientes.

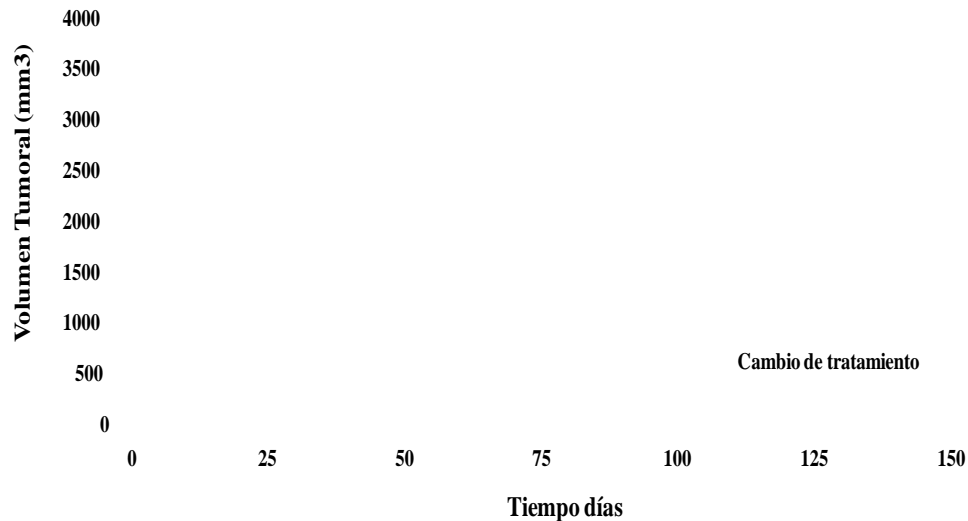


Figura 57. Evolución del volumen tumoral de 5 tumores resistentes a LD y que pasaron a ser tratados con PD.

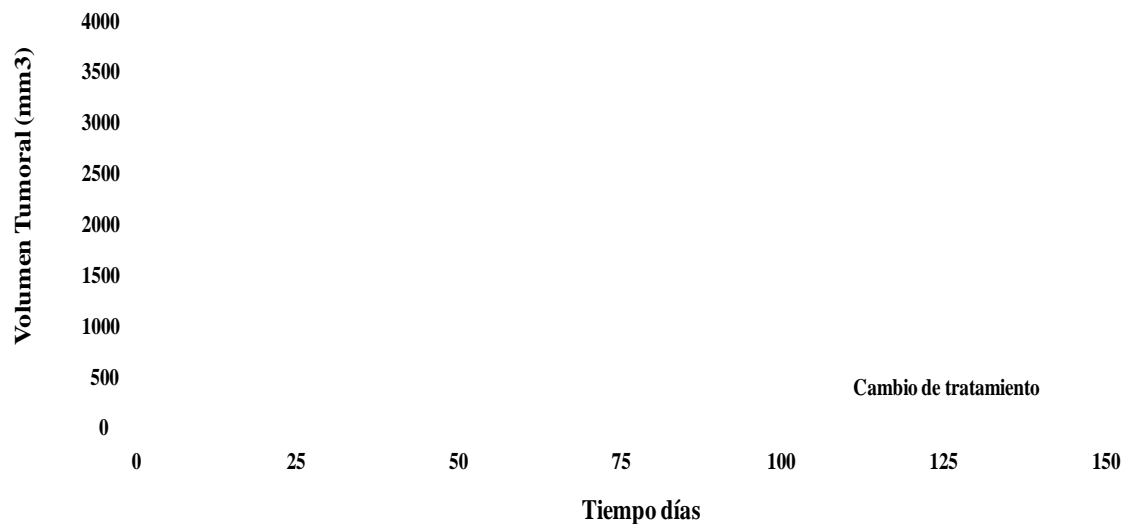


Figura 58. Evolución del volumen tumoral de 5 tumores resistentes a PD y que pasaron a ser tratados con LD.

3.2.1 PD y LD son capaces de vencer la resistencia adquirida “*in vivo*” a la combinación alternativa

Con el fin de analizar mejor la eficacia de los cambios de tratamiento se realizó un análisis del crecimiento del volumen tumoral desde que los tumores llegaron a 1.700 mm³ (punto en que se cambió el tratamiento a la combinación alternativa). Así, mientras que los tumores que una vez llegados a este punto siguieron siendo tratados con la misma combinación a la que eran resistentes, presentaron un crecimiento tumoral rápido y exponencial, aquellos ratones en los que se cambió el tratamiento estabilizaron o incluso disminuyeron el tamaño del plasmocitoma. Este efecto se observó tanto para los tumores resistentes a LD que pasaron a recibir PD (Figura 59) como para los tumores resistentes a PD que pasaron a recibir LD (Figura 60).

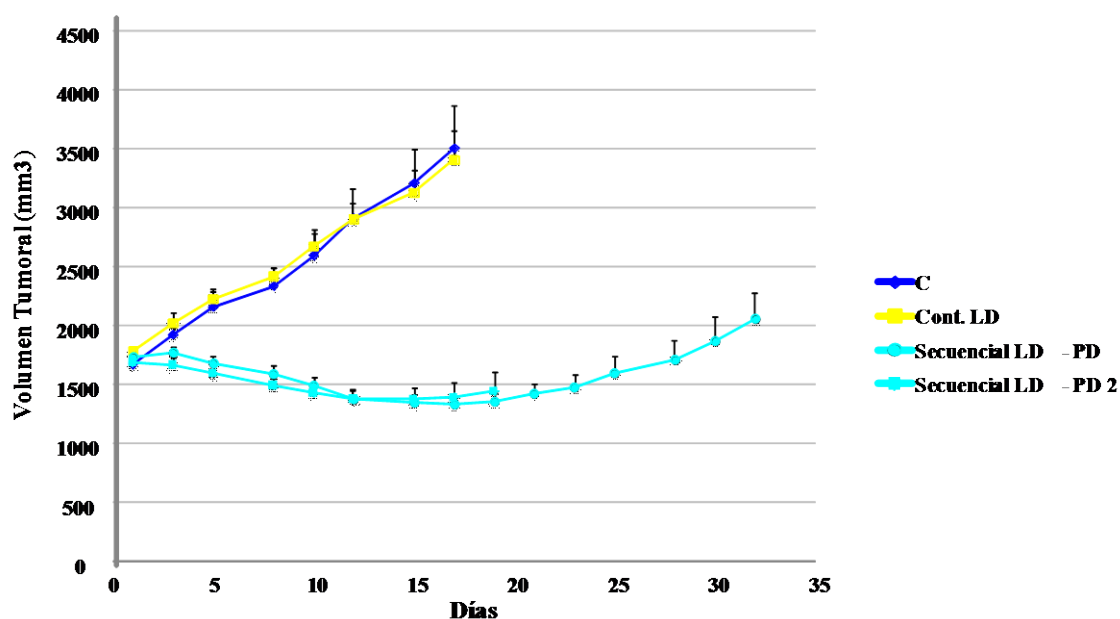


Figura 59. Evolución del crecimiento tumoral de los tumores resistentes a LD que continuaron tratamiento con LD o que cambiaron a PD.

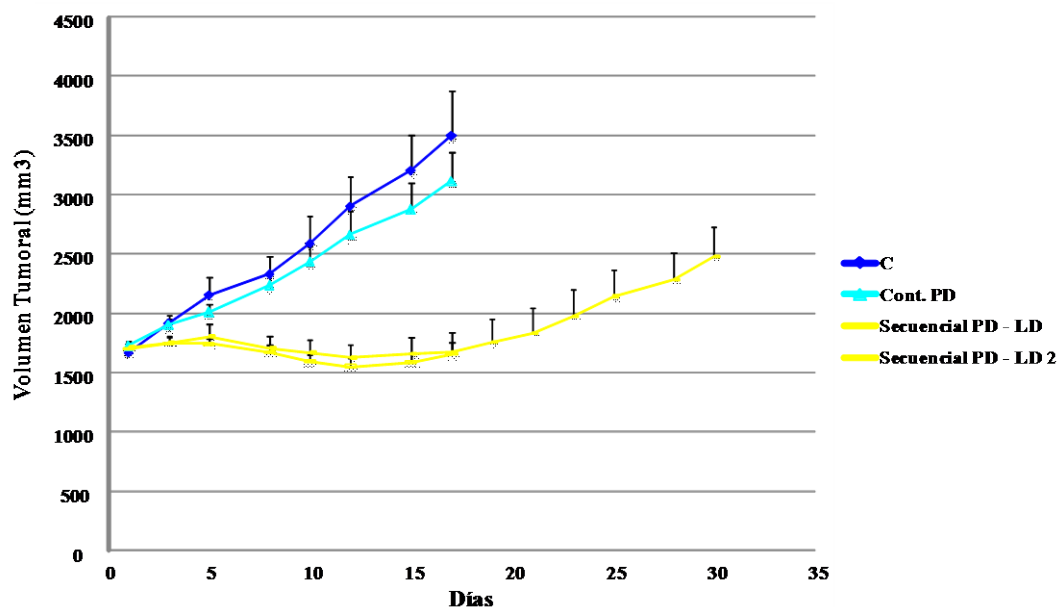


Figura 60. Evolución del crecimiento tumoral de los tumores resistentes a PD que continuaron tratamiento con PD o que cambiaron a LD.

Esto indica que, dado que la Dexametasona es idéntica en ambas combinaciones, Lenalidomida y Pomalidomida, cuando se combinan con el esteroide presentan mecanismos de actuación, al menos en parte, diferentes y no presentan resistencias cruzadas entre sí.

3.2.2. Confirmación “*ex vivo*” de la ausencia de resistencia cruzada entre ambos IMiDs en combinación con dexametasona demostrada en el modelo “*in vivo*”

Como se ha indicado previamente (apartado 3.2), aquellas células procedentes de tumores extraídos de ratones control, sensibles al tratamiento y resistentes a los mismos, fueron incubados “*ex vivo*” con las combinaciones en estudio y, como ya ha

sido demostrado, este experimento confirmó la resistencia a LD a PD. Simultáneamente, las células resistentes a una combinación fueron también incubadas y tratadas con la combinación alternativa para analizar si era posible reproducir en este escenario la ausencia de resistencias cruzadas. El tratamiento “*ex vivo*” con PD fue capaz de revertir parcialmente la resistencia adquirida “*in vivo*” a LD (Figura 62), la situación opuesta no se observó, es decir, LD no fue capaz de revertir la resistencia a PD (Figura 61).

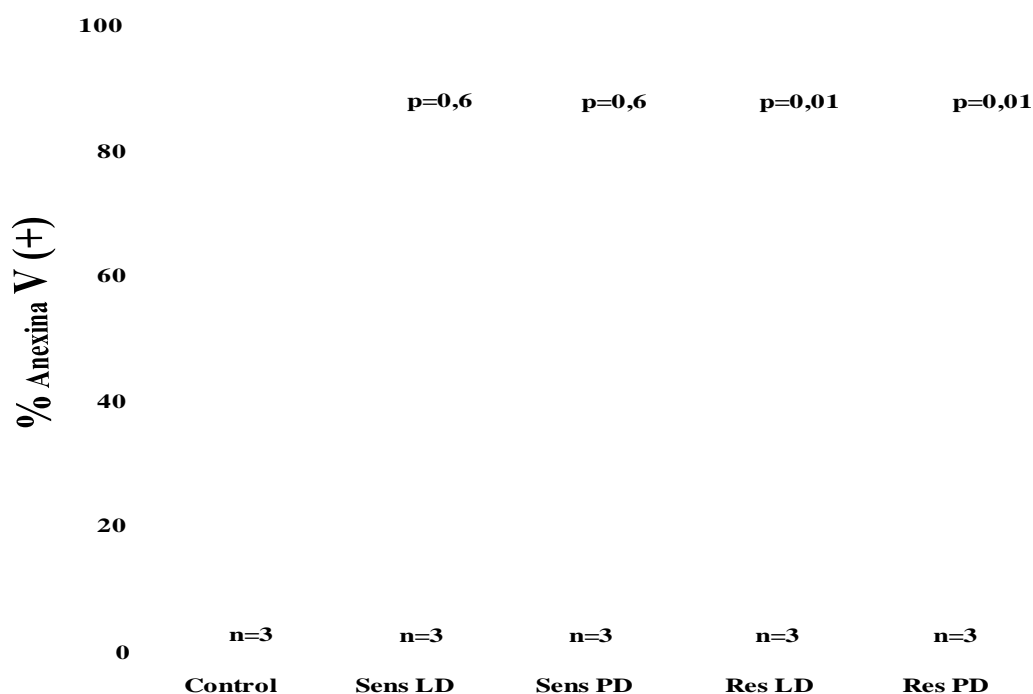


Figura 61. Análisis de la sensibilidad “*ex vivo*” de células resistentes “*in vivo*” a LD (izquierda) o PD (derecha) al tratamiento con LD.

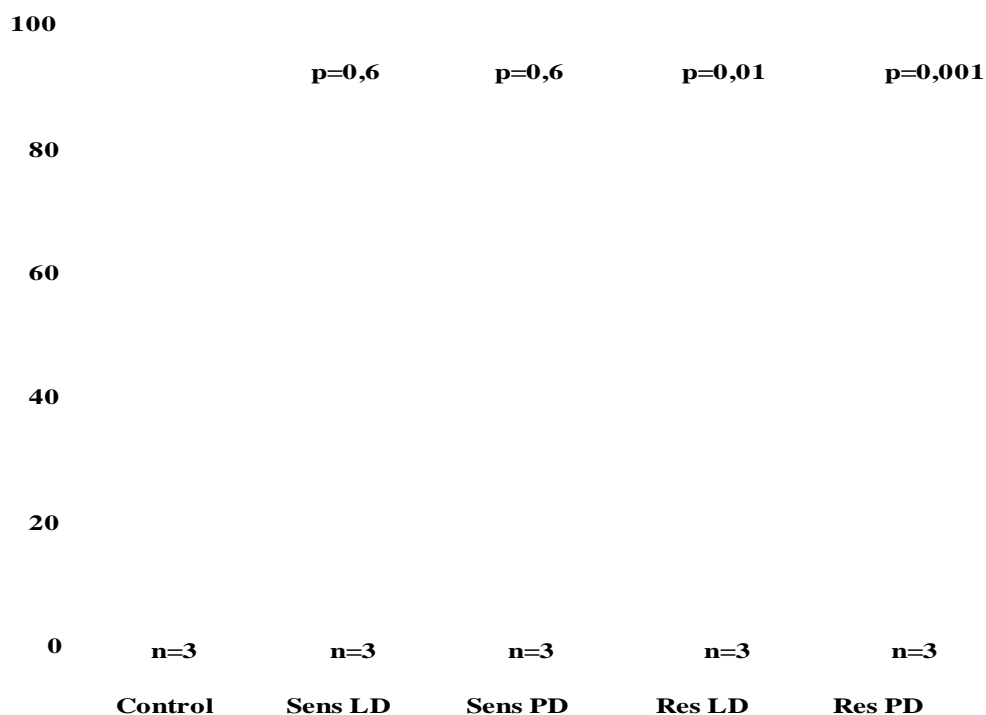


Figura 62. Análisis de la sensibilidad “*ex vivo*” de células resistentes “*in vivo*” a LD (izquierda) o PD (derecha) al tratamiento con PD.

Esta discordancia entre los experimentos “*in vivo*” y “*ex vivo*” en cuanto a la reversibilidad de la resistencia a PD por LD podría ser explicada por dos motivos: en primer lugar por una diferencia de dosis, ya que en los experimentos “*in vivo*” se han utilizado dosis 5 veces superiores para lenalidomida (que se han calculado como dosis equivalentes de ambos fármacos) mientras que en el tratamiento “*ex vivo*” se han utilizado las mismas dosis para ambos (10 μ M). Una segunda explicación sería, que como se discute más adelante, en el tratamiento “*in vivo*” entran en juego muchos otros mecanismos diferentes a los observados en cultivo.

3.2.3. PD es más potente en cuanto a reversión de la resistencia a LD que la situación contraria

Ya ha sido mencionado previamente que PD es ligeramente más potente que LD en los estudios “*in vitro*” y, esta diferencia se hace más pronunciada en los estudios en el modelo animal. Con estos antecedentes se estudió también si esta ventaja en la potencia de PD con respecto a LD se mantenía en los experimentos en los que ambos tratamientos revirtieron la resistencia generada frente al otro. Al comparar las gráficas del perfil de crecimiento de los tumores tras el cambio de tratamiento se observa que el cambio a PD es capaz de controlar mejor el volumen tumoral que el cambio a LD (figura 63).

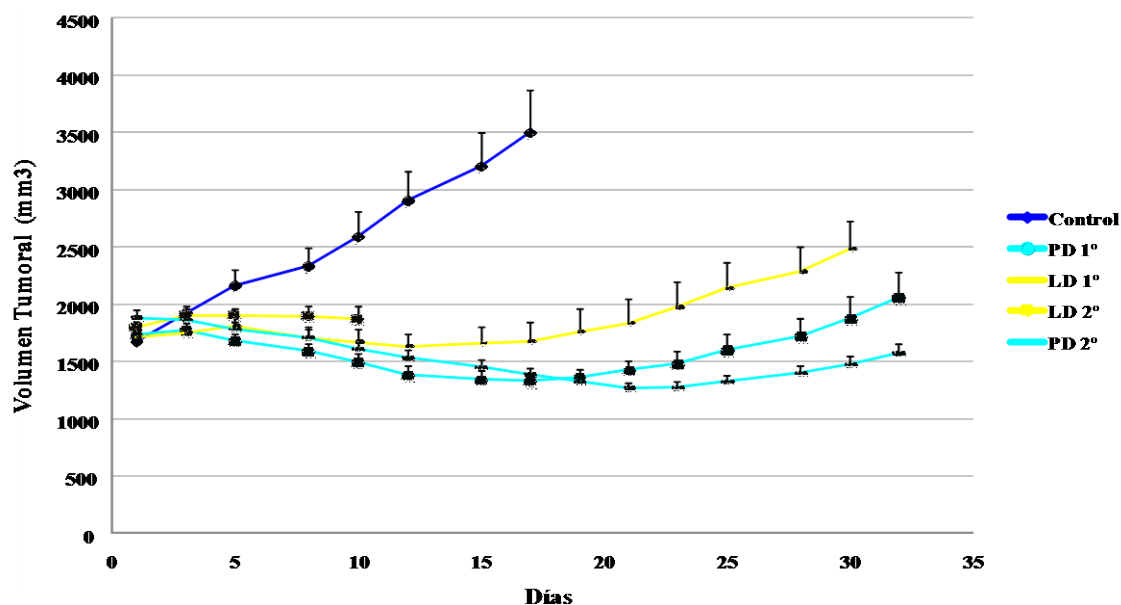


Figura 63. Comparación del crecimiento tumoral de los tumores tras el cambio a PD o tras el cambio a LD.

Estas diferencias que se observan gráficamente se analizaron también, buscando si había diferencias estadísticamente significativas en términos de control o disminución del volumen tumoral y en términos de TTP en los grupos en que se cambió al

tratamiento a PD frente a los que se cambió a LD. Así, PD consiguió una respuesta significativamente superior en términos de máxima respuesta alcanzada (medida en cuanto al % de volumen del tumor con respecto al cambio de tratamiento) en comparación a los ratones cambiados a LD (90% vs 75% $p=0.005$) (figura 64).

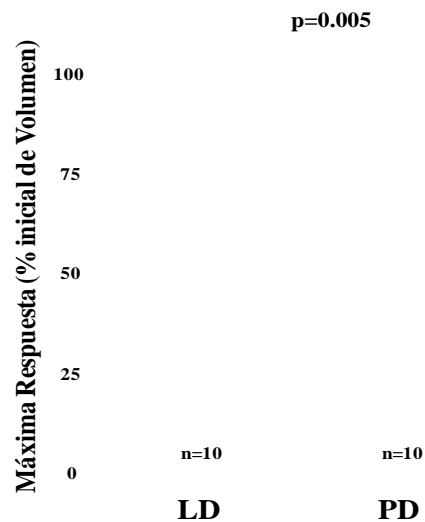


Figura 64. Máxima respuesta alcanzada en términos de % del volumen inicial en ratones resistentes a PD y tratados con LD y en ratones resistentes a LD tratados con PD.

De igual forma, si evaluamos el TTP en ambos grupos de ratones se observa que los ratones a los que se les cambió en tratamiento a PD disfrutaron de un mayor TTP con diferencias estadísticamente significativas.

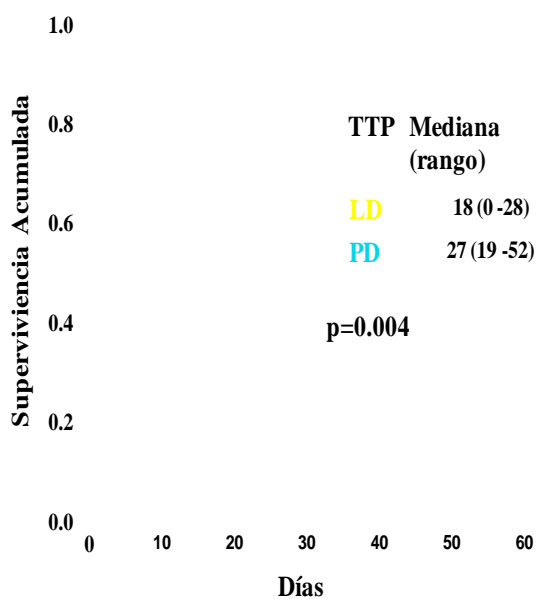


Figura 65. TTP de ratones resistentes a PD y tratados con LD y en ratones resistentes a LD tratados con PD

3.2.4. Estudio de la eficacia de un tratamiento alternante con Lenalidomida + Dexametasona y Pomalidomida + Dexametasona

La capacidad de cada una de las combinaciones de revertir la resistencia adquirida a la contraria y la consecuente diferencia en sus mecanismos de acción y resistencia, condujo a plantear la hipótesis de que quizá un tratamiento consistente en la administración de LD y PD de forma alternante (una semana cada uno), podría retrasar la aparición de resistencias.

Para confirmar esta hipótesis, un grupo de ratones (n=10), fue tratado desde el inicio con este esquema de tratamiento; la mitad de esos ratones inició la primera semana con LD y la otra mitad inició con PD.

Como se observa en la figura 66 no se observaron diferencias en la evolución del volumen tumoral entre los ratones tratados de forma continua con las combinaciones en estudio y los ratones tratados con ambas combinaciones de forma alternante.

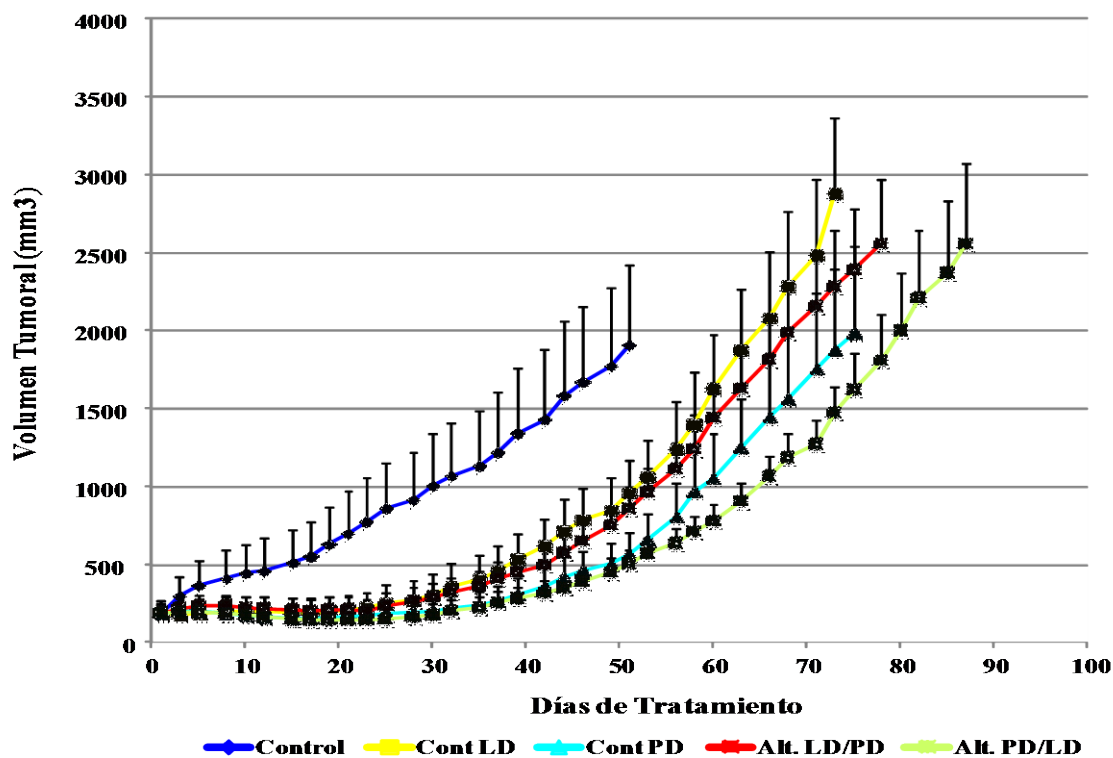


Figura 66. Comparación de la evolución del crecimiento tumoral en ratones tratados de forma continua con LD y PD y aquellos tratados de forma alternante con dichas combinaciones.

Esta ausencia de ventajas en la disminución o enlentecimiento de la velocidad de crecimiento tumoral se correlacionó con una ausencia de ventaja en el TTP de los tratamientos alternantes.

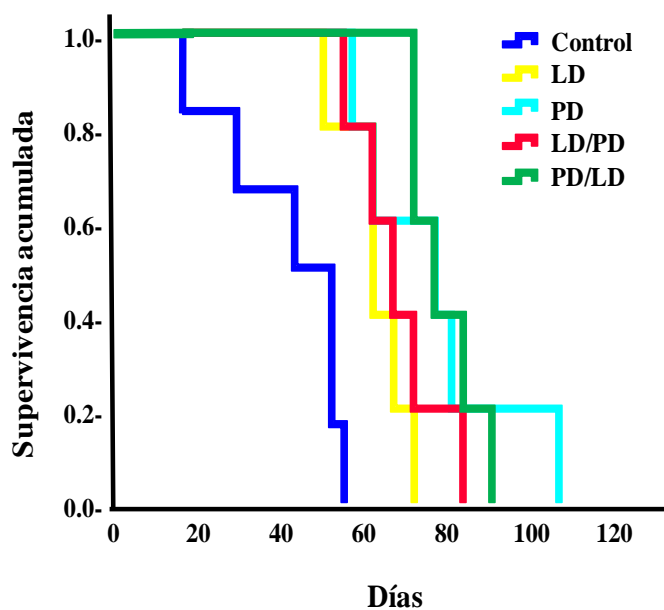


Figura 67. Comparación del TTP de los ratones tratados de forma continua con LD y PD y de los tratados de forma alternante con dichas combinaciones.

Es interesante observar que, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, parece que la eficacia de los tratamientos alternantes dependen, fundamentalmente, de qué combinación ha sido administrada en primer lugar; así, la gráfica de LD/PD es muy similar a la del tratamiento continuado con LD mientras que la gráfica de PD/LD se asemeja a la de PD.

3.3. Estudio de la potencial reversibilidad de la resistencia a las combinaciones de IMIDs más dexametasona tras un periodo de lavado sin el tratamiento

3.3.1. La resistencia generada a LD y PD es reversible tras un periodo sin recibir dicho tratamiento

Como se puede deducir de las gráficas de los apartados anteriores, tras un periodo de sensibilidad inicial al segundo tratamiento administrado tras el primer

cambio, los ratones volvieron a desarrollar resistencias a ese segundo tratamiento, por lo que en este momento cada uno de dichos ratones ha desarrollado resistencia a las dos combinaciones. Una vez que los ratones han generado resistencia al segundo tratamiento, fueron tratados de nuevo con la combinación utilizada inicialmente y a la que habían sido previamente resistentes. Sorprendentemente, todos estos ratones que recibieron un segundo cambio de tratamiento, mostraron, nuevamente sensibilidad al tratamiento al que habían sido previamente resistentes (Figura 68).

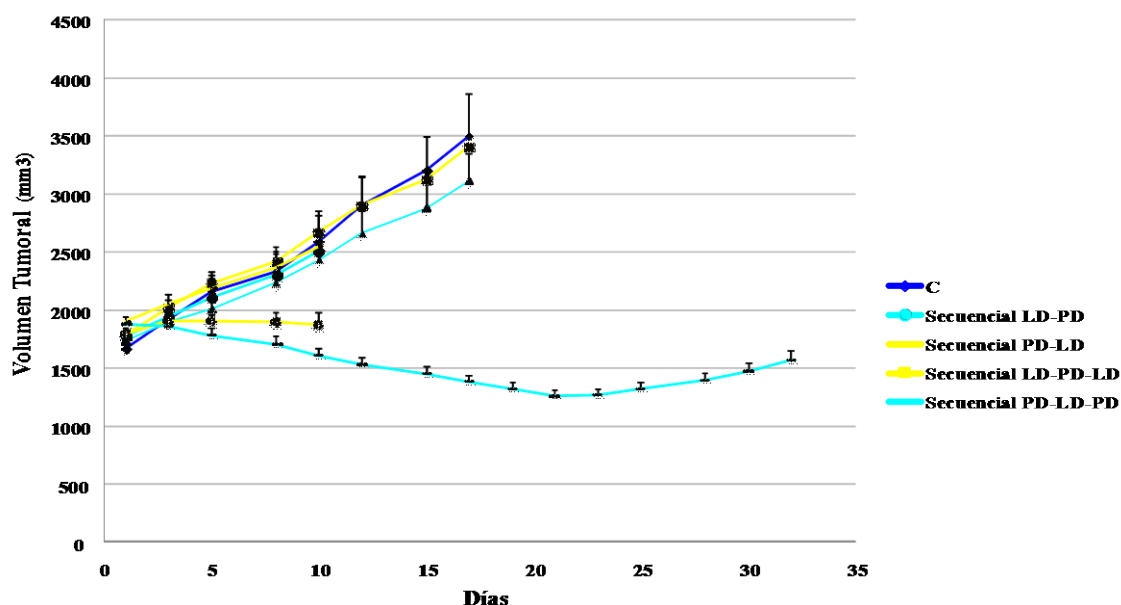


Figura 68. Comparación del crecimiento tumoral de los tumores tras el segundo cambio a PD o a LD.

Esto estaría indicando que la resistencia completa que se observó inicialmente en dichos ratones, es reversible tras un periodo de lavado sin la combinación administrada. Este periodo de lavado está representado en este experimento por los, aproximadamente, 20-30 días que los ratones son tratados con la combinación alternativa. Además, esta transitoriedad de la resistencia a pesar de seguir siendo tratados, aunque esta vez con la combinación alternativa de IMID + Dexametasona,

refuerza la idea planteada previamente de los diferentes mecanismos de actuación de Lenalidomida y Pomalidomida.

3.3.2. PD muestra nuevamente mayor potencia que LD en el segundo cambio de tratamiento

De forma similar a lo observado en el apartado anterior, a pesar de que la gráfica del grupo de ratones tratados con LD-PD-LD sólo pudo ser representado hasta el día 10 debido al sacrificio de uno de los ratones, se puede inferir una mejor actividad de los ratones tratados con Pomalidomida + Dexametasona que los tratados con Lenalidomida + Dexametasona en este momento (Figura 68). El análisis estadístico en cuanto a máxima respuesta (Figura 69) y en cuanto a TTP (Figura 70) confirmaron de nuevo esta diferencia que fue estadísticamente significativa.

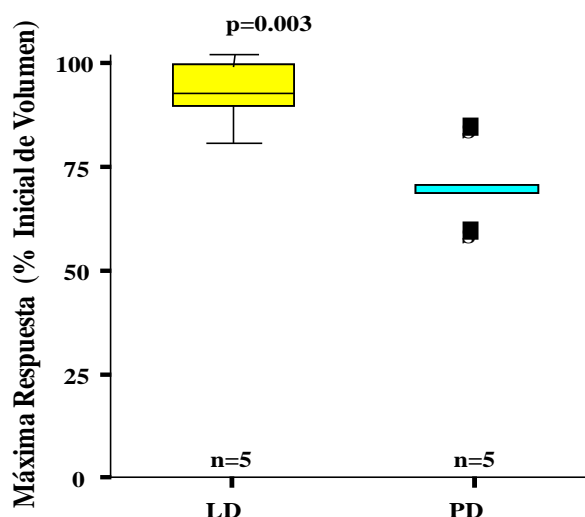


Figura 69. Máxima respuesta alcanzada en términos de % del volumen inicial en ratones tratados con PD y LD en un segundo cambio de tratamiento.

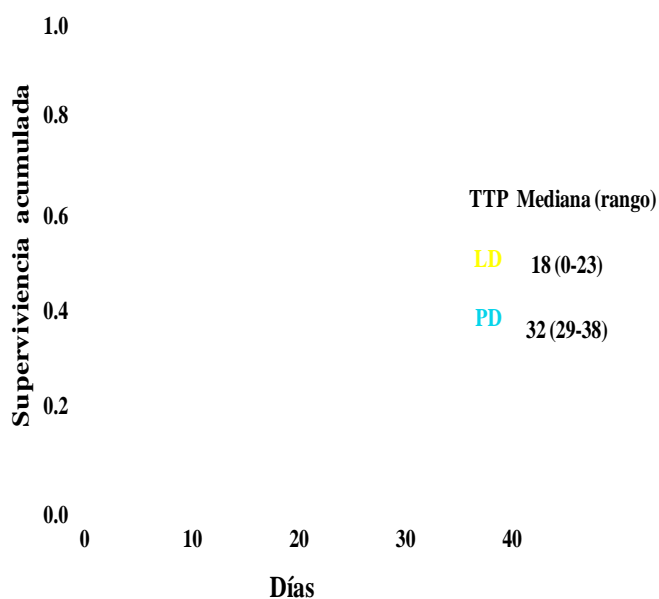


Figura 70. TTP de ratones tratados con PD y LD en un segundo cambio de tratamiento

3.3.3. Confirmación “*ex vivo*” de la reversibilidad de la resistencia observada en los experimentos “*in vivo*”

Los experimentos “*in vivo*” no permiten un periodo de lavado totalmente libre de tratamiento (sino que los ratones deben recibir la combinación alternativa) ya que una vez que los ratones desarrollan resistencia, el crecimiento tumoral es exponencial y los ratones sin tratamiento deben ser sacrificados por el volumen del tumor en pocos días. Sin embargo este experimento de lavado sin ningún tratamiento sí puede ser realizado “*ex vivo*” en células en cultivo. Para ello, utilizamos el mismo experimento ya referido en el apartado 3.1.2, en que se extrajeron células tumorales de ratones con plasmocitomas resistentes y se pusieron en cultivo, observándose que dichas células también eran resistentes al tratamiento con dichas combinaciones “*ex vivo*”. Algunas de esas células resistentes a LD o a PD fue mantenida en cultivo en medio sin la presencia de fármaco y la sensibilidad a los tratamientos fue analizada tras 7, 14 y 21 días en

cultivo. Tras cada uno de esos tiempos, las células inicialmente resistentes fueron tratadas durante 5 días con la combinación a la que habían desarrollado resistencia y el porcentaje de muerte celular fue analizado por Anexina V por citometría de flujo. Como se observa en la figura 71, las células que habían desarrollado resistencia a LD en el modelo murino, recuperaron parcialmente la sensibilidad tras 7 días en cultivo. Algo similar sucedió en las células resistentes a PD, aunque en este caso, la pérdida de la resistencia fue más progresiva y se observa una progresión de los 7 a los 14 y a los 21 días.

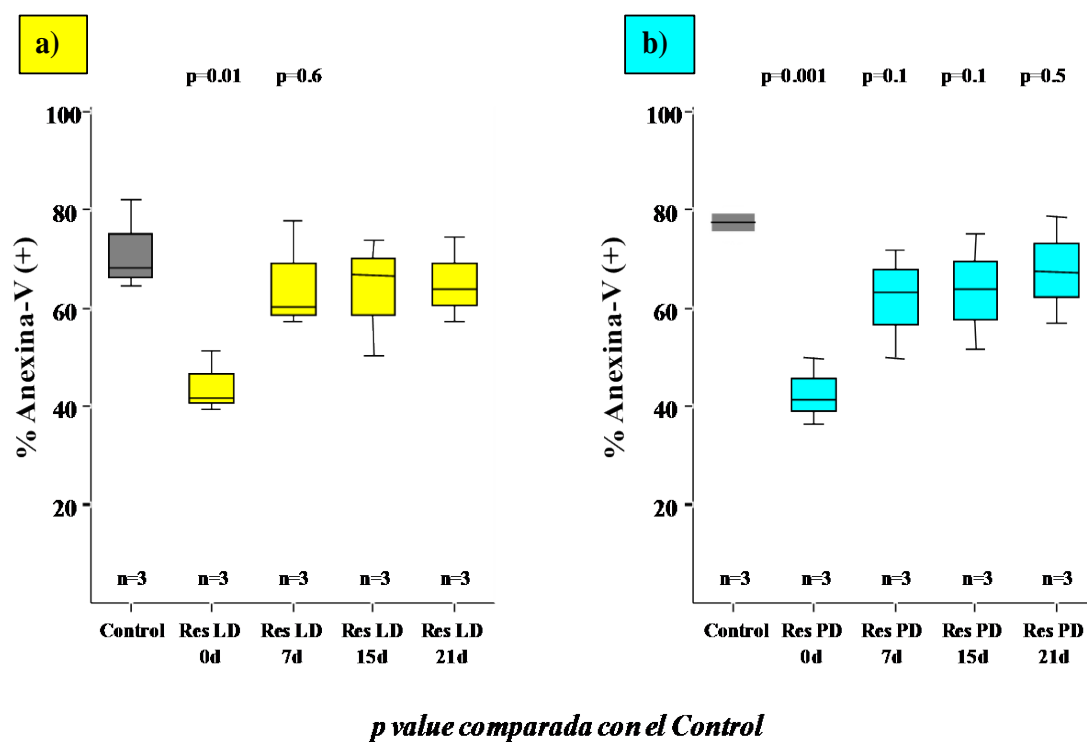


Figura 71. Análisis de la sensibilidad/resistencia “*ex vivo*” de las células que habían desarrollado resistencia “*in vivo*” a LD o a PD.

a) Sensibilidad “*ex vivo*” a LD de células resistentes “*in vivo*” a dicha combinación.

b) Sensibilidad “*ex vivo*” a PD de células resistentes “*in vivo*” a dicha combinación.

Condiciones del tratamiento: Pomalidomida y Lenalidomida 10 μ M y Dexametasona 10 nM para 5 días de tratamiento.

3.3.4. Comparación de la eficacia a LD o a PD tras los sucesivos cambios de tratamiento

Por último en esta parte, se planteó si los diferentes cambios de tratamiento o retratamientos incidían de forma negativa en la efectividad de dichas combinaciones, es decir, si la eficacia de los tratamientos iba disminuyendo progresivamente con los cambios de tratamiento y con el desarrollo de resistencias. Para responder a esta hipótesis se analizó para cada una de las combinaciones (LD y PD) la evolución gráfica (Figura 72), la respuesta máxima alcanzada (Figura 73), y el TTP (Figura 74) tras el primer cambio de tratamiento y tras el segundo cambio de tratamiento.

Como se puede observar en las figuras, de forma gráfica y también de forma estadística (ya que no hubo diferencias significativas), los diferentes cambios de tratamiento, en este modelo, no promovieron una pérdida de sensibilidad a las combinaciones estudiadas.

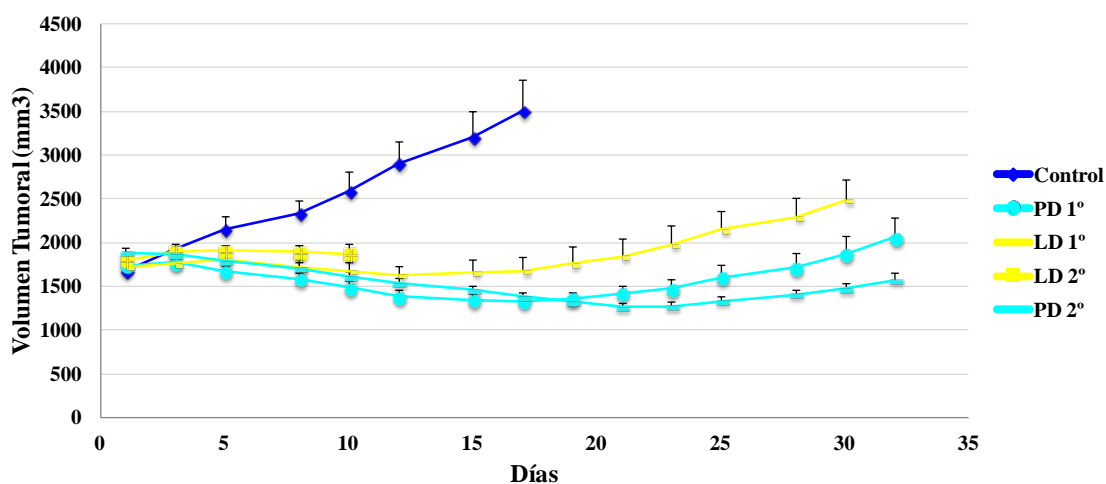


Figura 72. Evolución comparativa del crecimiento tumoral tras el primer y segundo cambios de tratamiento a LD o a PD.

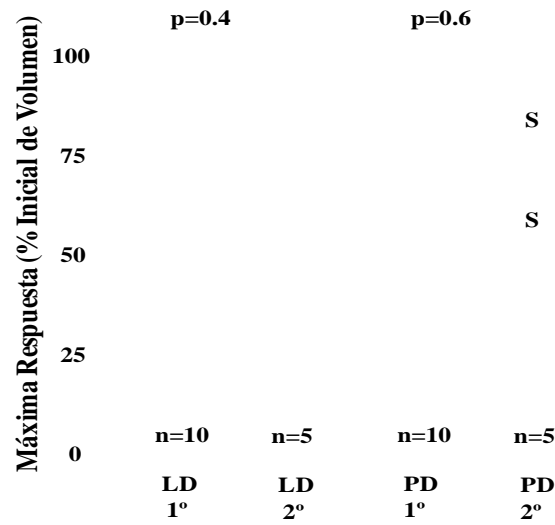


Figura 73. Comparación de la máxima respuesta a LD y a PD tras el primer y segundo cambios de tratamiento.

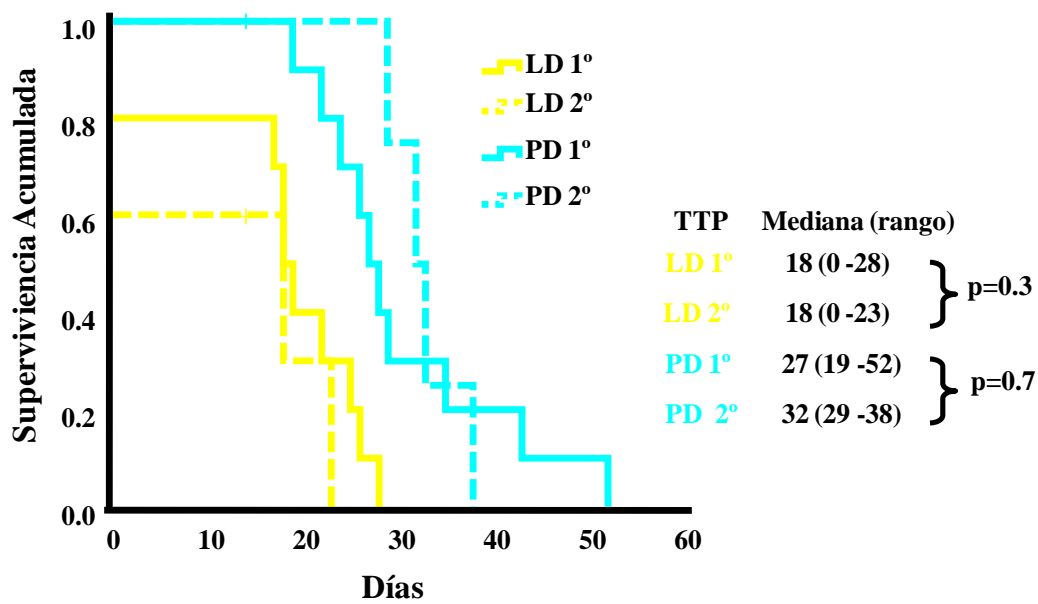


Figura 74. Comparación del TTP de LD y de PD tras el primer y segundo cambios de tratamiento.

4. Capítulo IV: Análisis “in vivo” de los mecanismos asociados al desarrollo de la resistencia adquirida a las combinaciones de IMiDs + dexametasona

Una vez demostrada la resistencia a las combinaciones LD y PD en el modelo murino de plasmocitoma subcutáneo y tras definir algunas de sus características, nos planteamos estudiar algunos de los mecanismos responsables de la misma. Para ello se realizaron numerosos estudios biológicos en células extraídas de los tumores que habían desarrollado resistencias. En primer lugar se realizaron estudios de citometría de flujo para valorar los posibles cambios fenotípicos asociados al desarrollo de resistencia. Asimismo se analizaron mediante Western-Blot diferentes vías de señalización implicadas en supervivencia celular y en resistencia a fármacos para ver su estado en las células resistentes; y, por último se analizó el perfil de expresión génica de los tumores sensibles frente a los resistentes.

4.1 Análisis del perfil fenotípico de los tumores resistentes

La caracterización inmunofenotípica, realizada por citometría de flujo multiparamétrica, demostró que no existían diferencias significativas de fenotipo, para los anticuerpos utilizados, entre la línea celular MM1S original, las células extraídas de plasmocitomas de los ratones no tratados (ratones control) y de los resistentes a las combinaciones de Lenalidomida o Pomalidomida más Dexametasona, como se observa en la figura 75.

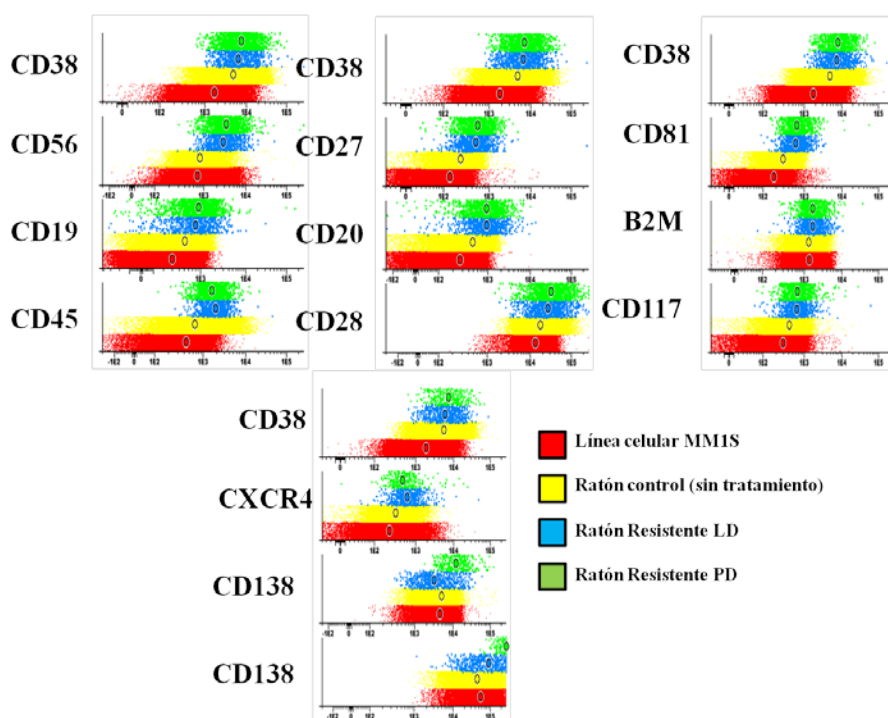


Figura 75. Análisis del perfil fenotípico de las células preimplantación, de los plasmocitomas no tratados y de los tumores resistentes.

4.2. Estudio del papel de la activación de vías de señalización (vía de MEK/ERK) en el desarrollo de resistencias a IMiDs más dexametasona

Como se ha mencionado, otro de las estrategias utilizadas para intentar determinar los mecanismos involucrados en la emergencia de resistencias adquiridas al tratamiento con IMiDs + Dexametasona fue analizar mediante Western-Blot la activación de dos de las vías de señalización más importantes en la patogénesis del MM, como son PI3K/AKT/mTOR y MEK/ERK. El estado de estas vías se analizó en células procedentes de tumores no tratados (controles); de tumores tratados y sensibles a las combinaciones; y de tumores resistentes a dichos tratamientos. Así, aunque se observó algún cambio en la fosforilación de AKT entre los tumores controles, sensibles o resistentes a los tratamientos (Figura 76), dicho cambio es muy sutil, lo que sugiere que

dicha vía no juega un papel importante en la actividad de las combinaciones de IMiDs + Dexametasona en nuestro modelo.

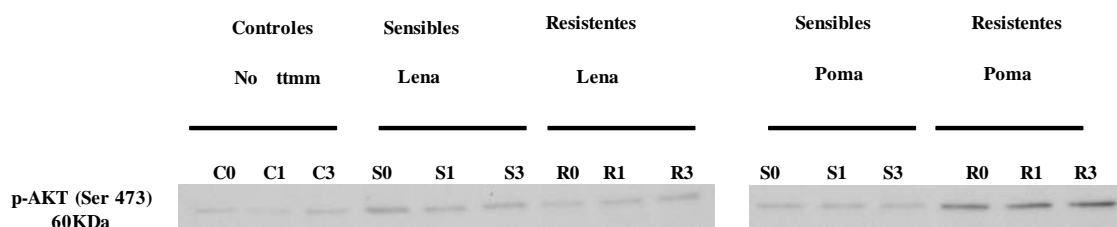


Figura 76. Western-Blot de p-AKT en tumores controles, sensibles a LD o PD y resistentes a LD o PD.

Sin embargo, al analizar la vía de MEK/ERK, se observó una importante disminución de la fosforilación de ERK 1/2 tras el tratamiento con ambas combinaciones, indicando que la acción de estas combinaciones está relacionada con un descenso en la actividad de esta vía de proliferación (Figura 77). Sin embargo, lo que resultó más interesante fue que la generación de resistencia en los plasmocitomas se asoció a un aumento muy importante en la fosforilación de pERK 1/2 en las células de los ratones tratados y resistentes a la combinación de Pomalidomida + Dexametasona (Figura 77). Por el contrario, aunque pERK 1/2 sí aumentó en las células resistentes a Lenalidomida + Dexametasona, esta fosforilación fue muy inferior a la observada en PD y no sobrepasó la situación basal (tumores control) por lo que no parece decisiva en la generación de resistencias a la combinación de LD.

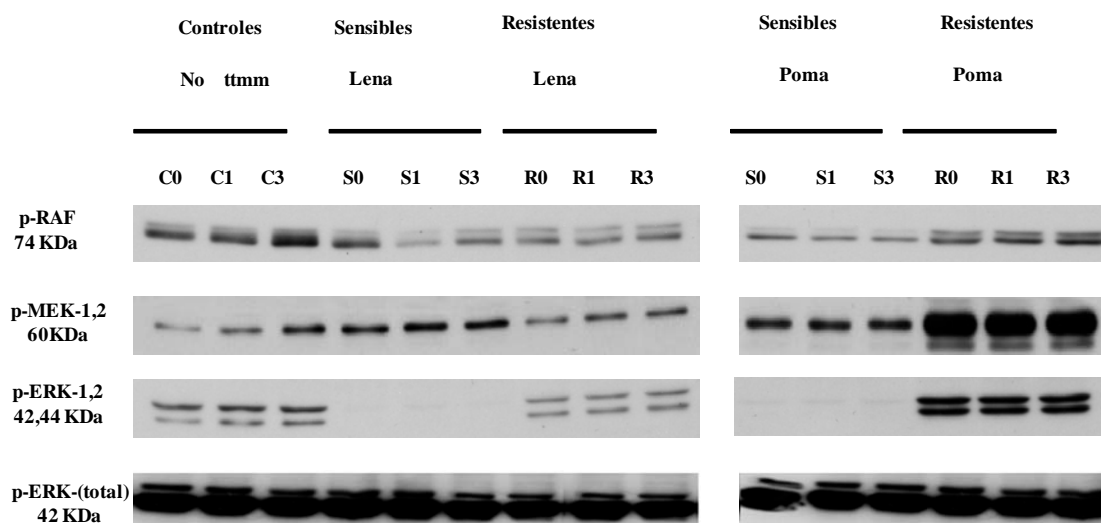


Figura 77. Western-Blot de diferentes componentes de la vía de MEK/ERK en tumores controles, sensibles a LD o PD y resistentes a LD o PD.

Posteriormente, se analizó el estado de activación de otras proteínas situadas por encima de p-ERK 1/2 en dicha vía de señalización. Estos estudios demostraron que, en línea con lo anterior existe un importante incremento en la fosforilación de MEK y RAF en todos ellos (Figura 77).

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la vía de MEK/ERK parece ser un mecanismo específico de resistencia a la combinación de Pomalidomida + Dexametasona, sin que parece que sea relevante en la combinación LD. Para profundizar en este mecanismo, se realizaron combinaciones “*in vitro*” de LD y PD con un inhibidor comercial de la actividad quinasa de p-MEK (PD98059) a 3 y 5 días de tratamiento. Como se puede observar en las figura 78 y 79, la inhibición de esta vía potenció de forma la actividad de la combinaciones de Lenalidomida + Dexametasona y de Pomalidomida + Dexametasona a ambos tiempos de tratamiento, siendo este efecto particularmente marcado en el caso de las combinaciones con Pomalidomida en comparación con las que incluyeron Lenalidomida.

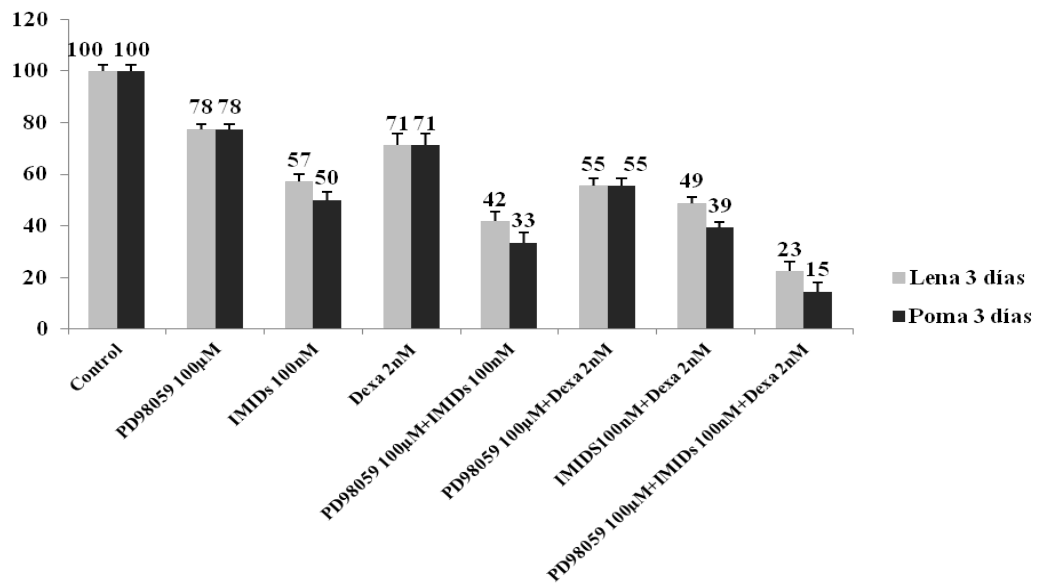


Figura 78. Combinaciones de IMiDs y Dexametasona más PD98059 a 3 días de tratamiento

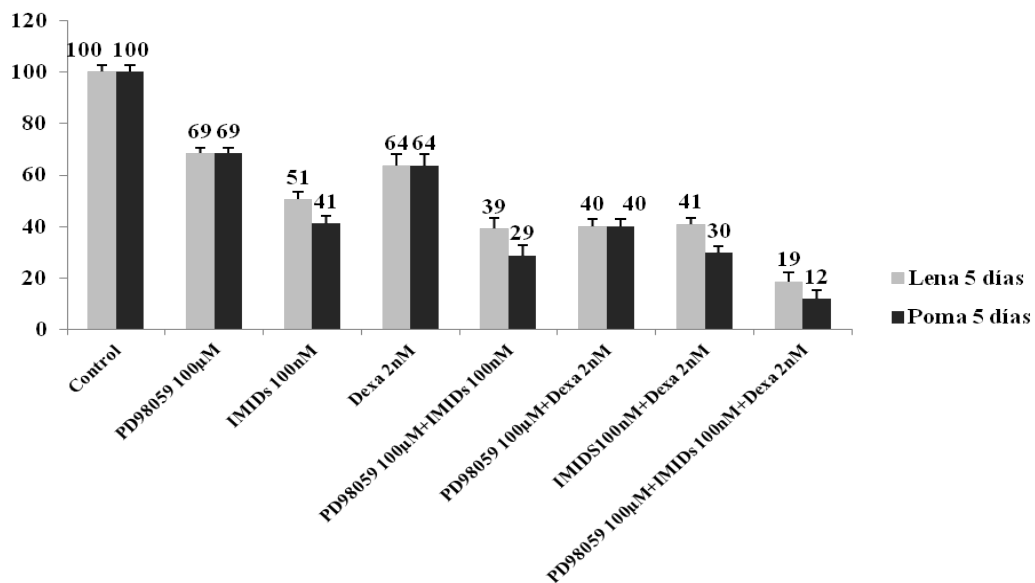


Figura 79. Combinaciones de IMiDs y Dexametasona más PD98059 a 5 días de tratamiento

4.3. Evaluación de los cambios en el perfil de expresión génica de los tumores sensibles a Lenalidomida ó Pomalidomida más Dexametasona frente a su contrapartida resistente

Se analizó el perfil de expresión génica de las células extraídas de los plasmocitomas correspondientes a ratones sensibles al tratamiento con Lenalidomida más Dexametasona y Pomalidomida más Dexametasona (objetivada la sensibilidad por la reducción del tamaño tumoral), así como de las células procedentes de tumores de ratones resistentes (objetivados por el crecimiento exponencial del tumor a pesar de estar bajo tratamiento) y de las células tumorales de ratones control (sin tratamiento farmacológico) (Figura 80). El objetivo de este estudio era investigar si el transcriptoma de las células extraídas de los plasmocitomas resistentes al tratamiento era diferente del que presentaban las células procedentes de los plasmocitomas sensibles, comparando siempre estas dos situaciones con el estado del transcriptoma de las células en situación basal, es decir no expuestas a los fármacos.

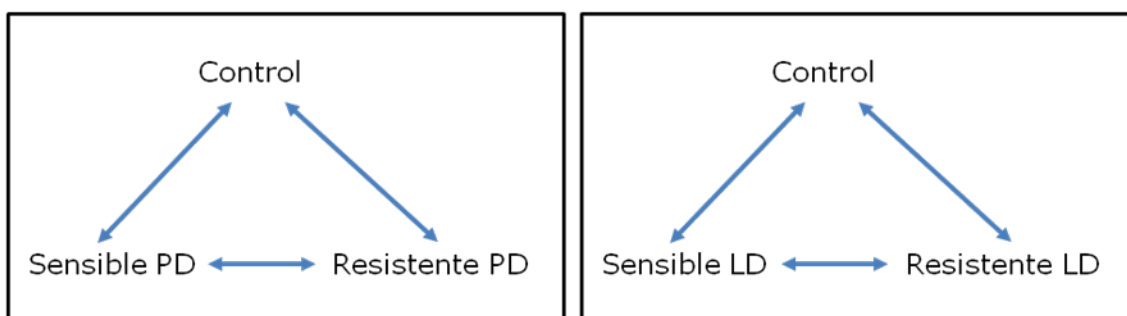


Figura 80. Esquema del análisis realizado de los cambios a nivel genómico entre los tumores sensibles y resistentes a Lenalidomida más Dexametasona y Pomalidomida más Dexametasona así como en tumores control sin tratamiento.

4.3.1. Análisis del perfil de expresión génica de las células sensibles y resistentes al tratamiento con Lenalidomida más Dexametasona

Para averiguar las diferencias significativas en la expresión génica entre las células sensibles, las resistentes y las células control se realizó un análisis supervisado mediante el algoritmo SAM. La primera comparación se realizó entre las células sensibles y las resistentes a Lenalidomida-Dexametasona (SLD y RLD, respectivamente) detectándose 42 genes desregulados (todos ellos sobreexpresados en SLD con respecto a RLD). Cuando se realizó el segundo contraste que comparó las SLD frente a las células de tumores control, sin tratamiento (CLD), se identificaron 22 genes desregulados (17 sobreexpresados y 5 infraexpresados en las SLD). En tercer lugar, en el contraste entre las RLD y CLD sólo había 9 genes con diferencias significativas en su nivel de expresión (8 sobreexpresados y 1 infraexpresado en las RLD respecto a CLD). Al cruzar las tres comparaciones entre sí, se observó que solamente existían 7 genes comunes a la primera y segunda comparación, (SLD vs RLD y SLD vs CLD), como se observa en los diagramas de Venn representados en la figura 81.

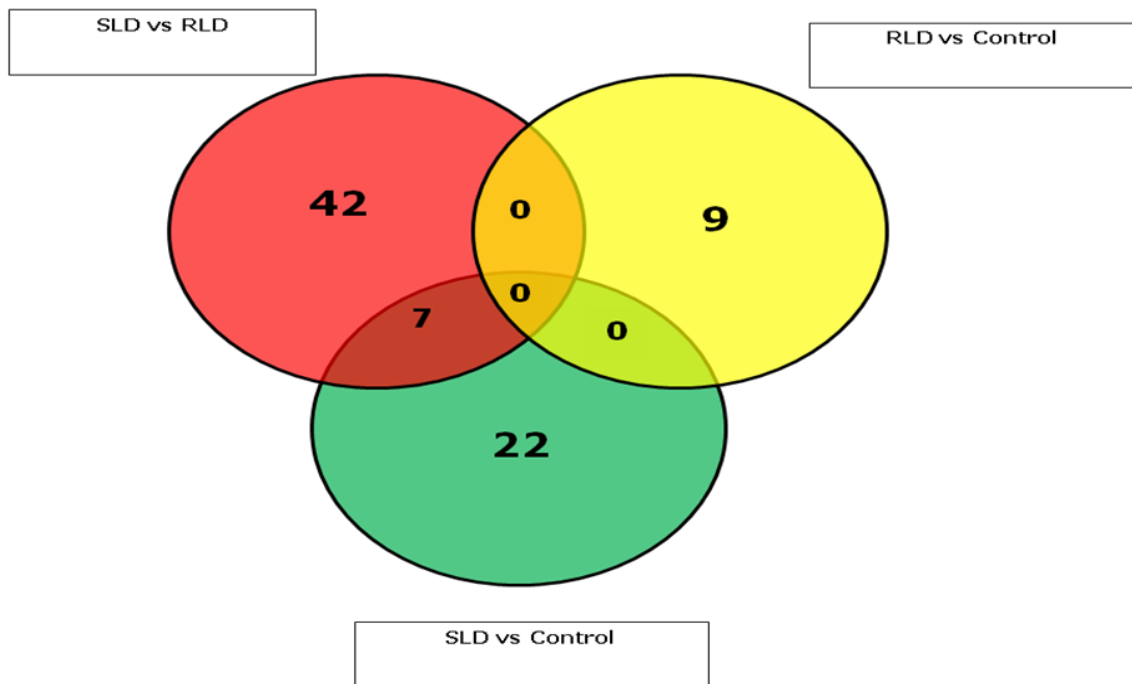


Figura 81. Diagramas de Venn para las muestras Control, Sensibles y Resistentes a LD.

Tal y como se muestra en la figura 82 estos 7 genes comunes a ambas comparaciones mostraban un nivel de expresión aumentado significativamente en las células SLD, mientras que se mantenía igual en las células RLD y CLD. Estaríamos por tanto hablando de genes asociados exclusivamente a la sensibilidad al tratamiento de Lenalidomida más Dexametasona.

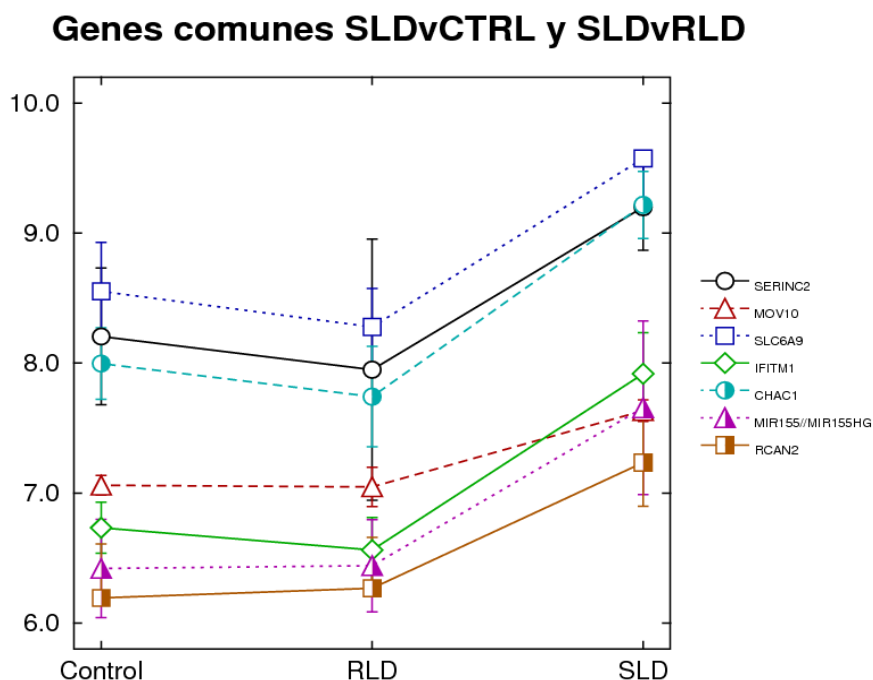


Figura 82. Genes desregulados Exclusivamente por el tratamiento de Lenalidomida con Dexametasona.

De los 7 genes sobreexpresados en las células SLD, destaca por su importancia biológica en el MM, IFITM1 (interferon induced transmembrane protein 1) que juega un papel clave en la acción antiproliferativa de IFN- γ , ya sea inhibiendo la activación de ERK o mediante la parada de células en fase G1 de una manera dependiente de P53.

El escaso número de genes desregulados nos ha impedido realizar un análisis funcional capaz de integrarlos en rutas biológicas potencialmente implicadas en la patología del MM.

El análisis no supervisado de las 16.000 sondas incluidas en el estudio, tanto el realizado mediante MDS (Multidimensional Scaling) en 2 y 3 dimensiones (2D y 3D respectivamente) como por medio de clúster jerárquico, no logró identificar un agrupamiento de las muestras en función de la sensibilidad o resistencia al tratamiento,

tal y como se muestra en la figura 83. Esto indicaría que las diferencias en la expresión génica entre las tres clases (SLD, RLD y CLD) no es lo suficientemente marcada como para que un análisis sin información "a priori" consiga crear una estructura con los 3 grupos claramente separados.

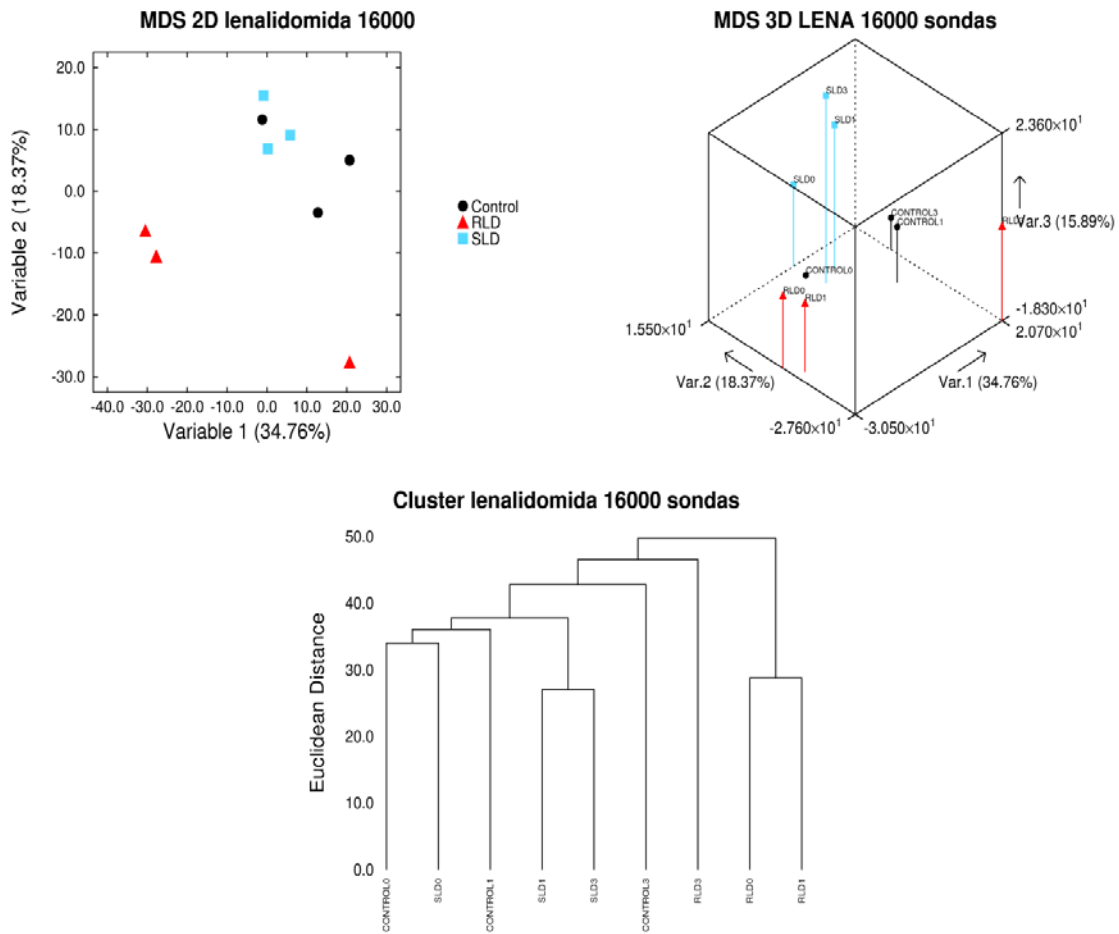


Figura 83. Análisis estadístico no supervisado de las muestras control, sensibles y resistentes a LD.

4.3.2. Análisis del perfil de expresión génica de las células sensibles y resistentes al tratamiento con Pomalidomida más Dexametasona

Siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior, en primer lugar se realizó un análisis supervisado de los datos de expresión génica. El primer contraste, entre células sensibles y resistentes a Pomalidomida (SPD y RPD, respectivamente), reveló la existencia de 1565 genes expresados diferencialmente (270 genes sobreexpresados y 1.295 infraexpresados en SPD con respecto a RPD). Al realizar la segunda comparación de las SPD frente a las células control sin tratamiento (CPD) se identificaron 194 genes desregulados en las SLD (99 sobreexpresados y 95 infraexpresados). En tercer lugar, en la comparación entre las RLD y CLD sólo había 30 genes con expresión significativamente diferente (24 sobreexpresados y 6 infraexpresados en las RPD respecto a CPD). Al cruzar todas las comparaciones entre sí, tal y como se muestra en los diagramas de Venn de la figura 84, se observó un solapamiento en 166 genes comunes entre la primera y segunda comparación, 11 genes comunes entre la primera y tercera comparación y 2 genes entre la segunda y tercera.

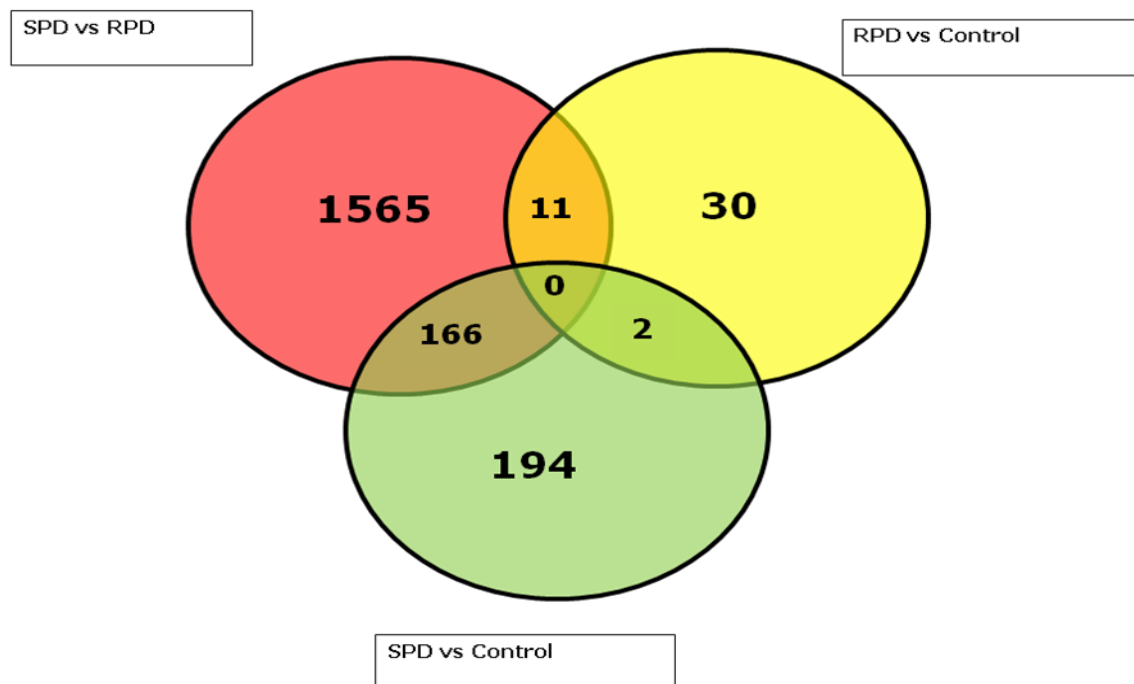


Figura 84. Diagramas de Venn para las muestras control, sensibles y resistentes a PD.

Los 166 genes comunes a la comparación primera y segunda, de nuevo, representan genes que se desregulan (a veces sobreexpresados y otras infraexpresados), con el tratamiento pero que vuelven a la situación basal (CPD) tras el desarrollo de resistencia (RPD) (Figura 85).

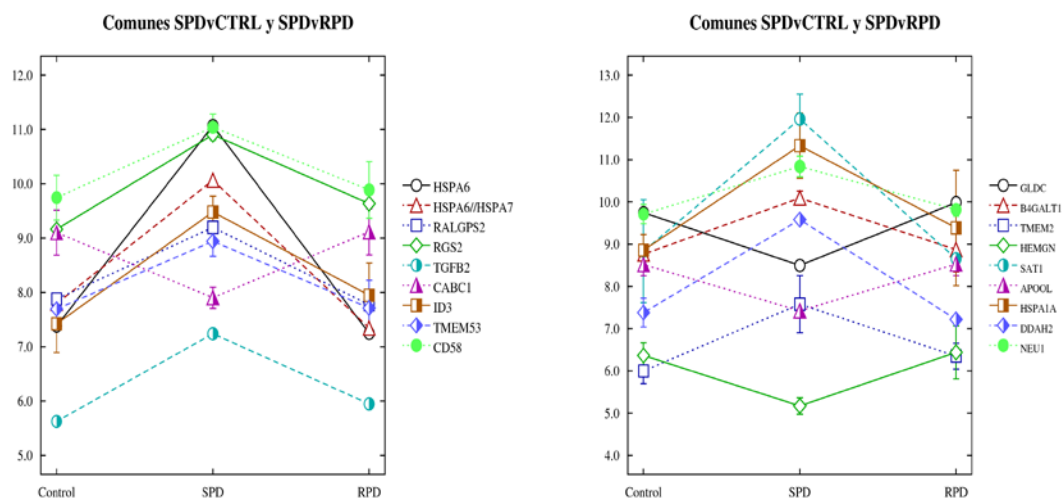


Figura 85. Genes desregulados comúnmente entre la primera y segunda comparación.

En la tabla 11 se destacan las funciones moleculares y celulares más relevantes en las que se agrupan algunos de estos 166 genes que están asociados a sensibilidad a PD.

Tabla 11. Funciones moleculares de algunos de los 166 genes comunes SPDvRPD vs SPDvCPD.

Genes implicados en: FUNCIONES MOLECULARES Y CELULARES
Con un grado de significación $p < 0,05$
- Desarrollo celular: 8 genes (\uparrow EGR1, \uparrow ITGAV, \uparrow NR4A2, \downarrow PRKCA)
- Muerte celular: 5 genes (\uparrow ITGAV, \uparrow NR4A2, \uparrow NR4A1)
- Crecimiento y proliferación celular: 18 genes (\uparrow EGR1, \uparrow DUSP4, \downarrow PRKCA, \downarrow EIF4B).

Teniendo en cuenta que sólo 30 genes discriminaban entre las células RPD y CPD (Figura 84), podemos asumir que a nivel de expresión las células RPD y CPD son muy similares. Si esta afirmación es correcta, puede resultar difícil entender que en la comparación SPD frente a RPD se desregulen hasta 1565 genes cuando en la comparación SPD frente a CPD únicamente se desregulan 194 genes. Sin embargo,

cuando se analizó el comportamiento de los genes que diferenciaban SPD de RPD, de manera individualizada y en las 3 situaciones experimentales, se observó que muchos de los genes que disminuían o aumentaban significativamente en las SPD con respecto a las RPD también lo hacían al compararlo con los controles, si bien, en menor medida por lo que no se alcanzaba la significación estadística. Las gráficas de las figuras 86 y 87 ilustran claramente este hecho y la semejanza entre RPD y controles a diferencia del patrón génico de las SPD. Por tanto, al igual que ocurría con lenalidomida las células tumorales resistentes presentan un perfil génico muy parecido a las células tumorales sin tratar.

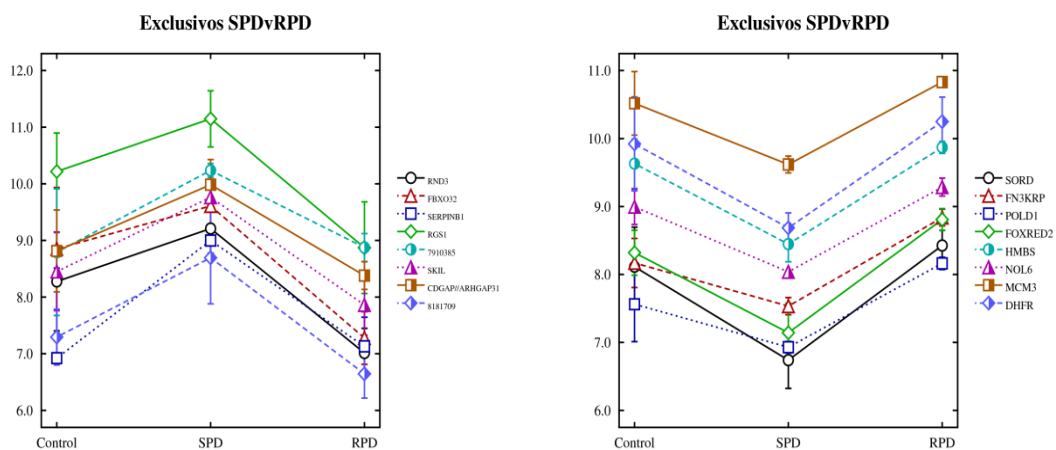


Figura 86. Genes desregulados diferencialmente entre SPD y RPD

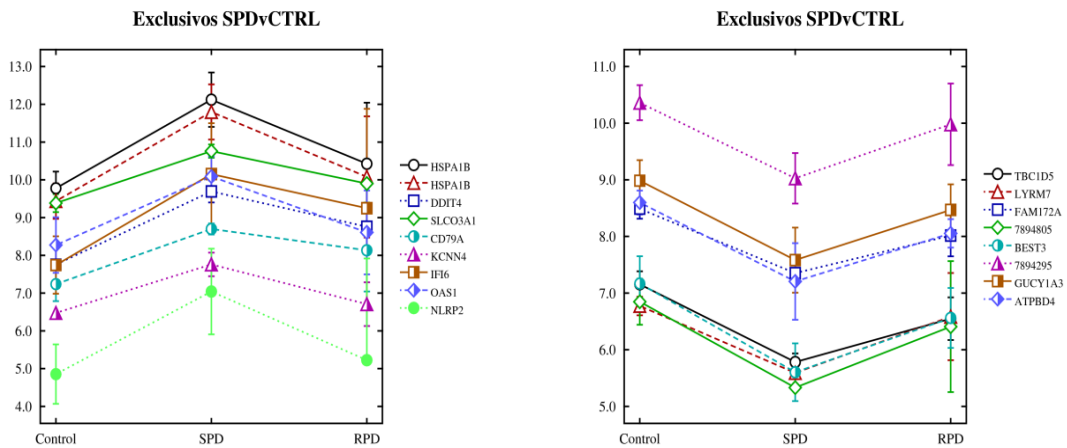


Figura 87. Genes desregulados diferencialmente entre SPD y CPD.

El análisis no supervisado mostró que, a diferencia de lo que ocurría en el caso de lenalidomida más dexametasona, había una separación nítida entre las células procedentes de SPD, RPD y CPD, como se observa en el MDS en 2D y 3D. Mediante el análisis de "clustering" jerárquico se apreció que las muestras SPD se separaban en una rama independiente de la que contenía las RPD y CPD, agrupadas a su vez en conjuntos claramente separados. Esta distribución indicaría que hay cierta similitud entre RPD y CPD respecto a SPD, como se ha demostrado anteriormente con el análisis supervisado (Figura 88).

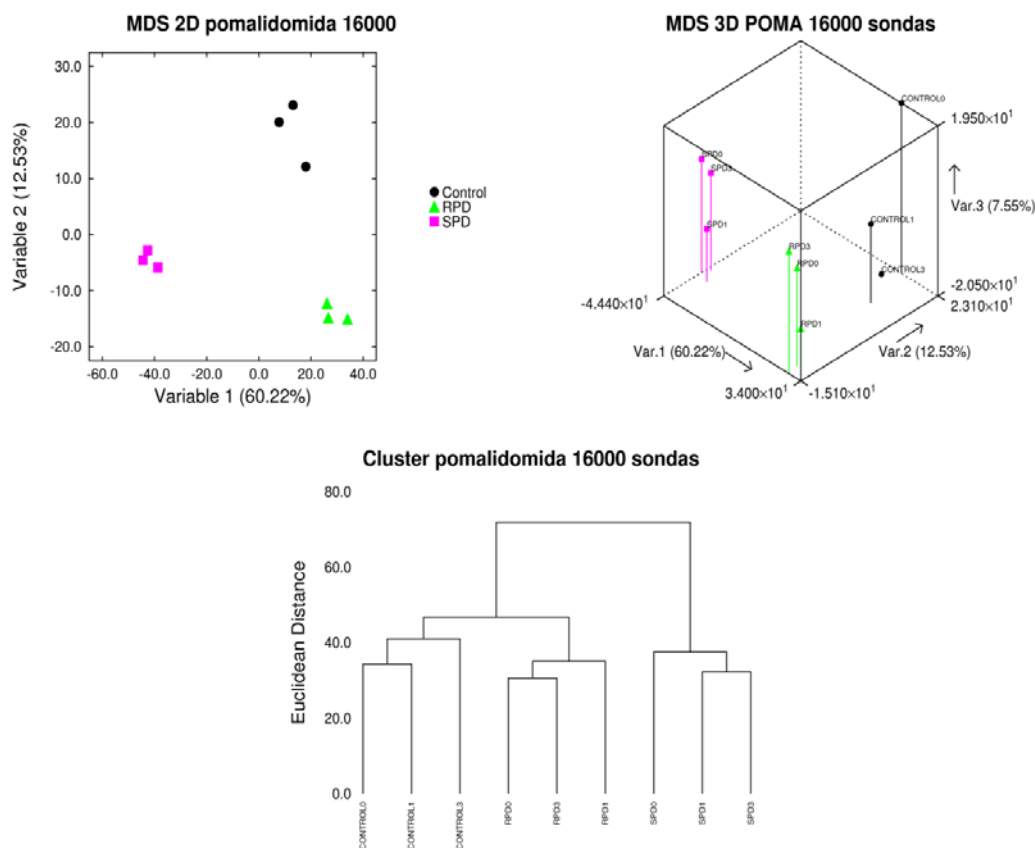


Figura 88. Análisis estadístico no supervisado de las muestras tratadas con PD.

El análisis funcional realizado mediante algoritmos de enriquecimiento génico permitió identificar los genes que estaban implicados en las funciones moleculares y celulares más relevantes, así como en rutas biológicas y en procesos de toxicidad. La mayoría de los 1565 genes que diferenciaban SPD de RPD estaban implicados en tres funciones moleculares: ciclo celular; replicación, recombinación y reparación de ADN y crecimiento y proliferación celular. La mayor parte de los 194 genes que diferenciaban SPD de CPD se agrupaban en tres funciones moleculares: desarrollo celular; señalización e interacción célula a célula; y presentación de antígenos. Por último, los 30 genes que diferenciaban RPD de CPD se agrupaban en cuatro funciones moleculares: muerte celular; señalización e interacción célula a célula; crecimiento y proliferación.

MYC (v-myc mielocitomatosis viral oncogen homolog) (F.C. -3,02) la proteína codificada por este gen desempeña un papel importante en la progresión del ciclo celular y apoptosis. Funciona como un regulador de la expresión de genes específicos de los procesos anteriormente citados. Mutaciones, sobreexpresión, reordenamiento y translocación de este gen se han asociado a tumores hematopoyéticos como leucemias y linfomas. La disminución de la expresión de MYC en las células SPD contribuiría a controlar y disminuir la progresión de las células mielomatosas. Otro gen relevante es **E2F1** (E2F factor de transcripción 1) (F.C. -3,38) que juega un papel fundamental en el ciclo celular y en la acción de proteínas supresores tumorales. Se une a la proteína del retinoblastoma pRB de una manera ciclo dependiente, la disminución de E2F1 en las células SPD facilitaría la acción supresora de pRB sobre el ciclo celular, además es capaz de inducir apoptosis de una manera dependiente o independiente de p53. TP53 (proteína tumoral 53) (F.C. -2,89) es un supresor tumoral que induce parada del ciclo celular y apoptosis en función de las circunstancias fisiológicas, pero sorprendentemente su expresión disminuía en las células SPD. Las ciclinas dependientes de quinasa **CDK2** y **CDK4** que juegan un papel importante en la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular se encuentran infraexpresadas en esta ruta (F.C. -4,22 y -4,15 respectivamente) de forma que favorecería una parada del ciclo. Existen otras ciclinas dependientes de quinasa también desreguladas en esta comparación (SPD frente a RPD), aunque no estén incluidos en esta ruta biológica, como se observa en la figura 90.

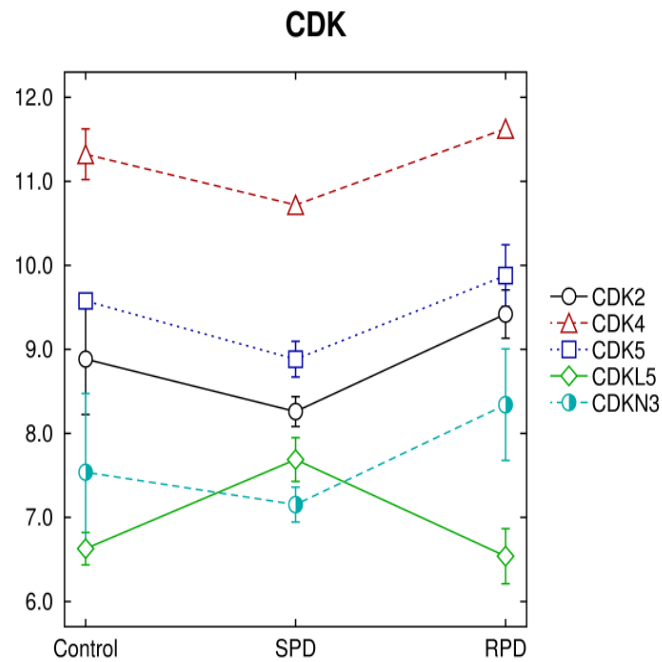


Figura 90. Ciclinas dependientes de quinasa desreguladas por tratamiento con PD.

Otros genes implicados en ciclo e infraexpresados son, entre otros: **CDC25** (división del ciclo celular 25) (F.C. -2,75), que controla la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular por medio de su unión a CDK; **CDC 45** (división del ciclo celular 45) (F.C. -5,86) que es necesario para el inicio de la replicación de ADN (Figura 91).

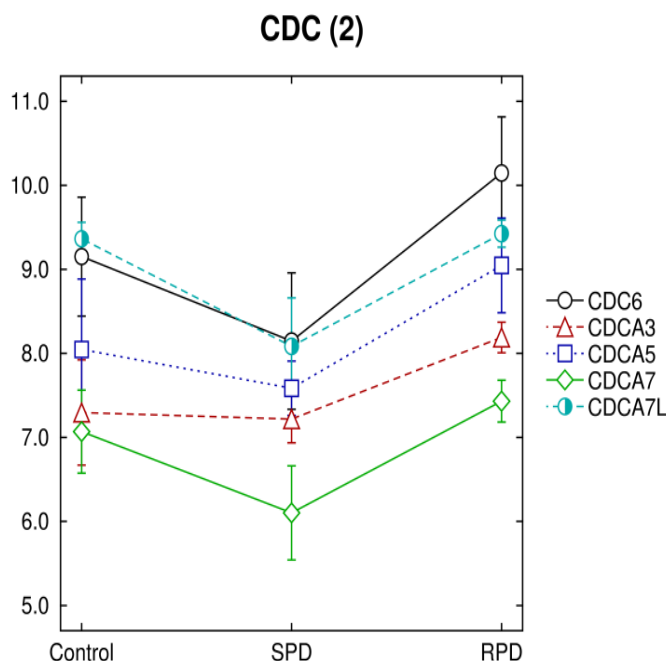


Figura 91. CDC desreguladas por tratamiento con PD.

Otro gen relevante involucrado en la ruta biológica que estamos analizando es **PCNA** (antígeno de proliferación celular) (F.C. -2,75) implicado en la reparación del ADN en respuesta al daño en él, la infraexpresión de este gen evitaría la reparación del ADN.

El análisis por medio del algoritmo Ingenuity también nos permitió profundizar en los procesos de toxicidad celular, a través de las moléculas que participan en ellos. En relación a la comparación de SPD frente a RPD destacan los siguientes procesos: 1) *Toxicidad sobre el ciclo celular* y más concretamente en la regulación de la transición de las fase G1 a S, donde participan CCNE1 (ciclina E1) (F.C. -3,88), CDK2, MYC y E2F1. Otro proceso afectado es la 2) *Señalización de p53*, con participación de AKT (v-akt viral oncogene homolog 1) (F.C.-3,92), CDK2, CDK4, CHEK2 (punto Chek 2) (F.C.-2,98), PCNA Y p53.

Por último, cuando observamos de manera individual la función de los genes expresados diferencialmente entre SPD y RPD, comprobamos que muchos de los genes se podían agrupar en función de su familia génica (mismo símbolo génico) al que pertenecían, como la familia PSM (subunidades de proteosoma) toda ella infraexpresada en SPD (ver figura 92).

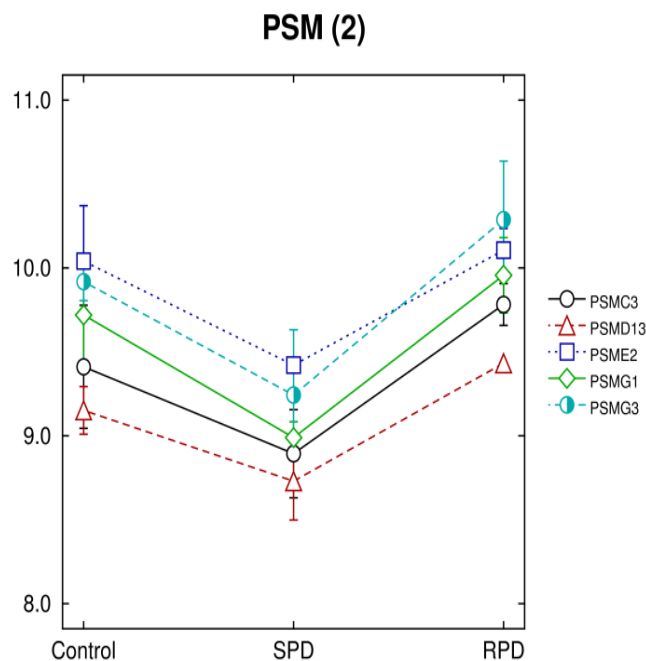


Figura 92. PSM desreguladas por tratamiento con PD.

También la familia RAB, que agrupa miembros de la familia del oncogen RAS (ver figura 93), incluye genes como RAB3A y RABEPK que están infraexpresados diferencialmente en las células SPD, mientras que los genes RAB8B y RAB30 están sobreexpresados en las SPD.

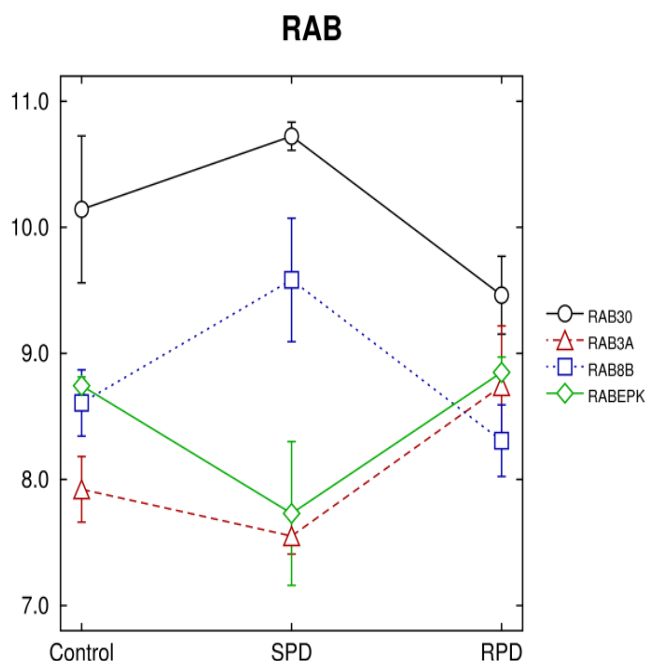


Figura 93. PSM desreguladas por tratamiento con PD.

Otro miembro de la familia de RAS, que no pertenece a la familia RAB, es RAN (F.C. -3,60), que está infraexpresado. También el gen que codifica la proteína del receptor de IGF-1 que es IGF1R (F.C.-3,56) están infraexpresado en SLD.

Finalmente, nos propusimos analizar los genes implicados en mecanismos de resistencia a fármacos, tales como MDR (multidrug resistance) o genes implicados en la permeabilidad de la célula a la droga que impedirían su penetración e incluso genes que pudieran conllevar en un rápido metabolismo del fármaco. Los resultados de este análisis no mostraron diferencia en la expresión de ninguno de estos genes entre las células de tumores sensibles y resistentes, tanto para el caso de Lenalidomida como de la Pomalidomida (Figuras 94 y 95. Estos resultados sugieren que tales mecanismos no juegan un papel relevante en la resistencia a IMiDs.

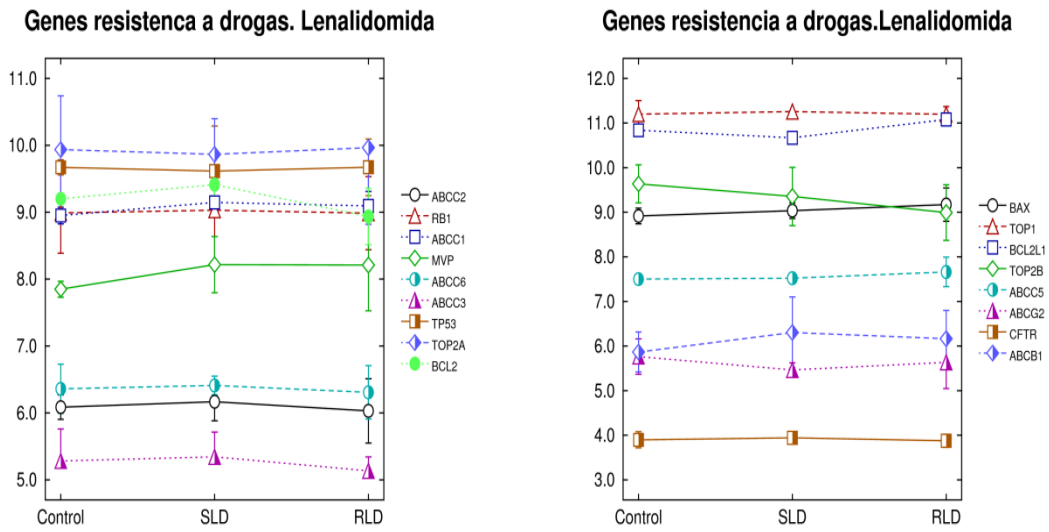


Figura 94. Genes de resistencia a LD

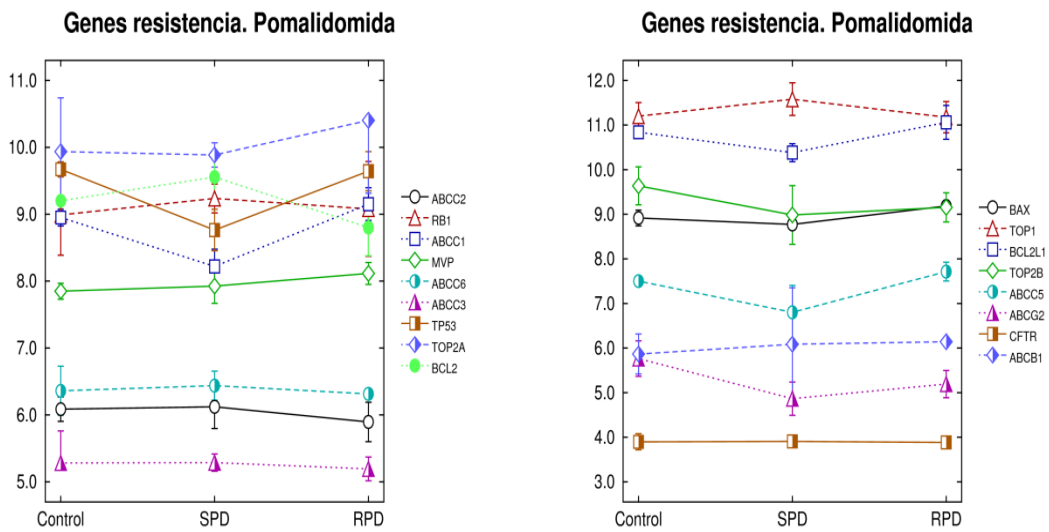


Figura 95. Genes de resistencia a PD.

Por último, tampoco se observaron diferencias a nivel de genes implicados en el metabolismo de las dos drogas (Figuras 96 y 97).

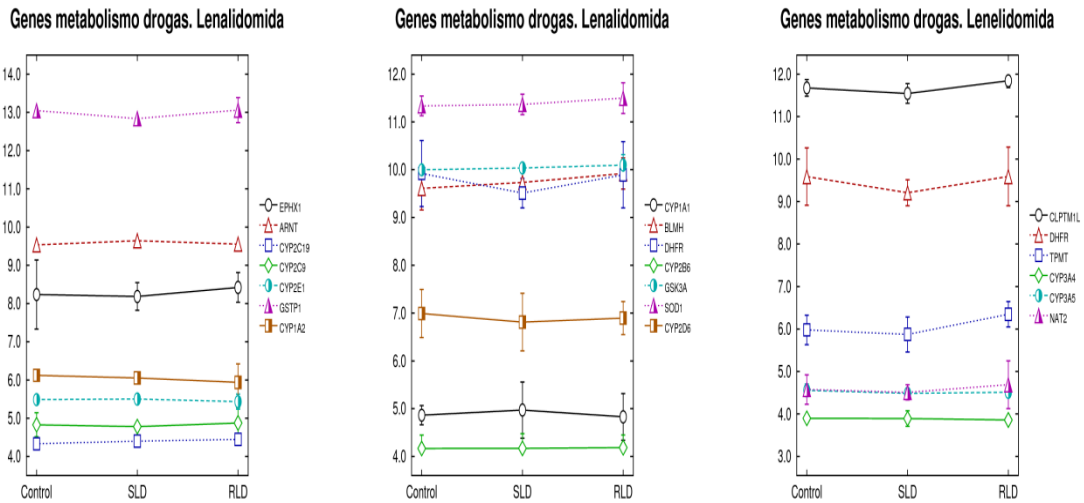


Figura 96. Genes de metabolismo a LD

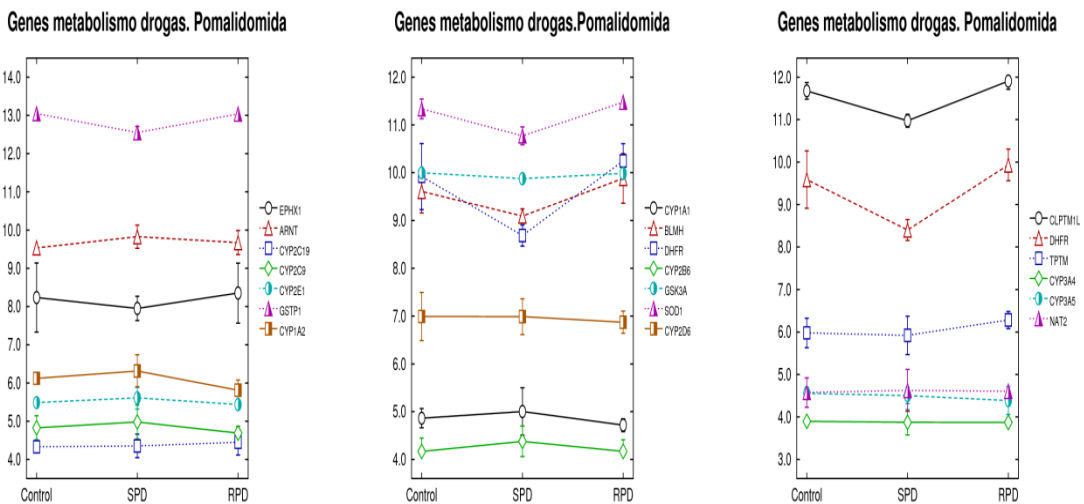


Figura 97. Genes de metabolismo a PD.

DISCUSIÓN

A pesar de los avances en el tratamiento del MM, primero con la introducción de las altas dosis de quimioterapia seguidas de trasplante autólogo a finales de los años 90, y más recientemente con el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antimieloma, (IMiDs e inhibidores de proteasoma), esta enfermedad desafortunadamente sigue siendo incurable. La razón de este hecho radica bien en la refractariedad primaria de la célula tumoral o bien en la refractariedad adquirida a los diferentes tratamientos.

Dado que los fármacos inmunomoduladores como Talidomida, Lenalidomida y Pomalidomida, son parte clave del tratamiento actual de la enfermedad, y pertenecen al mismo grupo farmacológico, nos pareció relevante investigar su eficacia, la existencia o no de resistencias cruzadas entre ellos, desarrollar modelos idóneos para estudiar este efecto y por último tratar de esclarecer posibles mecanismos involucrados en dichas resistencias. Para este estudio decidimos centrar nuestra atención en los dos fármacos inmunomoduladores más recientes: Lenalidomida y Pomalidomida.

Nuestro primer objetivo era comparar la eficacia de estos dos IMiDs en líneas celulares de MM y en células procedentes de pacientes con MM.

Nuestros resultados mostraron que la actividad antimieloma de Lenalidomida y Pomalidomida en monoterapia fue bastante discreta. Estos fármacos presentaron citotoxicidad tiempo y dosis dependiente en la línea celular MM1S, con un IC₅₀ a los 3 días de 10 μM para Lenalidomida y 1 μM para Pomalidomida; siendo el IC₅₀ a los 5 días de un logaritmo menos en ambos fármacos. Merece la pena destacar el hecho de que para ejercer citotoxicidad directa con los IMiDs son necesarios largos tiempos de

exposición (3 y 5 días), a diferencia de lo observado con otros fármacos antimieloma como Melfalan, Bortezomib, Panobinostat cuya acción es más rápida e intensa¹⁵⁶ esto es debido, entre otras cosas, a que de Lenalidomida y Pomalidomida necesitan ser metabolizadas en el hígado, para generar metabolitos activos con capacidad antimieloma¹⁵⁷⁻¹⁵⁸.

El análisis de eficacia realizado sobre líneas de MM mostró un patrón de sensibilidad similar para las dos líneas celulares MM.1, tanto en su variedad sensible a Dexametasona (MM1S) como la resistente (MM1R), mientras que el resto de líneas celulares estudiadas fueron casi completamente resistentes. De forma similar, los análisis de apoptosis en células frescas obtenidas directamente de pacientes con MM mostraron la necesidad de utilizar dosis de 100 μ M para alcanzar una apoptosis superior al 30% pero en ningún caso superó el 50%. En resumen de estos estudios puede concluirse que la eficacia “*in vitro*” de los IMIDs como agente único es limitada, requiriéndose largos tiempos de exposición, tanto en las líneas celulares, como en las células obtenidas directamente de enfermos con MM.

Sin embargo, es bien conocido el efecto sinérgico observado en pacientes de MM de los esteroides como la Dexametasona, cuando se combinan con Lenalidomida o Pomalidomida, triplicándose prácticamente la tasa de respuestas (de 25% a 65%)^{107, 115, 153, 159-160}. Por ello, analizamos comparativamente la capacidad de la Dexametasona para potenciar el efecto citotóxico de Lenalidomida y Pomalidomida, observando que al añadir Dexametasona se generaba un alto sinergismo (<1) potenciándose la eficacia de ambos IMIDs tanto en la línea MM1S como en células procedentes de pacientes con MM. El elevado sinergismo “*in vitro*”

de Lenalidomida más Dexametasona ha sido descrito por Ghandi et al ¹⁰⁷ en otras líneas de MM distintas a la línea celular MM1S. Por otro lado, hoy día son muy debatidos los “pros” y “contras” de la combinación de IMIDs más Dexametasona, ya que la misma conllevaría un mayor efecto tumoricida, pero en contrapartida la Dexametasona podría reducir, al menos en parte, la eficacia inmunomoduladora de los IMIDs ^{107, 161}. Por ello algunos grupos abogan por utilizarlos conjuntamente en las fases iniciales de la enfermedad (alta tasa tumoral) y luego dejar solo la Lenalidomida (en fase de “plateau”) para que el IMID ejerza toda su fuerza sobre la enfermedad residual ¹⁰³. Otros grupos de investigación promueven el uso de Dexametasona en dosis bajas en comparación con dosis altas de Dexametasona para combinar con Lenalidomida por los buenos resultados del ensayo clínico en fase III de Rajkumar et al. del 2010 ¹⁶².

Otro objetivo de nuestra investigación fue el estudio de la eficacia en modelo murino con plasmocitoma subcutáneo de Lenalidomida y Pomalidomida, usados bien como agentes únicos o asociados a Dexametasona. Comparando los IMIDs individualmente, Pomalidomida es más eficaz y potente que Lenalidomida aunque su dosis sea 5 veces menor.

Además, la potenciación de ambos fármacos por dexametasona que se había observado en los estudios “*in vitro*” fue también confirmada “*in vivo*” en este modelo de plasmocitoma humano en ratón inmunodeprimido en el que se observó que el esteroide fue capaz de mejorar de forma significativa la eficacia de ambos IMIDs tanto en cuanto a retraso en el crecimiento tumoral como en cuanto a supervivencia. También al comparar las combinaciones de ambos IMIDs más Dexametasona entre sí, la que lleva Pomalidomida también es más eficaz y potente.

No obstante merece la pena destacarse que el beneficio de asociar Dexametasona, en el modelo animal, parece más evidente en el caso de la Lenalidomida ya que en las curvas, el retraso del crecimiento tumoral eran muy diferentes al utilizar Lenalidomida en monoterapia frente a la combinación con Dexametasona. Por el contrario la combinación de Pomalidomida con Dexametasona, mantenía una eficacia similar a Pomalidomida en monoterapia durante los tres primeros meses del ensayo “*in vivo*”, y sólo a partir de esa fecha se observaba una ligera ventaja antimieloma en la combinación. Estos datos, añadidos a los obtenidos en los estudios “*in vitro*”, ponen de manifiesto que Lenalidomida es más dependiente de la adición de Dexametasona para llevar a cabo su acción antimieloma más que Pomalidomida. El control del retraso en el crecimiento tumoral estuvo directamente relacionado con la supervivencia de ratones tratados, las combinaciones de IMiDs más Dexametasona mejoran la supervivencia respecto a los IMiDs individualmente, especialmente en el caso de Lenalidomida, siendo la supervivencia de los ratones tratados con Pomalidomida más Dexametasona significativamente superior a la combinación de Lenalidomida más Dexametasona. Ningún de los tratamientos farmacológicos presentó toxicidad sistémica, lo que habla a favor de la buena tolerancia de estos tratamientos.

Al comparar la eficacia de ambos IMiDs (tanto en monoterapia como en combinación con Dexametasona) se observó que el patrón de sensibilidad de las diferentes líneas y células de pacientes fue similar para ambos, sugiriendo que el mecanismo de acción de estos agentes, tiene al menos una parte común. Sin embargo, en todos los experimentos “*in vitro*”, “*ex vivo*” o “*in vivo*”, Pomalidomida mostró una mayor eficacia que Lenalidomida. En concreto, en los estudios “*in*

vitro”, la IC50 fue de aproximadamente 10 veces menos para Pomalidomida y en los estudios en animales se observó que, a pesar de utilizar dosis de Pomalidomida 5 veces menor, la eficacia fue muy superior para este IMID.

También es interesante reseñar la diferencia observada entre la escasa actividad “*in vitro*” de estos fármacos (con o sin Dexametasona), requiriendo dosis muy altas y tiempos de exposición largos para ejercer su función, en comparación con la importante actividad “*in vivo*” en el modelo animal. Esto puede estar en relación con el particular mecanismo de acción de los agentes inmunomoduladores^{103, 110, 163-164}, de forma que en los estudios “*in vitro*” únicamente interviene el efecto citotóxico directo, mientras que en los estudios en animales están también jugando un papel los mecanismos antiangiogénicos¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ y los mecanismos inmunomoduladores. Estos últimos dependen en gran medida de las células NK^{116, 167} y aunque los ratones utilizados son CB17-SCID y por tanto carecen de linfocitos B y T, tienen respetadas las células NK. Esta diferencia en los mecanismos de acción “*in vitro*” e “*in vivo*” puede tener su correlación en las diferencias observadas en los estudios de cambios en el perfil de expresión génica llevados a cabo tras tratamiento con los IMIDs + Dexametasona “*in vitro*” o “*in vivo*”. En estos estudios, si nos fijamos en los genes desregulados diferencialmente por el tratamiento con Pomalidomida + Dexametasona “*in vitro*” e “*in vivo*” observamos que las funciones de los genes “*in vitro*” responden a funciones de actividad citocida directa sobre la célula mielomatosa inhibiendo su proliferación con activación de genes que aumentan la muerte celular y la apoptosis (↑BMF, ↑CASP4, ↑CLARF, ↑PARP8, ↑TXNIP, ↑ANXA4, ↑BNIP3L y ↑SMAD1) o inducción de parada en el ciclo celular (↑BTG1 y ↓CABLE1). Sin embargo, las funciones de los genes desregulados en el

modelo murino son diferentes a las “*in vitro*”, y se centran en fundamentalmente en funciones inmunomoduladoras, tales como presentación de antígenos (↑CD58), activación de monocitos y macrófagos (↑S100A10), proliferación macrófagos (↑TGFB2), migración de fagocitos (↑CTSZ, ↑ITGAV), migración de leucocitos (↑CD58, ↑CCR7) además se activa y desarrolla la función de respuesta inmune con procesos de activación y diferenciación de Th 1 (↑STAT4) y la activación de muerte celular mediada por Th (↑ICAM1). La comparación de los genes desregulados diferencialmente por el tratamiento Lenalidomida más Dexametasona “*in vitro*” e “*in vivo*”, es menos evidente debido al escaso número de genes desregulado “*in vivo*” (22 genes), aunque la actividad “*in vitro*” de Lenalidomida más Dexametasona también se basa en con activación de genes que aumentan la muerte celular y la apoptosis o inducción de parada en el ciclo celular y además de alterar alguna vía de señalización relacionada con la proliferación celular.

Mediante el marcaje multiparamétrico por citometría de flujo en células normales procedentes de pacientes en los estudios “*ex vivo*” así como en los estudios en animales, observamos la escasa toxicidad de estos fármacos, Lenalidomida y Pomalidomida, tanto sólo como en combinación con Dexametasona, sugiriendo que la actividad citotóxica era selectiva para las células tumorales, respetando las células normales.

En el MM, las células tumorales están principalmente localizadas en el micromedioambiente de la MO, donde se adhieren a las células estromales (BMSCs) y a proteínas de la matriz extracelular. Esta interacción entre las células mielomatosas y las BMSCs dispara la producción de citocinas y factores de

crecimiento como IL-6 e IGF-1, que mediante una regulación autocrina y paracrina estimulan el crecimiento y la supervivencia de la célula plasmática así como la protección contra la apoptosis inducida por los fármacos ³⁷. Nuestros resultados indican que Lenalidomida y Pomalidomida son capaces de disminuir la proliferación de la línea celular MM1S de forma dosis-dependiente en presencia de IL-6 e IGF-1, así como células estromales de médula ósea efecto que reproduce experimentos de Hideshima y que pudiera ser debido a la disminución de la producción de IL-6 y VEGF (factor de crecimiento del endotelio vacular) tal y como se describe en ^{104, 111}. Así mismo los resultados de nuestros experimentos mostraron el efecto potenciador de la Dexametasona con Lenalidomida y Pomalidomida en presencia de micromedioambiente.

En un siguiente paso se exploró la eficacia de Lenalidomida y Pomalidomida en combinación otros fármacos, tanto aprobados y usados habitualmente en clínica (Melfalán, Mafosfamida (metabolito activo de la Ciclofosfamida), Doxorubicina y Bortezomib) como en fases más precoces de investigación (Bendamustina y Panobinostat). Tanto Lenalidomida como Pomalidomida tenían un efecto sinérgico con Melfalán, Mafosfamida, Doxorubicina, Bortezomib y Bendamustina, y un efecto aditivo con Panobinostat (LBH589). Pero dado que hoy en día los IMiDs se utilizan habitualmente en combinación con corticosteroides en la clínica, quisimos dar un paso más al añadir a este “estándar” algunos de los fármacos anteriores. Los resultados revelaron una alta potencia de las combinaciones triples de Lenalidomida o Pomalidomida más Dexametasona junto con cualquiera de los fármacos antimieloma analizados anteriormente, destacando la actividad de la combinación triple de Lenalidomida o Pomalidomida con Dexametasona y Bortezomib. Esta

combinación triple se empleó para el estudio de apoptosis sobre células de paciente con MM, observándose que inducía un efecto sinérgico respecto a las combinaciones dobles. En el año 2010 Richardson et al., realizaron un estudio clínico I y II, que es la primera valoración prospectiva de Lenalidomida con Dexametasona y Bortezomib empleada en primera línea del tratamiento de MM, obteniendo unos resultados de elevada tolerabilidad y alta eficacia en MM¹⁶⁸. Estos atractivos sinergismos están propiciando su traslación a la investigación clínica debido a la buena capacidad combinatoria de los IMiDs con otros fármacos antimieloma, como ya ha sido previamente descrito¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Los estudios del mecanismo de acción de Lenalidomida y Pomalidomida, usados como agentes únicos o asociados a Dexametasona, indicaron que estas drogas afectan a diferentes vías implicadas en apoptosis. Lenalidomida y Pomalidomida en monoterapia aumentaban la fracción de células Anexina V(+) ¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ de forma dosis y tiempo dependiente, siendo necesarios tiempos largos de tratamiento de 3 y 5 días para observar el efecto apoptótico. Pomalidomida muestra un efecto ligeramente superior. De nuevo la adición de Dexametasona a dosis bajas, fue capaz de potenciar el efecto apoptótico de los IMiDs, además de provocar una pérdida del potencial mitocondrial; estos resultados concuerdan con lo publicado previamente¹⁰⁷. Pomalidomida más Dexametasona muestra una potencia ligeramente superior a Lenalidomida más Dexametasona.

En consonancia con los estudios de Mitsiades y colaboradores¹⁰⁵, vimos que los IMiDs en monoterapia indujeron procesamiento de PARP y de las caspasas 3 y 7 (efectoras), a través de la vía extrínseca de la apoptosis por la mediación de la

caspasa 8. Además también comprobamos tal y como reportan varios estudios^{105, 121} que Dexametasona ejerce su función antimieloma fundamentalmente a través de la vía intrínseca de apoptosis induciendo el procesamiento de caspasa 9. Por tanto pudimos corroborar lo descrito con anterioridad por Gandhi et al.¹⁰⁷ y Davies et al.¹⁰³ donde la combinación de IMiDs con Dexametasona, generó la activación simultánea de las vías de apoptosis (intrínseca y extrínseca), lo que conllevó la activación de la caspasa 3 y PARP a tiempos muy cortos de tratamiento. También se observó un aumento de procesamiento de caspasa 7 con la combinación en comparación con la acción de los IMiDs en monoterapia. Estos resultados nos sirvieron para confirmar el sinergismo observado en las combinaciones realizadas sobre líneas celulares, en células de pacientes con MM y en estudios con animales.

También pudimos confirmar el mecanismo apoptótico mediado por la acción de las caspasas realizando un ensayo con los inhibidores de caspasas Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK y Z-LEHD-FMK, observando rescate parcial de la apoptosis inducida por el tratamiento, lo que indica nuevamente que la apoptosis mediada por esta combinación es el resultado de la activación conjunta de la vía extrínseca (caspasa 8) e intrínseca (caspasa 9), y apoyan la utilización conjunta de IMiDs con Dexametasona^{105, 107, 161-162}.

El efecto de los inmunomoduladores sobre el ciclo celular indujo un aumento progresivo de la fase G₀/G₁ y del pico apoptótico sub-G₀, además de forma simultánea un descenso progresivo de las fases S y G₂M. Estos datos concuerdan con lo previamente descrito para Lenalidomida en monoterapia¹⁰⁹. Este efecto sobre el ciclo celular fue más acentuado en las combinaciones con Dexametasona con

respecto a los IMiDs usados como agentes individuales ¹⁰⁷. Además, realizamos análisis de western blot sobre proteínas reguladoras del ciclo celular, y se observó un aumento progresivo de p21 y p53 ¹¹⁰. De nuevo este efecto fue nuevamente más evidente en las combinaciones que en los fármacos individuales.

Con el fin de seguir profundizando en el mecanismo de acción de los IMiDs usados como agentes únicos o en combinación con Dexametasona y de encontrar nuevas vías responsables de esta resistencia, se realizaron estudios de expresión génica para conocer las alteraciones en los genes inducidas por dichos fármacos.

Los genes desregulados por el tratamiento de Pomalidomida a tiempos cortos de exposición al fármaco, 1 día de tratamiento, fueron el doble que los genes desregulados por Lenalidomida (19 y 10 genes respectivamente). Empleando tiempos más prolongados, 5 días de exposición, y con una apoptosis mayor, los genes desregulados por Pomalidomida son casi 10 veces más que los alterados por Lenalidomida (359 y 39 respectivamente), dónde se vé además que Pomalidomida además de desregular casi todos los genes de Lenalidomida, es capaz de actuar sobre muchos más genes. Estos datos ratificaron la mayor capacidad antimielomatososa de Pomalidomida comparada con Lenalidomida en monoterapia. Entre las alteraciones génicas tempranas inducidas por los IMiDs cabe destacar dos genes fundamentales: IRF-4, que se encontró infraexpresado tras tratamiento con Lenalidomida, y que es un oncogen regulador de la transcripción nucleolar que regula numerosos genes implicados en ciclo celular, muerte y otros relacionados con el aumento de la supervivencia y proliferación de las células tumorales y está considerado como una nueva diana terapéutica en MM ¹⁷¹. El aumento de expresión

de IRF-4, que es muy común en MM, se asocia a mal pronóstico y los pacientes que la presentan tienen una supervivencia significativamente peor que aquellos pacientes de MM con la expresión baja de IRF-4 ¹⁷². Nuestro estudio de expresión génica donde IRF-4 se encontró infraexpresado es coincidente con los datos aportados por el estudio de López-Girona que demostró la infraexpresión de IRF-4 en líneas celulares de MM, diferentes a la empleada por nosotros, tras tratamiento con los IMiDs. El papel relevante que IRF-4 tiene en la patogenia del MM y los efectos antitumorales que Lenalidomida ejerce a través de la disminución de la expresión de IRF-4, nos podría proporcionar un biomarcador para predecir respuestas de pacientes al tratamiento con Lenalidomida. Además, entre los genes comunes a ambos IMiDs alterados tempranamente fue también reseñable la infraexpresión de MYB, que ejerce un control sobre células hematopoyéticas y su tumorigénesis, además de jugar un papel importante en la activación de los linfocitos B maduros ¹⁷³. Los oncogenes MYB y MYC se expresan en los centroblastos del centro germinal y son frecuentemente objeto de traslocaciones cromosómicas en las enfermedades hematológicas. De hecho, la relación directa MYB-MYC se considera un elemento crucial en la transformación de tumores hematológicos ¹⁷⁴, además existen hipótesis respecto la relación cooperativa de MYB-MYC en su efecto oncogénico ¹⁷⁵. Tras 5 días de tratamiento, el gen MYB continuó estando infraexpresado en ambos fármacos mientras que el IRF-4 no se halló entre los genes deregulados por Lenalidomida. Esto indica que aunque parte de los mecanismos de los IMiDs son tiempo independientes (como la modificación de MYB), otros parece que se van modificando en función del tiempo. De hecho, tras 5 días de tratamiento y centrándonos en Pomalidomida se observaron numerosos genes y vías que no

estaban presentes a tiempos más tempranos. Entre estos encontramos genes involucrados en la patogenia del MM actuando sobre diferentes puntos clave como la activación y ejecución de procesos apoptóticos (\uparrow CASP5 \downarrow RAD51 \downarrow RRM2), la desregulación del ciclo celular con el consiguiente control de su progresión (\downarrow AURAK A \downarrow AURAK B \downarrow CDC 25 \downarrow CDC45 \downarrow CDCA2 \downarrow CCNF \downarrow CCNE1 \downarrow CCNB1 \downarrow CHEK2) y la disminución de rutas de señalización que favorecen la proliferación y supervivencia (\downarrow ETS1 \downarrow ICMA2 \uparrow RASA1). Como aspecto negativo es estos estudios se observó la sobre expresión de algunos genes que hacen a las células mielomatosas desarrollar resistencias, estos genes son DDX58 y NOTCH2 relacionados con la transducción de señales en vías de proliferación, además de genes relacionados con MDR tales como ABCA5 y ABCD2.

Al analizar la deregulación génica en las combinaciones de IMIDs más Dexametasona los estudios realizados tras 1 día de exposición al fármaco mostraron que Lenalidomida más Dexametasona deregulaba 112 genes en comparación con los 70 genes desregulados por Pomalidomida más Dexametasona. Se observa que, en este caso, el número de genes alterados es mayor en Lenalidomida más Dexametasona que en la combinación con Pomalidomida, dato que corroboraría, junto con lo anteriormente descrito en los experimentos de eficacia, que Lenalidomida es más dependiente de Dexametasona que Pomalidomida para realizar su acción antimielomatosa. Además se observa que en este caso se deregulan muchos más genes que tras el tratamiento durante 1 día con ambos fármacos en monoterapia. Estos genes adicionales presentes en la combinación serían los responsables del importante sinergismo observado entre IMIDs + Dexametasona. De los genes alterados de forma común por ambas combinaciones de IMIDs más Dexametasona

destaca, de nuevo la infraexpresión del oncogen MYB, lo que sugiere la gran importancia de este gen en el mecanismo de actuación de los IMiDs, ya que se encuentra infraexpresado con ambos fármacos, ya sea a tiempos cortos o largos de tratamiento y bien solos o en combinación con dexametasona. Además también se encontraron comúnmente deregulados, varios genes implicados en procesos de muerte celular, todos ellos sobreexpresados, BMF, CASP4, CLARF, PARP8 y TXNIP. También se desregulan genes que inhiben la proliferación celular como LGALS1 y ETS1 (sobreexpresado e infraexpresado respectivamente). Merece la pena asimismo destacar la sobreexpresión de una serie de genes todos ellos sobreexpresado que generan resistencia a drogas, como GRN asociada a quimioresistencia, y MAP3K5 implicada vía de proliferación de ERK1/2 y PTK2B activadores de la ruta de Map Kinasas, que como se ha descrito también en el presente trabajo parece tener gran importancia en los mecanismos de resistencia a IMiDs + Dexametasona. De los genes desregulados exclusivamente por Lenalidomida más Dexametasona destacó de nuevo la infraexpresión de IRF4, al igual que en Lenalidomida en monoterapia, y también la infraexpresión de 8 genes implicados en ciclo celular, lo que daría lugar a una parada en el ciclo celular y los genes implicados en vías proliferativas (TIPIN y MAPK6), con la consiguiente disminución de la proliferación. Los genes desregulados en exclusiva por Pomalidomida más Dexametasona favorecen los procesos de muerte celular (\uparrow ANXA4 \uparrow BNIP3L \uparrow SMAD1) y la parada de ciclo celular (\uparrow BTG1 \downarrow CABLE1). Además en ambos casos existen genes que favorecen la resistencia farmacológica mediada por diferentes mecanismos celulares como son: MRD (\uparrow ABCB9 exclusivo de Lenalidomida más Dexametasona), la inactivación del fármaco por vías

metabólicas (\uparrow GSTM2 exclusivo de Lenalidomida más Dexametasona) y la señalización intracelular mediante rutas relacionadas con la proliferación celular (\uparrow STAT2 exclusivo de Lenalidomida más Dexametasona y \uparrow IGF-1 \uparrow STAT3 exclusivos de Pomalidomida más Dexametasona).

La segunda parte de la tesis se dedicó al análisis de las resistencias adquiridas a las combinaciones de IMiDs + Dexametasona en el modelo de plasmocitoma humano. El MM es actualmente considerado una enfermedad incurable con los tratamientos convencionales y, en el momento actual, parece que solo el trasplante alogénico ¹⁷⁶⁻¹⁷⁷ y quizá algunos tratamientos farmacológicos muy agresivos en pacientes jóvenes ¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ son capaces de erradicar de forma definitiva el clon tumoral. En concreto, el tratamiento con Lenalidomida y Dexametasona consigue respuestas en un alto porcentaje de casos (60 % ORR) ²⁰⁻²¹, pero, sin embargo, a pesar de ser un tratamiento continuado hasta la progresión de la enfermedad todos los pacientes eventualmente progresan o recaen bajo tratamiento indicando la aparición de resistencias adquiridas a este tratamiento. Esta situación es la que hemos reproducido en nuestro modelo de plasmocitoma, en el que se observa un periodo de sensibilidad inicial al tratamiento con ambas combinaciones durante el que se controla o incluso disminuye el tamaño del tumor inicial. Sin embargo, en todos los casos, tras este periodo de sensibilidad que dura aproximadamente 30 días, los tumores empiezan a crecer a pesar de seguir siendo tratados con los fármacos en estudio, siendo la velocidad de crecimiento tumoral similar a la de los tumores no tratados.

Una vez estandarizado el modelo de resistencias adquiridas a fármacos antimieloma, específicamente, en este caso a fármacos inmunomoduladores se evaluaron las características biológicas de estas resistencias, observando en primer

lugar la reversibilidad de la misma, tras un periodo de lavado sin el fármaco causante de la resistencia. Esta reversibilidad fue demostrada no solo en el modelo “*in vivo*”, en el que el periodo de lavado estuvo representado por el tratamiento con el agente inmunomodulador alternativo, sino también “*ex vivo*” tras dejar las células resistentes en cultivo con medio sin la adición de fármacos. A pesar de las limitaciones inherentes a los modelos preclínicos, que no siempre reflejan la realidad clínica, en este modelo hemos observado que tumores que eran completamente resistentes a los fármacos y que siguieron siendo tratados durante 30-50 días con dichos tratamientos a pesar de ser resistentes a los mismos, tras un periodo de lavado de 30-40 días recobraron completamente la sensibilidad inicial a esas combinaciones. Una publicación reciente sugiere que, aproximadamente un 25% de los pacientes que progresaron previamente tras tratamiento con lenalidomida y fueron tratados posteriormente de nuevo con este fármaco alcanzaron una respuesta, mientras que esta situación no se produjo en el caso de talidomida ¹⁸⁰. Sin embargo, en este trabajo el número de pacientes estudiados retrospectivamente es muy limitado y además no se especifica el tiempo ni las líneas intermedias entre ambos tratamientos. Nuestro hallazgo apoyaría la factibilidad de un retratamiento con un mismo agente inmunomodulador (con o sin Dexametasona) tras la aparición de resistencia al mismo. Esto se traduciría clínicamente en suspender el tratamiento con fármacos inmunomoduladores en cuanto aparezcan las primeras evidencias de progresión biológica y mantener al paciente sin tratamiento durante un tiempo para volver posteriormente a reintroducir el mismo tratamiento, asumiendo que las células habrán recuperado la sensibilidad al mismo. Aunque esta hipótesis no puede ser probada en el contexto de recaídas sintomáticas que requieran tratamiento urgente o

pronto, sí se podría comprobar en el caso de recaídas o progresiones asintomáticas tanto en pacientes con MM inicialmente sintomáticos como en MM quiescentes de nuevo diagnóstico.

Otra cuestión clave en la práctica clínica dada las opciones limitadas de tratamiento actualmente disponibles, es si los fármacos de una misma familia presentan o no resistencias cruzadas entre sí. En nuestro trabajo hemos también intentado aportar algo de luz a esta cuestión. En la misma publicación referida previamente, se indica que de 4 pacientes previamente resistentes a enalidomida que fueron tratados con Talidomida, 1 de ellos respondió, mientras que, por el contrario, de 8 pacientes que habían progresado bajo Talidomida, el tratamiento con Lenalidomida indujo un 50% de respuestas ¹⁸⁰. Esto estaría sugiriendo que Lenalidomida es capaz de rescatar la resistencia adquirida a Talidomida, pero la situación opuesta no es tan clara. Además, de nuevo nos encontramos con los inconvenientes mencionados en el párrafo anterior del escaso número de pacientes y de la ausencia de información sobre tiempo y líneas de tratamiento previas. En nuestro caso, el estudio preclínico realizado, no se ha centrado en Talidomida y Lenalidomida (los dos fármacos inmunomoduladores más frecuentemente utilizados en la clínica), sino en Lenalidomida y Pomalidomida que son los que parecen ser más prometedores en el escenario clínico actual.

Nuestros resultados sugieren que Lenalidomida y Pomalidomida en combinación con Dexametasona no presentan resistencias cruzadas entre sí, ya que ambos son capaces de revertir la resistencia al fármaco alternativo. Además esta reversión es inmediata, es decir, sin el periodo de lavado al que nos hemos referido en el apartado anterior, lo que confirma que se trata de una ausencia real de

resistencia cruzada. Podría aducirse que se trata de un efecto dependiente de la dosis o de la potencia de los fármacos, pero esto solo sería válido si uno de los fármacos revirtiese la resistencia al otro pero no al revés, y, en nuestro caso, ambos fármacos son igualmente eficaces en este aspecto. Ya hemos mencionado que el hecho de que los patrones de sensibilidad de las diferentes líneas celulares y células de pacientes a dichos fármacos sean similares, así como los genes comunes deregulados en el perfil de expresión génica (ie MYB), sugieren que, como es obvio, presentan un mecanismo de actuación común. Sin embargo, existen también otros datos que apuntan a un diferente mecanismo de actuación y no sólo a diferencias en la potencia. Estos datos son la mayor dependencia de Dexametasona por parte de la Lenalidomida, las diferencias en el perfil de expresión génica y, por último y de forma más clara, la ausencia de resistencias cruzadas.

Al estudiar los mecanismos responsables de la aparición de resistencias adquiridas a estos fármacos, descubrimos la sobreexpresión de pERK 1/2 y de las proteínas por encima en esta misma vía (MEK, RAS, RAF) como un mecanismo bastante específico de Pomalidomida + Dexametasona y no tanto de Lenalidomida + Dexametasona. Este dato tiene su correlación en los estudios génicos, ya que el gen MAP3K5 se encuentra sobreexpresado en los momentos iniciales tras el tratamiento con ambas combinaciones, lo que podría estar indicando un mecanismo inicial de generación de esta resistencia. Esta vía está muy relacionada con la respuesta/resistencia a varios fármacos antimieloma; así, el tratamiento con Bortezomib está descrito que disminuye los niveles de pERK en líneas celulares de MM¹⁸, mientras que la sobreexpresión de la vía de MAPK/MEK/ERK es bien

conocida como un mecanismo de resistencia a diferentes fármacos en MM como al inhibidor de AKT perifosina ¹⁸¹.

La importancia de la vía de MAPK/MEK/ERK en la acción de los IMIDs + dexametasona fue corroborada por el experimento de combinación de estos fármacos con un inhibidor de MEK, que mostró elevado sinergismo, aunque de nuevo la potencia de la combinación fue superior en el caso de Pomalidomida. Estos experimentos pueden representar la base para el diseño de nuevas estrategias de combinación de los IMIDs en el tratamiento del mieloma múltiple con el fin de aumentar la eficacia de estos fármacos o de disminuir o retrasar la aparición de resistencias.

Dado que ambos IMIDs no presentan resistencias cruzadas, deben existir además otros mecanismos que expliquen la resistencia específica para Lenalidomida + Dexametasona o para Pomalidomida + Dexametasona. Con el fin de buscar algunos de los mecanismos específicos de estas combinaciones se analizaron los cambios en el perfil de expresión génica de las células resistentes a IMIDs + Dexametasona y en comparación a células control y células sensibles bajo tratamiento. En estas comparaciones se observó, como ya se había evidenciado en estudios previos que las combinaciones que incluyeron Pomalidomida deregularon un número de genes significativamente superior a las de Lenalidomida, en todas las posibles combinaciones efectuadas. Esto hace que los genes deregulados por ambos tratamientos o tras la aparición de resistencias a ambos tratamientos no sea comparable por el escaso número de genes afectados en los experimentos con Lenalidomida. Quizá el dato más relevante es que, en ambos casos, el tratamiento con las combinaciones de IMIDs + dexametasona deregularon un cierto número de

genes como ya se ha señalado, pero que, sin embargo, cuando esas células desarrollaron resistencia a los tratamientos, la mayoría de dichos genes volvieron a su situación basal, sugiriendo, como una posibilidad, que los fármacos, en el momento de las resistencias, no eson capaces de inducir los cambios terapéuticos en las células tumorales. Esto nos hizo proponer la posibilidad de que una sobreexpresión de los genes de resistencia a fármacos pudiera estar detrás de esta resistencia. Sin embargo, comprobamos que estos mecanismos (MDR o genes implicados en la permeabilidad de la célula o genes que pudieran conllevar en un rápido metabolismo del fármaco) no mostraban ninguna diferencia en la expresión entre las células de tumores sensibles y resistentes, tanto para el caso de Lenalidomida como de la Pomalidomida lo que sugiere que tales mecanismos no juegan un papel relevante en la resistencia a IMiDs.

En el momento actual estamos profundizando en el estudio de los mecanismos asociados a la aparición de resistencias adquiridas a estos fármacos con el objeto de poder profundizar en las vías de actuación de estos fármacos en el mieloma múltiple y además poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas representadas bien como combinaciones racionales de diferentes fármacos o como tratamientos secuenciales que permitan retrasar o impedir la aparición de resistencias a estos y otros tratamientos y, como objetivo final, mejorar la supervivencia de los pacientes con MM.

CONCLUSIONES

1- Los fármacos inmunomoduladores, Lenalidomida y Pomalidomida, en monoterapia presentan actividad antimieloma “*in vitro*” tanto en la línea celular MM1S como en células procedentes de pacientes con MM, siendo necesarios largos tiempos de exposición (3 y 5 días) para ver este efecto. La adición de Dexametasona potenció de forma importante la actividad de ambos fármacos observando un alto sinergismo en ambas combinaciones. Además se observó que Pomalidomida mostró una eficacia 10 veces superior que Lenalidomida.

2- Los estudios de la eficacia “*in vivo*” de estos dos IMiDs en un modelo murino de plasmocitoma humano, usados bien como agentes únicos o asociados a Dexametasona, confirmaron la eficacia de dichos tratamientos tanto en términos de disminución del crecimiento tumoral como de aumento de supervivencia. Pomalidomida fue de nuevo más eficaz y potente que Lenalidomida tanto en monoterapia como en combinación con Dexametasona. Esta actividad fue claramente superior a la observada en los estudios “*in vitro*”, poniendo en evidencia, posiblemente la acción del efecto inmunomodulador de estos fármacos en el modelo animal.

3- Los estudios del mecanismo de acción de Lenalidomida y Pomalidomida, usados como agentes únicos o asociados a Dexametasona, indicaron que estas drogas inducen tanto apoptosis como a una parada de las células en fase G₀/G₁ del ciclo celular.

4- El estudio de los cambios inducidos en el perfil de expresión génica de células mielomatosas tras el tratamiento con dichos fármacos mostró que Pomalidomida desregula un número de genes sensiblemente superior a Lenalidomida. Además, la adición de Dexametasona incrementó de forma importante la deregulación génica, lo

que sugiere una base molecular del elevado sinergismo observado. Es interesante reseñar que la infraexpresión del oncogen MYB se encuentra comúnmente deregulado a con ambos fármacos tanto en monoterapia como en combinación con Dexametasona.

5- Ambos IMIDs con o sin Dexametasona potenciaron al actividad antimieloma de fármacos convencionales como Doxorubicina, Melfalán, Mafosfamida o Bortezomib y de fármacos experimentales como Bendamustina, Carfilzomib o Panobinostat. Resultó especialmente atractiva la combinación de IMIDs + Dexametasona + inhibidores de proteasoma (Bortezomib o Carfilzomib).

6- El tratamiento continuado de ratones con un plasmocitoma humano subcutáneo con Lenalidomida o Pomalidomida en combinación con Dexametasona induce la aparición de resistencias a dichos tratamientos tras un periodo de sensibilidad inicial.

7- En cuanto a las características de la resistencia generada no se observan resistencias cruzadas entre Lenalidomida y Pomalidomida en combinación con Dexametasona, ya que ambos IMIDs son capaces de vencer la resistencia generada a la combinación alternativa. Además, dichas resistencias son reversibles tras un periodo de lavado sin recibir el tratamiento frente al que se ha generado la resistencia.

8- La vía de MEK/ERK está implicada en la sensibilidad a ambas combinaciones de IMIDs con Dexametasona, ya que se produce un importante descenso de la actividad de dicha ruta en las células sensibles bajo tratamiento. Además, la generación de resistencias adquiridas a la combinación de Pomalidomida + Dexametasona, se asocia a

una importante sobre-expresión de los diferentes componentes de esta vía en las células resistentes.

9- Con respecto a la deregulación génica, el tratamiento “*in vivo*” con ambas combinaciones indujo una importante deregulación de genes que fue muy superior para la combinación con Pomalidomida que para la que incluyó Lenalidomida. Sin embargo, la mayoría de dichos genes volvieron a una situación basal cuando las células se volvieron resistentes a dichas combinaciones.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* Feb 1997;11(1):111-131.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* Oct 28 2004;351(18):1860-1873.
3. San Miguel JF, Blade J. Multiple Myeloma. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, eds. *Postgraduate Haematology*. Sixth ed. London: Wiley-Blackwell; 2010:578-598.
4. Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet.* Mar 13 2004;363(9412):875-887.
5. Blade J, Kyle RA. Multiple myeloma in young patients: clinical presentation and treatment approach. *Leuk Lymphoma.* Aug 1998;30(5-6):493-501.
6. Bergsagel DE. The role of chemotherapy in the treatment of multiple myeloma. *Baillieres Clin Haematol.* Dec 1995;8(4):783-794.
7. Alexanian R, Dimopoulos MA. Management of multiple myeloma. *Semin Hematol.* Jan 1995;32(1):20-30.
8. San Miguel JF, Blade Creixenti J, Garcia-Sanz R. Treatment of multiple myeloma. *Haematologica.* Jan 1999;84(1):36-58.
9. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med.* Jul 11 1996;335(2):91-97.
10. Blade J, Rosinol L, Sureda A, et al. High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood.* Dec 1 2005;106(12):3755-3759.
11. Boccadoro M, Marmont F, Tribalto M, et al. Multiple myeloma: VMCP/VBAP alternating combination chemotherapy is not superior to melphalan and prednisone even in high-risk patients. *J Clin Oncol.* Mar 1991;9(3):444-448.
12. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* May 8 2003;348(19):1875-1883.
13. Lenhoff S, Hjorth M, Holmberg E, et al. Impact on survival of high-dose therapy with autologous stem cell support in patients younger than 60 years with newly diagnosed multiple myeloma: a population-based study. Nordic Myeloma Study Group. *Blood.* Jan 1 2000;95(1):7-11.
14. Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT, et al. Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood.* Nov 15 2004;104(10):3052-3057.
15. Barlogie B, Desikan R, Eddlemon P, et al. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood.* Jul 15 2001;98(2):492-494.
16. Davies FE, Raje N, Hideshima T, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* Jul 1 2001;98(1):210-216.

17. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. Nov 18 1999;341(21):1565-1571.
18. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. Apr 1 2001;61(7):3071-3076.
19. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. Jun 26 2003;348(26):2609-2617.
20. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. Nov 22 2007;357(21):2123-2132.
21. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med*. Nov 22 2007;357(21):2133-2142.
22. Facon T, Mary JY, Hulin C, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. Oct 6 2007;370(9594):1209-1218.
23. Garban F, Attal M, Michallet M, et al. Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. *Blood*. May 1 2006;107(9):3474-3480.
24. Bakkus MH. Ig gene sequences in the study of clonality. *Pathol Biol (Paris)*. Feb 1999;47(2):128-147.
25. Stevenson FK, Sahota SS. B cell maturation in relation to multiple myeloma. *Pathol Biol (Paris)*. Feb 1999;47(2):89-97.
26. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. Aug 1 2004;104(3):607-618.
27. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. Mar 2002;2(3):175-187.
28. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. Nov 15 2001;98(10):3082-3086.
29. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 4 2000;97(1):228-233.
30. Portier M, Moles JP, Mazars GR, et al. p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene*. Dec 1992;7(12):2539-2543.
31. Gupta D, Hideshima T, Anderson KC. Novel biologically based therapeutic strategies in myeloma. *Rev Clin Exp Hematol*. Sep 2002;6(3):301-324.
32. Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Semin Oncol*. Dec 2001;28(6):607-612.
33. Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treat Rev*. May 2003;29 Suppl 1:11-19.
34. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol*. Nov 2000;12(6):557-563.
35. Parmo-Cabanas M, Molina-Ortiz I, Matias-Roman S, et al. Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *J Pathol*. Jan 2006;208(1):108-118.

36. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. Dec 15 1993;82(12):3712-3720.
37. Anderson KC. Moving disease biology from the lab to the clinic. *Cancer*. Feb 1 2003;97(3 Suppl):796-801.
38. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. Jan 1999;10(1):105-115.
39. Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*. Dec 1999;29(12):3945-3950.
40. Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*. Jul 1 2002;100(1):194-199.
41. Zhang B, Gojo I, Fenton RG. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*. Mar 15 2002;99(6):1885-1893.
42. Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, et al. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol*. Jun 15 2001;166(12):7486-7495.
43. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, et al. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*. Sep 13 2001;20(41):5799-5809.
44. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*. Aug 22 2002;21(37):5673-5683.
45. Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood*. Oct 15 2000;96(8):2856-2861.
46. Georgii-Hemming P, Wiklund HJ, Ljunggren O, Nilsson K. Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood*. Sep 15 1996;88(6):2250-2258.
47. Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*. Jun 1 2002;99(11):4138-4146.
48. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*. Mar 2004;5(3):221-230.
49. Standal T, Borset M, Lenhoff S, et al. Serum insulinlike growth factor is not elevated in patients with multiple myeloma but is still a prognostic factor. *Blood*. Dec 1 2002;100(12):3925-3929.
50. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*. Jul 27 2001;20(33):4519-4527.
51. Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. Feb 1997;11(1):27-42.

52. Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*. Jul 15 2001;98(2):428-435.
53. Moller C, Stromberg T, Juremalm M, Nilsson K, Nilsson G. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia*. Jan 2003;17(1):203-210.
54. Turesson I, Abildgaard N, Ahlgren T, et al. Prognostic evaluation in multiple myeloma: an analysis of the impact of new prognostic factors. *Br J Haematol*. Sep 1999;106(4):1005-1012.
55. Kyle RA. Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cells*. Aug 1995;13 Suppl 2:56-63.
56. Blade J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol*. May 1996;93(2):345-351.
57. San Miguel JF, Garcia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):569-583.
58. Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. Sep 1 1996;88(5):1780-1787.
59. Schambeck CM, Bartl R, Hochtlen-Vollmar W, Wick M, Lamerz R, Fateh-Moghadam A. Characterization of myeloma cells by means of labeling index, bone marrow histology, and serum beta 2-microglobulin. *Am J Clin Pathol*. Jul 1996;106(1):64-68.
60. Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW, et al. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. Aug 1999;113(1):73-77.
61. Piccinini L, Artusi T, Bonacorsi G, Arigliano V. Acute leukemia of plasmablastic type as terminal phase of multiple myeloma. *Haematologica*. Feb 2002;87(2):EIM04.
62. Lee CK, Ma ES, Shek TW, et al. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol*. Jul 2003;34(7):710-714.
63. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, et al. Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood*. Apr 1 1998;91(7):2501-2507.
64. Pich A, Chiusa L, Marmont F, Navone R. Risk groups of myeloma patients by histologic pattern and proliferative activity. *Am J Surg Pathol*. Mar 1997;21(3):339-347.
65. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M, et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood*. Jan 15 1995;85(2):448-455.
66. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*. Jun 15 1993;81(12):3382-3387.
67. Garcia-Sanz R, Gonzalez-Fraile MI, Mateo G, et al. Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer*. Dec 10 2004;112(5):884-889.
68. Fabian P, Kren L, Nenutil R. [Determination proliferative activity of myeloma cells in histologic material]. *Cesk Patol*. Apr 2004;40(2):46-49.

69. Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA, Greipp PR, Kyle RA, Litzow MR. Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant*. Feb 1997;19(4):337-342.
70. Kumar S, Rajkumar SV, Greipp PR, Witzig TE. Cell proliferation of myeloma plasma cells: comparison of the blood and marrow compartments. *Am J Hematol*. Sep 2004;77(1):7-11.
71. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. Oct 1 2005;106(7):2276-2279.
72. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. Oct 1 1998;92(7):2322-2333.
73. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. Apr 5 2001;344(14):1038-1042.
74. Gutierrez NC, Hernandez JM, Garcia JL, et al. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica*. Nov 2000;85(11):1146-1152.
75. Lai JL, Zandecki M, Mary JY, et al. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood*. May 1 1995;85(9):2490-2497.
76. Gutierrez NC, Garcia JL, Hernandez JM, et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. Nov 1 2004;104(9):2661-2666.
77. Gutierrez NC, Garcia-Sanz R, San Miguel JF. Molecular biology of myeloma. *Clin Transl Oncol*. Oct 2007;9(10):618-624.
78. Ortega MM, Melo MB, De Souza CA, Lorand-Metze I, Costa FF, Lima CS. A possible role of the P53 gene deletion as a prognostic factor in multiple myeloma. *Ann Hematol*. Jul 2003;82(7):405-409.
79. Pantou D, Rizou H, Tsarouha H, et al. Cytogenetic manifestations of multiple myeloma heterogeneity. *Genes Chromosomes Cancer*. Jan 2005;42(1):44-57.
80. Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabertero MD, et al. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood*. May 1 1998;91(9):3366-3371.
81. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. Feb 2003;17(2):427-436.
82. Fassas AB, Spencer T, Sawyer J, et al. Both hypodiploidy and deletion of chromosome 13 independently confer poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Haematol*. Sep 2002;118(4):1041-1047.
83. Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, et al. Prognostic implications of DNA aneuploidy in 156 untreated multiple myeloma patients. Castelano-Leones (Spain) Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol*. May 1995;90(1):106-112.

84. Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. Sep 1 2002;100(5):1579-1583.
85. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*. Oct 15 2005;106(8):2837-2840.
86. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. Jun 1 2003;101(11):4569-4575.
87. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. Jul 15 1996;88(2):674-681.
88. Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:248-278.
89. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, et al. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood*. Jun 15 2000;95(12):4008-4010.
90. Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J, et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood*. May 15 2003;101(10):3849-3856.
91. Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. Mar 15 2000;95(6):1925-1930.
92. Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*. Aug 1 1998;92(3):802-809.
93. Liu P, Leong T, Quam L, et al. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood*. Oct 1 1996;88(7):2699-2706.
94. Omede P, Boccadoro M, Fusaro A, Gallone G, Pileri A. Multiple myeloma: 'early' plasma cell phenotype identifies patients with aggressive biological and clinical characteristics. *Br J Haematol*. Nov 1993;85(3):504-513.
95. Paiva B, Almeida J, Perez-Andres M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. Jul 2010;78(4):239-252.
96. Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, et al. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*. Oct 15 1994;84(8):2597-2603.
97. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Puthier D, et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res*. Aug 15 1995;55(16):3647-3653.
98. Robillard N, Jego G, Pellat-Deceunynck C, et al. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. Jun 1998;4(6):1521-1526.

99. Rajkumar SV, Witzig TE. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev.* Oct 2000;26(5):351-362.
100. D'Amato RJ, Lentzsch S, Anderson KC, Rogers MS. Mechanism of action of thalidomide and 3-aminothalidomide in multiple myeloma. *Semin Oncol.* Dec 2001;28(6):597-601.
101. Peuckmann V, Fisch M, Bruera E. Potential novel uses of thalidomide: focus on palliative care. *Drugs.* Aug 2000;60(2):273-292.
102. Raje N, Anderson K. Thalidomide--a revival story. *N Engl J Med.* Nov 18 1999;341(21):1606-1609.
103. Davies F, Baz R. Lenalidomide mode of action: linking bench and clinical findings. *Blood Rev.* Nov 2010;24 Suppl 1:S13-19.
104. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood.* Nov 1 2000;96(9):2943-2950.
105. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood.* Jun 15 2002;99(12):4525-4530.
106. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood.* Nov 1 2002;100(9):3063-3067.
107. Gandhi AK, Kang J, Capone L, et al. Dexamethasone synergizes with lenalidomide to inhibit multiple myeloma tumor growth, but reduces lenalidomide-induced immunomodulation of T and NK cell function. *Curr Cancer Drug Targets.* Mar 1 2010;10(2):155-167.
108. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene.* Sep 20 2001;20(42):5991-6000.
109. Verhelle D, Corral LG, Wong K, et al. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. *Cancer Res.* Jan 15 2007;67(2):746-755.
110. Escoubet-Lozach L, Lin IL, Jensen-Pergakes K, et al. Pomalidomide and lenalidomide induce p21 WAF-1 expression in both lymphoma and multiple myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism. *Cancer Res.* Sep 15 2009;69(18):7347-7356.
111. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia.* Dec 2001;15(12):1950-1961.
112. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8+ T cells "in vitro". *J Infect Dis.* Mar 15 2003;187(6):946-955.
113. Wu L, Adams M, Carter T, et al. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res.* Jul 15 2008;14(14):4650-4657.
114. Chang DH, Liu N, Klimek V, et al. Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood.* Jul 15 2006;108(2):618-621.
115. Wang M, Dimopoulos MA, Chen C, et al. Lenalidomide plus dexamethasone is more effective than dexamethasone alone in patients with relapsed or refractory

- multiple myeloma regardless of prior thalidomide exposure. *Blood*. Dec 1 2008;112(12):4445-4451.
116. Kotla V, Goel S, Nischal S, et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2009;2:36.
 117. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. Aug 15 1992;80(4):887-890.
 118. Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. High-dose glucocorticoid treatment of resistant myeloma. *Ann Intern Med*. Jul 1986;105(1):8-11.
 119. Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, et al. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene*. Feb 21 2002;21(9):1346-1358.
 120. Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J Biol Chem*. Jul 6 2001;276(27):24453-24456.
 121. Chauhan D, Anderson KC. Apoptosis in multiple myeloma: therapeutic implications. *Apoptosis*. Feb-Apr 2001;6(1-2):47-55.
 122. Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, et al. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem*. Sep 8 2000;275(36):27845-27850.
 123. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. Dec 2002;2(12):927-937.
 124. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, et al. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*. Jun 1 2002;99(11):4079-4086.
 125. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. May 10 2002;277(19):16639-16647.
 126. Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J*. Mar-Apr 2011;17(2):89-95.
 127. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. Jul 2001;42(7):1007-1017.
 128. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. Jan 2002;2(1):48-58.
 129. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*. Oct 2000;11(4):265-283.
 130. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in enzyme regulation*. 2006;46:249-279.
 131. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*. Apr 2008;22(4):686-707.
 132. McCubrey JA, Abrams SL, Ligresti G, et al. Involvement of p53 and Raf/MEK/ERK pathways in hematopoietic drug resistance. *Leukemia*. Nov 2008;22(11):2080-2090.

133. Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viornerly A, et al. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *Br J Cancer*. Jun 2 2003;88(11):1793-1799.
134. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer*. Jun 2009;16(2):363-380.
135. Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res*. Sep 1 2002;62(17):4899-4902.
136. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. Dec 16 1983;65(1-2):55-63.
137. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. Apr 1 1992;148(7):2207-2216.
138. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. October 1, 1995 1995;9(13):1277-1287.
139. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. Sep 1 1994;84(5):1415-1420.
140. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. Jul 17 1995;184(1):39-51.
141. Steensma DP, Timm M, Witzig TE. Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol Med*. 2003;85:323-332.
142. Ormerod MG. The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia*. Jul 1998;12(7):1013-1025.
143. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. Nov 28 1997;91(5):627-637.
144. Chen Q, Takeyama N, Brady G, Watson AJ, Dive C. Blood cells with reduced mitochondrial membrane potential and cytosolic cytochrome C can survive and maintain clonogenicity given appropriate signals to suppress apoptosis. *Blood*. Dec 15 1998;92(12):4545-4553.
145. Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, Rutherford LE, Weissmann G. A carbocyanine dye, DiOC6(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 29 1982;108(4):1495-1501.
146. Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol*. Jul 1995;130(1):157-167.
147. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry*. Feb 15 2000;42(1):74-78.
148. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death "in vivo". *The Journal of experimental medicine*. May 1 1995;181(5):1661-1672.

149. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2004;281:301-311.
150. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* Sep 2006;58(3):621-681.
151. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7 1976;72:248-254.
152. Meijer E, Sonneveld P. Hematology: Lenalidomide plus dexamethasone is effective in multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol.* May 2009;6(5):247-248.
153. Lacy MQ, Hayman SR, Gertz MA, et al. Pomalidomide (CC4047) plus low dose dexamethasone (Pom/dex) is active and well tolerated in lenalidomide refractory multiple myeloma (MM). *Leukemia.* Nov 2010;24(11):1934-1939.
154. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* Feb 1 1999;246(2):280-289.
155. Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y, et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol.* Apr 2003;31(4):271-282.
156. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res.* Jun 1 2006;66(11):5781-5789.
157. Aragon-Ching JB, Li H, Gardner ER, Figg WD. Thalidomide analogues as anticancer drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* Jun 2007;2(2):167-174.
158. Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J.* 2005;7(1):E14-19.
159. Lacy MQ, Hayman SR, Gertz MA, et al. Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* Oct 20 2009;27(30):5008-5014.
160. Dimopoulos M, Alegre A, Stadtmauer EA, et al. The efficacy and safety of lenalidomide plus dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma patients with impaired renal function. *Cancer.* Aug 15 2010;116(16):3807-3814.
161. Schafer P, Gandhi A, Zhang L. Opposing effects of dexamethasone on lenalidomide activity in multiple myeloma: additive/synergistic effects on antiproliferative activity on myeloma cells and antagonistic effects on immune function. *blood.* 2008;112:abstrac 2761.
162. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* Jan 2010;11(1):29-37.
163. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia.* Jan 2010;24(1):22-32.
164. Tajeja N. Lenalidomide - current understanding of mechanistic properties. *Anticancer Agents Med Chem.* Mar 2011;11(3):315-326.
165. Tohnya TM, Figg WD. Immunomodulation of multiple myeloma. *Cancer Biol Ther.* Nov 2004;3(11):1060-1061.
166. Wemeau M, Gauthier J, Leleu X, Yakoub-Agha I. IMiDs in hematology. *Bull Cancer.* Aug 1 2011;98(8):879-887.

167. Hsu AK QH, Tai T, Prince HM, Harrison SJ, Trapani JA, Smyth MJ, Neeson P, Ritchie DS. The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood*. 2011;117(5):1605-1613.
168. Richardson PG, Weller E, Lonial S, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. Aug 5 2010;116(5):679-686.
169. Palumbo A, Falco P, Corradini P, et al. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol*. Oct 1 2007;25(28):4459-4465.
170. Morgan G. Future drug developments in multiple myeloma: an overview of novel lenalidomide-based combination therapies. *Blood Rev*. Nov 2010;24 Suppl 1:S27-32.
171. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*. Jul 10 2008;454(7201):226-231.
172. Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, et al. Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *Br J Haematol*. Aug 2011;154(3):325-336.
173. Ying GG, Arsura M, Introna M, Golay J. The DNA binding domain of the A-MYB transcription factor is responsible for its B cell-specific activity and binds to a B cell 110-kDa nuclear protein. *J Biol Chem*. Oct 3 1997;272(40):24921-24926.
174. Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res*. 1990;55:133-270.
175. Marhamati DJ, Bellas RE, Arsura M, Kypreos KE, Sonenshein GE. A-myb is expressed in bovine vascular smooth muscle cells during the late G1-to-S phase transition and cooperates with c-myc to mediate progression to S phase. *Mol Cell Biol*. May 1997;17(5):2448-2457.
176. Cavo M, Benni M, Cirio TM, Gozzetti A, Tura S. Allogeneic bone marrow transplantation for the treatment of multiple myeloma. An overview of published reports. *Stem Cells*. Aug 1995;13 Suppl 2:126-131.
177. Barlogie B, Jagannath S, Vesole D, Tricot G. Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. *Semin Hematol*. Jan 1995;32(1):31-44.
178. van Rhee F, Szymonifka J, Anaissie E, et al. Total Therapy 3 for multiple myeloma: prognostic implications of cumulative dosing and premature discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide, and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood*. Aug 26 2010;116(8):1220-1227.
179. Zangari M, van Rhee F, Anaissie E, et al. Eight-year median survival in multiple myeloma after total therapy 2: roles of thalidomide and consolidation chemotherapy in the context of total therapy 1. *Br J Haematol*. May 2008;141(4):433-444.
180. Madan S, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Efficacy of retreatment with immunomodulatory drugs (IMiDs) in patients receiving IMiDs for initial therapy of newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. Aug 18 2011;118(7):1763-1765.
181. Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces "in vitro" and "in vivo"

cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. May 15 2006;107(10):4053-4062.