

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

Departamento de Ciencias Biomédicas



**Efecto sinérgico de Bortezomib e Imatinib  
en células de Leucemia Aguda Linfoblástica  
con cromosoma Philadelphia**

TESIS DOCTORAL

Presentada por Juan José Villanueva Escriche

Directores: Dr. Ignacio Pérez Roger

Dra. Elisa Lledó Feijóo

**VALENCIA**

**2015**



## AGRADECIMIENTOS

¡Por fin! Ha llegado el momento de agradecer a todos aquellos que de alguna manera han hecho realidad un sueño “mi tesis”. Una tesis es el resultado de mucho trabajo, esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo es tiempo. Tiempo que compartes con tus compañeros, tiempo que no estás con la familia y tiempo que dedicas a algo en lo que quizá solo tú crees. Es una etapa que empieza con mucha ilusión, que se pierde poco a poco, pero que tras baches y tropiezos se recupera cuando ves que todo tiene un sentido y que el final cada vez está más cerca. Durante estos años he conocido modestamente qué es la investigación, el compañerismo, el trabajo en equipo, y pese a haber mucho lobo vestido de cordero hay quienes sí merecen la pena. A ellos y a mi familia, que me han hecho sentir querido en todo momento, es a quien quiero dar las GRACIAS.

Gracias a mi director, Nacho, por permitirme realizar esta tesis, y gracias a Eli, “mi jefa”, por su ayuda y atención durante estos años.

A Enric y a Laura Franch, gracias por vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Y gracias a María Maroto y María García por aguantar mis bromas y hacer que el tiempo pasara más rápido.

A Carmen y Lorena, limpieza, Menchu, cafetería, Merche y Lorena, enfermeras, muchas gracias a todas por el cariño que me habéis mostrado durante este tiempo y por hacer que los días en el CEU fueran mejores.

A José Antonio, Ana y Vanesa, gracias por ayudarme en lo que he necesitado y acogerme como si fuese uno más de vosotros. Y por supuesto GRACIAS a Cristina, “mi chiquitaja” por encontrar en ti una compañera y sobre todo una amiga que me ha hecho reír incluso en los momentos más duros de estos años.

A Jaime, Miguel, Sole, Maricarmen, Violeta, Tanya y María Sebastián gracias por ser como sois y por el buen ambiente en los laboratorios.

A Sarita y Cristina Llinares, gracias por vuestra alegría y conversaciones, pero sobre todo, muchas gracias a las dos por hacer que el tiempo pasado juntos sea un muy buen recuerdo.

Gracias a los ángeles de Corpa, Selena, Irene, Ana y Mariola, por compartir momentos inolvidables dentro y fuera del laboratorio. Y gracias, de nuevo, a la italiana quien con su “vuela” me hacía sonreír aun estando “bajoneado”.

Muchas gracias tía Pili por tu ayuda y comprensión y a Trueno por tu compañía, sin duda estar con vosotros ha sido una distracción muy grata.

A Marián, gracias por el cariño y apoyo que me has demostrado en estos años. Gracias por tu confianza y por darme ánimos cuando lo veía todo negro.

A Zoyla, gracias por tu amistad, en ti encontré el hombro que necesitaba. Tus consejos me han servido, al menos, para dejar de ofuscarme y ver las cosas de mejor manera.

Andreu, GRACIAS, por ser como eres, vales mucho. Gracias por tus consejos, apoyo y sobre todo por estar ahí pese a la distancia.

A Jero, gracias por tu paciencia y comprensión en los momentos difíciles, y por supuesto, MUCHAS GRACIAS por Carla la niña de mis ojos.

Y finalmente, MIL GRACIAS a mi familia. Principalmente a mis padres, Francisco y Rosa, por vuestro cariño y por apoyarme en todas mis decisiones ayudándome incluso por encima de vuestras posibilidades. Me lo habéis dado todo y sé que lo seguiríais haciendo. También, gracias a mis hermanos, Javi, Rosa y Jesús, por cuidarme y quererme tanto. Gracias por poder contar con vosotros.

GRACIAS de corazón A TODOS.

*A mí hija Carla.  
A mis padres y hermanos,  
por estar siempre a mi lado.*



# ÍNDICE



*“Si no conozco una cosa, la investigaré”*

*Louis Pasteur (1822-1895)*





---

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN / ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 Leucemia Aguda Linfoblástica.....	3
1.2 La oncoproteína Bcr-Abl.....	4
1.3 Apoptosis .....	4
1.3.1 Caspasas .....	5
1.3.2 Bcr-Abl y apoptosis .....	7
1.3.3 Inhibición de la actividad kinasa de Bcr-Abl: Imatinib .....	9
1.4 El proteasoma.....	10
1.4.1 El inmunoproteasoma .....	12
1.4.2 Inhibición del proteasoma: Bortezomib.....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares .....	21
3.2 Análisis de la proliferación y del ciclo celular .....	22
3.3 Análisis de la muerte celular por apoptosis .....	23
3.4 Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot .....	23
3.5 Extracción de ARN y análisis por qRT-PCR.....	26
3.6 Análisis del sinergismo (método Chou-Talalay).....	28
3.7 Análisis estadístico.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 El tratamiento con Btz inhibe el crecimiento de células de LAL-B Ph+ .....	33
4.2 El tratamiento con Btz inhibe el ciclo celular en células de LAL-B Ph+.....	35

4.3 El tratamiento con Btz induce muerte por apoptosis en células de LAL-B Ph+..	38
4.3.1 <i>El Btz induce activación de caspasas</i> .....	41
4.4 El Btz inhibe la proliferación, detiene el ciclo celular e induce la muerte por apoptosis en células de LAL-T .....	45
4.5 El tratamiento con Btz disminuye la expresión de <i>Bcl-2</i> en células de LAL-B Ph+ y LAL-T .....	55
4.6 Las células más resistentes al Btz expresan menos inmunoproteasoma .....	57
4.7 IM y Btz tienen un efecto sinérgico en células de LAL-B Ph+ .....	59
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>

# ABREVIATURAS

---

---

*“El progreso de la medicina nos depara el fin  
de aquella época liberal en la que el hombre  
aún podía morir de lo que quería”*

*Stanisław Jerzy Lee (1909-1966)*



---

## ABREVIATURAS

- **Abl:** *Abelson leukemia*.
- **Bcr:** *Breakpoint cluster region*, región de rotura de conglomerados.
- **Btz:** Bortezomib.
- **CI:** Índice de combinación.
- **CKI:** *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*, inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas.
- **CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad.
- **DE<sub>90</sub>:** Dosis efectiva del 90%.
- **DRs:** *Death Receptors*, receptores de señales pro-apoptóticas.
- **FBS:** *Foetal bovine serum*, suero bovino fetal.
- **IAPs:** *Inhibitors of Apoptosis Proteins*, proteínas inhibidoras de la apoptosis.
- **IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria del 50%.
- **IL:** Interleuquina.
- **IM:** Imatinib.
- **IFN- $\gamma$ :** *Interferon-Gamma*, interferón gamma.
- **LAL:** Leucemia aguda linfoblástica.
- **LCM:** Leucemia crónica mieloide.
- **LCG:** Leucemia crónica granulocítica.
- **NF- $\kappa$ B:** *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- **P/S:** Penicilina y estreptomicina.
- **PBS:** *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino.
- **Ph:** Cromosoma Philadelphia.
- **PI:** Yoduro de propidio.
- **PVDF:** Difluoruro de polivinilideno.
- **ROS:** *Reactive Oxygen Species*, especies reactivas de oxígeno.

- **SD:** Desviación estándar.
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico.
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
- **SEM:** Error estándar de la media.
- **TBS:** *Tris-Buffered Saline*, tampón Tris salino.
- **TBT:** TBS más 0.1% Tween-20.
- **TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor alpha*, factor de necrosis tumoral alfa.
- **Ub:** Ubicuitina.
- **UPS:** *Ubiquitin Proteasome System*, sistema ubiquitina proteasoma.

# RESUMEN / ABSTRACT



*"Cada día sabemos más y entendemos menos"*

*Albert Einstein (1879-1955)*





## RESUMEN / ABSTRACT

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una enfermedad linfoproliferativa caracterizada por la presencia de alteraciones cromosómicas y mutaciones que hacen de esta enfermedad una de las principales causas de mortalidad dentro de las neoplasias hematológicas. El Imatinib (IM) forma parte integral de la terapia de primera línea en leucemias Ph+ al ser un inhibidor específico de Bcr-Abl. Sin embargo, en LAL-B Ph+ resulta muy poco efectivo al expresarse la oncoproteína Bcr-Abl p190. Por otra parte, resultados previos de nuestro grupo demuestran que Bcr-Abl induce la degradación proteasomal del inhibidor del ciclo celular p27<sup>kip1</sup>, y la no degradación de esta proteína es suficiente para detener la progresión del ciclo celular. Además, las células que expresan Bcr-Abl son más sensibles a la inducción de apoptosis por la inhibición del proteasoma con Bortezomib (Btz) que células que no expresan dicha oncoproteína. Asimismo, el Btz es capaz de detener el crecimiento celular e inducir la apoptosis en células de LAL-T al inhibir la expresión de genes diana de Notch1.

Por todo ello, en este trabajo hemos explorado el uso del inhibidor del proteasoma Btz en células de leucemia aguda linfoblástica, tanto de células B con cromosoma Philadelphia (LAL-B Ph+) como de células T (LAL-T), demostrando que este inhibidor causa parada de ciclo celular e induce apoptosis por activación de la ruta de las caspasas. Además el Btz induce una menor expresión del gen antiapoptótico *Bcl-2*, así como una expresión diferencial de los genes pro-supervivencia y pro-apoptóticos entre las líneas celulares estudiadas que se correlaciona directamente con la diferente sensibilidad al Btz. También, hemos visto que la resistencia al Btz tiene una relación directa con una mayor expresión del proteasoma constitutivo. Finalmente, analizamos el efecto combinado de IM y Btz en células de LAL-B Ph+ y descubrimos que el IM aumenta la sensibilidad al Btz, de tal forma que la administración secuencial del IM seguido del Btz produce un efecto sinérgico mayor que si se administran de manera conjunta los dos fármacos.

Con nuestros resultados proponemos el uso del Btz para inducir apoptosis en células de LAL, especialmente cuando hay mayor expresión del inmunoproteasoma, y la administración consecutiva de IM seguido de Btz para mejorar el tratamiento de leucemias Bcr-Abl positivas.

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a lymphoproliferative disease characterized by the presence of chromosomal abnormalities and mutations that make this disease one of the leading causes of death in hematological malignancies. Imatinib (IM) has become an integral part of front-line therapy for Ph<sup>+</sup> leukemias being a specific inhibitor of Bcr-Abl. However, it has proven to be far less efficacious in the treatment of ALL-B Ph<sup>+</sup> expressing the p190 form of Bcr-Abl. Previous results of our group suggest that Bcr-Abl regulates proteasomal degradation of the cell-cycle inhibitor p27<sup>kip1</sup>, and the no degradation of this protein is sufficient to induce a cell-cycle arrest. In addition, Bcr-Abl-expressing cells are more sensitive to apoptosis induction by the proteasome inhibitor Bortezomib (Btz) than cells no expressing Bcr-Abl. Thus, Btz induces a cell-cycle arrest and also apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells and not in control cells.

In this study we focused on the use of the proteasome inhibitor Btz in B-cell Philadelphia chromosome positive and T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL-B Ph<sup>+</sup> and ALL-T) cell lines. Our results showed that Btz induced cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. Furthermore, Btz significantly induced the down-regulation of the anti-apoptotic protein BCL-2 and a differential expression of pro- and anti-apoptotic proteins between the cell lines tested, which correlated with sensitivity to Btz treatment. In line with that, we also found an increased expression of the constitutive proteasome in the Btz less sensitive cell lines. Finally, we explored the possible synergistic effects between Btz and IM in ALL-B Ph<sup>+</sup> cell lines. We observed that IM increases the sensitivity to Btz and that the administration of IM followed by Btz produces a synergistic effect greater than when the two drugs were administrated at the same time.

Based on our results we propose that Btz induces apoptosis in ALL cell lines, especially in those with an increased expression of the immunoproteasome. We also propose a sequential administration of IM followed by Btz to improve the treatment in patients with Bcr-Abl-positive leukemias.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

---

*“La investigación de las enfermedades ha avanzado tanto  
que cada vez es más difícil encontrar a alguien  
que esté completamente sano”*

*Aldous Huxley (1894-1963)*



# 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por presentar células con alteraciones tanto en su proceso de diferenciación como de proliferación, lo que resulta en una desregulación del ciclo celular y en una inhibición de la apoptosis. Estas alteraciones dan lugar al crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo.

## 1.1 Leucemia Aguda Linfoblástica

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) agrupa un conjunto de neoplasias malignas que afectan a los precursores linfoides en la médula ósea. Estas células presentan una alta tasa de proliferación y de reordenamientos genéticos, características que favorecen la aparición de mutaciones a nivel del ADN que facilitan la transformación maligna.

La LAL es el cáncer más común en niños de entre 3 y 5 años, pudiendo padecerla también los adultos, especialmente los mayores de 65 años. El 85% de las personas con LAL tienen el subtipo de células B y alrededor del 15% tienen el subtipo de células T. Un cuarto de los pacientes adultos y menos del 5% de los pacientes pediátricos con LAL tipo B presentan el cromosoma Philadelphia (Ph), el cual codifica para la proteína Bcr-Abl constitutivamente activa que presenta actividad tirosina kinasa desregulada y que es el principal responsable de la enfermedad (Ren 2005; Cilloni y Saglio 2012). Más de la mitad de los pacientes con LAL tipo T presentan mutaciones que activan Notch1, lo que sugiere un papel importante de este receptor transmembrana en la cascada de señalización durante la leucemiogénesis (Vilimas *et al.* 2007; Paganin y Ferrando 2011). Cuando Notch1 se activa, su porción citoplasmática va al núcleo donde interacciona y activa factores de transcripción como Hes1 y NF- $\kappa$ B, necesarios para la supervivencia y claves en la progresión del ciclo celular (Huang *et al.* 2012; Hales *et al.* 2014).

Aunque las tasas de remisión de la enfermedad inicialmente son altas, del 78 al 93%, el pronóstico a largo plazo es generalmente pobre a menos que se realice un trasplante alogénico de células madre (Fielding *et al.* 2007). La falta de donantes, así como la frecuencia de alteraciones genéticas asociadas a la enfermedad y la comorbilidad, que aumenta con la edad, hacen que el tratamiento con éxito sea cada vez más complicado (Faderl *et al.* 2010; Bassan 2014).

## 1.2 La oncoproteína Bcr-Abl

El cromosoma Ph se genera por la translocación recíproca entre los cromosomas 9q34 y 22q11 y se presenta en un 35% de adultos con LAL y en menos del 5% de pacientes pediátricos con LAL (Ottmann y Pfeifer 2009; Faderl *et al.* 2010). Como resultado de esta translocación entre los brazos largos de cada cromosoma, el gen *Bcr* (*B*reakpoint-*cl*uster *r*egion) del cromosoma 22 y el gen *Abl* (*A*belson *l*eukemia) del cromosoma 9 quedan fusionados en el cromosoma 22 (cromosoma Ph), generando un oncogén que codifica una proteína quimérica denominada Bcr-Abl, con actividad tirosina kinasa constitutivamente activa (Jaso *et al.* 2011) que es el principal responsable del fenotipo de esta enfermedad (Ren 2005; Cilloni y Saglio 2012).

Dependiendo del punto de ruptura del gen *Bcr* se originan tres tipos de transcritos, el producto de los cuales es el responsable de distintos tipos de leucemia. Así, p190 se expresa en células de LAL-B Ph+, p210 aparece en células de leucemia crónica mieloide (LCM) y p230 se asocia con la leucemia crónica granulocítica (LCG) (Kharas *et al.* 2004).

La expresión de Bcr-Abl induce a nivel celular una desregulación de numerosas vías de transducción de señales en las que están implicados mecanismos de control del ciclo celular, apoptosis y diferenciación, por lo que su expresión juega un papel patogénico muy importante en la inducción de LAL-B Ph+.

## 1.3 Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es el sacrificio de las células defectuosas, dañadas o que presentan una amenaza potencial para la integridad del organismo. En respuesta a estímulos externos e internos, la célula responde con el suicidio en procesos normales, como el desarrollo embrionario, y procesos fisiopatológicos (Portt *et al.* 2011).

El mecanismo de la apoptosis es complejo e implica muchas vías, un defecto en cualquier punto puede ocasionar una regulación alterada de este proceso dando lugar a la transformación maligna de la célula. Sin embargo, aunque esta célula maligna o cancerosa ha adquirido modificaciones moleculares que frenan la apoptosis, también presenta alteraciones genómicas y otras que impulsan constantemente esta vía de muerte (Sayers 2011).

La apoptosis celular se produce mediante la activación de distintas cascadas de señalización principalmente a través de dos rutas; la *vía extrínseca*, mediada por receptores de señales proapoptóticas (receptores de muerte, DRs) situados en la superficie celular, y la *vía intrínseca*, que implica la liberación de factores proapoptóticos al desorganizarse la membrana mitocondrial. Ambas vías conducen a la activación jerárquica de proteasas especializadas denominadas caspasas. La activación de la cascada enzimática de las caspasas conduce a las características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis como son la formación de ampollas en la membrana (*blebbing*), contracción de la célula, condensación de la cromatina, y la fragmentación del ADN nuclear (Portt *et al.* 2011; Sayers 2011).

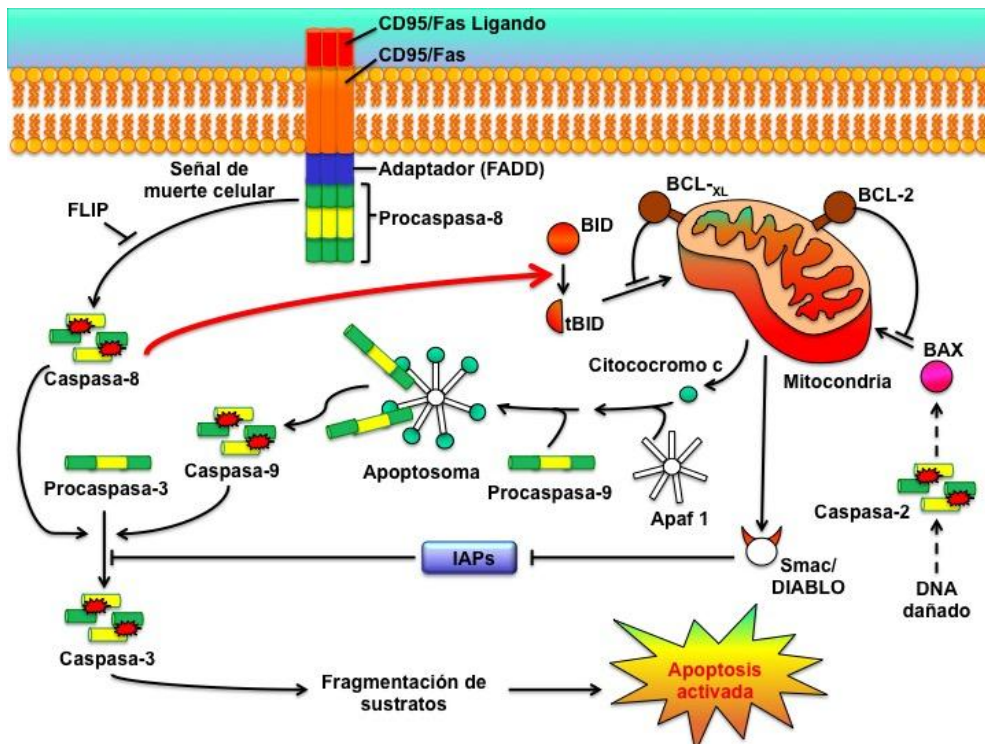
Existe una familia de proteínas directamente relacionada con la apoptosis, la familia Bcl-2. Dentro de esta familia se pueden distinguir miembros que favorecen la supervivencia celular como las proteínas pro-supervivencia (BCL-2, BCL-x<sub>L</sub>, MCL-1, BCL-W y BFL-1/A1), frente a las que promueven la apoptosis: proteínas multidominio (BAX, BAK y BOK) y proteínas BH3 (BID, BIM, BAD, BIK, NOXA, PUMA, BMF y HRK) (Perez-Galan *et al.* 2008). Además, el ratio proapoptótico versus antiapoptótico de proteínas de la familia Bcl-2 es crucial en la homeostasis de los linfocitos con el fin de evitar neoplasias linfoides y problemas autoinmunes (Certo *et al.* 2006; da Fonseca *et al.* 2010; Fulda *et al.* 2010).

### **1.3.1 Caspasas**

Las caspasas (*cysteine aspartate-especific proteases*) son una familia de enzimas citosólicas, altamente conservadas en la evolución, que escinden péptidos y proteínas en el extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de un residuo de aspartato. Estas enzimas reconocen al menos cuatro aminoácidos (tetrapéptido) en sus sustratos, lo que les confiere cierta especificidad. Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos (procaspasas) que se activan en respuesta a estímulos de muerte celular (Vaculova y Zhivotovsky 2008; Parrish *et al.* 2013).

Las caspasas se clasifican como caspasas iniciadoras o efectoras en función de su posición en la cascada de señalización de la apoptosis. Una señal apoptótica activa las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10), que a su vez activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), y éstas proteolizan sustratos celulares provocando, finalmente, los cambios morfológicos y bioquímicos propios de la apoptosis. Además, las caspasas están reguladas negativamente por las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Parrish *et al.* 2013).

En respuesta a señales proapoptóticas (**Figura 1**), la caspasa iniciadora (usualmente caspasa 8) escinde BID en el extremo C-terminal, y éste con ayuda de BAX, miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2, induce la salida del citocromo c de la mitocondria. El citocromo c se une a la proteína Apaf-1 activándola en presencia de dATP o ATP. La activación es completa tras la oligomerización de siete complejos Apaf-1/citocromo c dando lugar a un heptámero llamado apoptosoma. Este complejo activa la procaspasa 9 iniciando la activación de las caspasas efectoras (caspasas 3 y 7). En algunos tipos celulares, la caspasa 8 puede activar directamente las caspasas efectoras sin requerir la liberación mitocondrial del citocromo c (Taylor *et al.* 2008).



**Figura 1: Activación de la apoptosis mediada por caspasas.** La *vía extrínseca* se inicia en la membrana plasmática, donde FasL interactúa con el receptor transmembrana Fas causando su oligomerización. El receptor Fas, mediante unión a la proteína adaptadora FADD, activa la procaspasa 8. Ésta puede directamente activar la caspasa 3, o puede escindir BID, la cual facilita la salida del citocromo c mitocondrial. La caspasa 9 se activa a través de la *vía intrínseca* dependiente de la mitocondria. En la mitocondria las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, como BCL-2 y BCL-XL, inhiben la liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial. Por el contrario, los miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos, BAX y BAK, facilitan la liberación del citocromo c al citosol. El citocromo c interactúa con Apaf-1, produciéndose un cambio conformacional en el citocromo, y posterior oligomerización en una estructura heptamérica conocida como apoptosoma. El apoptosoma activa la caspasa 9 que a su vez activa las caspasas efectoras, como la caspasa 3.



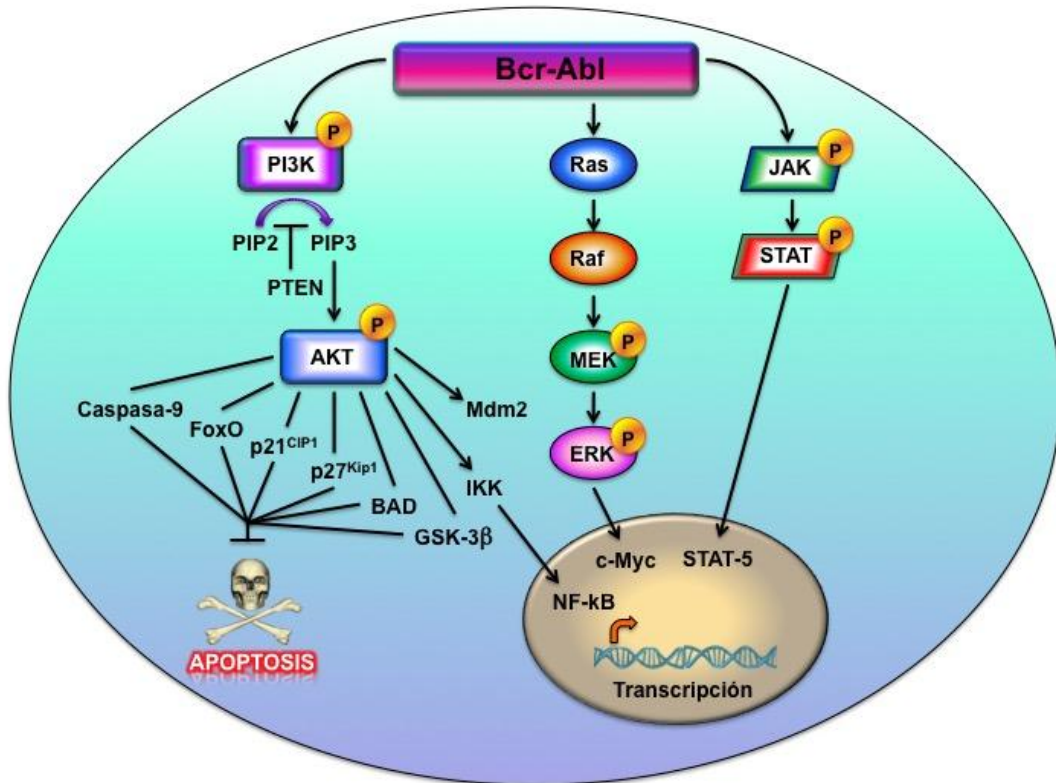
Las caspasas tienen un papel fundamental en varios procesos que suceden durante la apoptosis: la *fragmentación del ADN*, ya que en el interior de una unidad nucleosomal es originada por la ADNasa CAD activada por caspasas; la *inactivación de enzimas implicadas en la reparación del ADN*, como la enzima poly (ADP-ribosa) polimerasa o PARP, y la enzima proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK), cuya función se impide mediante su rotura por caspasa 3; y por último, la *rotura de proteínas de estructura nuclear*, puesto que la degradación de la proteína intranuclear Lamina por caspasa 6 da lugar a la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, efectos observados durante la muerte celular (McIlroy *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2008).

### **1.3.2 Bcr-Abl y apoptosis**

La oncoproteína Bcr-Abl confiere ventajas en la proliferación y supervivencia de células hematopoyéticas mediante la activación de diversas vías de señalización intracelular, tales como las rutas JAK/STAT, Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/AKT que normalmente intervienen en la regulación de la hematopoyesis mediada por receptores de citoquinas (Kurosu *et al.* 2013).

La expresión de Bcr-Abl proporciona a la célula independencia de factores de crecimiento, como la IL-3, y la progresión del ciclo celular a través de la transición de G1 a S. Bcr-Abl también promueve la supervivencia celular a través de STAT-5 mediando la regulación positiva de BCL-x<sub>L</sub> y la activación de otros factores transcripcionales, vía Ras/Raf/MEK/ERK, cuyos genes diana activan la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Gallipoli *et al.* 2014).

Los efectos mitogénicos de Bcr-Abl requieren la activación de la ruta de PI3K/AKT (**Figura 2**) que sirve de efector clave mediante la fosforilación de sustratos como BAD, caspasa 9, factores de transcripción FoxO, IKK, Mdm2 y GSK-3 $\beta$ , que regulan la maquinaria apoptótica dando lugar a una supervivencia prolongada y expansión del clon anormal (Cilloni y Saglio 2012). Además, en nuestro grupo se ha caracterizado la implicación de esta ruta en la regulación del inhibidor del ciclo celular p27<sup>kip1</sup>, tanto a nivel transcripcional como por el aumento de su degradación en el proteasoma, (Andreu *et al.* 2005).

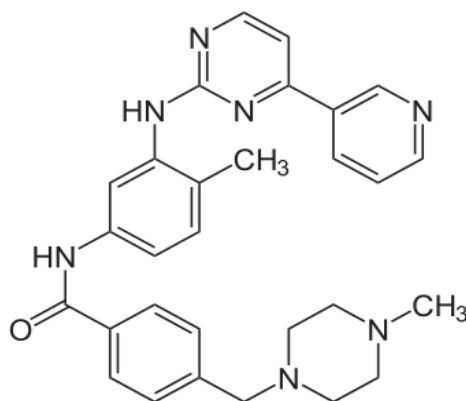


**Figura 2:** Vías de transducción de señales activadas por la oncoproteína Bcr-Abl. La activación de la ruta PI3K/AKT por Bcr-Abl promueve la proliferación celular y tiene efectos antiapoptóticos al mediar la degradación de inhibidores del ciclo celular como p27<sup>kip1</sup> (Andreu *et al.* 2005) y activar factores de transcripción como NF-κB (Gorre *et al.* 2001). La activación de la ruta Ras/Raf/MEK/ERK da lugar a la activación de la expresión de genes cuyos productos aumentan la proliferación celular e inhiben la apoptosis (Chang *et al.* 2003). La ruta JAK/STAT activa la transcripción de genes anti-apoptóticos como STAT-5 (Gallipoli *et al.* 2014).

### 1.3.3 Inhibición de la actividad kinasa de Bcr-Abl: Imatinib

El desarrollo en las últimas décadas de inhibidores de tirosinas kinasas, como el Imatinib (IM) (mesilato de Imatinib, STI571, comercializado como Gleevec® por Novartis Pharmaceuticals) (**Figura 3**), ha proporcionado un avance en la terapia contra el cáncer. La especificidad de estos medicamentos, inhibición de la actividad tirosina kinasa, hace que sean una terapia dirigida contra el cáncer frente al tratamiento citostático convencional (Eckstein *et al.* 2014).

El IM se descubrió a finales de la década de 1980 y se trata de una 2-fenilamino-pirimidina que inhibe específicamente la actividad tirosina kinasa de PDGF-R (*p*latelet-*d*erived *g*rowth *f*actor *r*eceptor), c-kit y Abl (Buchdunger *et al.* 1996; Druker y Lydon 2000). Este compuesto se une al dominio kinasa de Abl, bloqueando así la entrada de ATP en esta región de la proteína (Schindler *et al.* 2000; Druker 2008).



**Figura 3:** Estructura química del mesilato de Imatinib

Hasta hace poco, la LAL-B Ph+ era una de las leucemias con peor pronóstico. La aparición del IM y su combinación con quimioterapia y el trasplante alogénico de células madre ofrece una supervivencia del 40-50% de los pacientes. Pese al desarrollo de nuevos inhibidores de segunda generación, como el Dasatinib y Nilotinib, y a la monitorización molecular para guiar decisiones terapéuticas, siguen existiendo importantes obstáculos en el tratamiento de esta enfermedad. La capacidad de la LAL-B Ph+ de desarrollar rápidamente resistencia a los inhibidores, principalmente debida a mutaciones en el dominio tirosina kinasa de Bcr-Abl, así como una mayor incidencia que aumenta con la edad, lo que limita la opción del trasplante alogénico de células madre, hace que actualmente el tratamiento de esta enfermedad sea todo un reto (Ottmann y Pfeifer 2009; Bassan 2014). Por ello es de gran importancia estudiar alternativas al tratamiento actual de las LAL-B Ph+.

## 1.4 El proteasoma

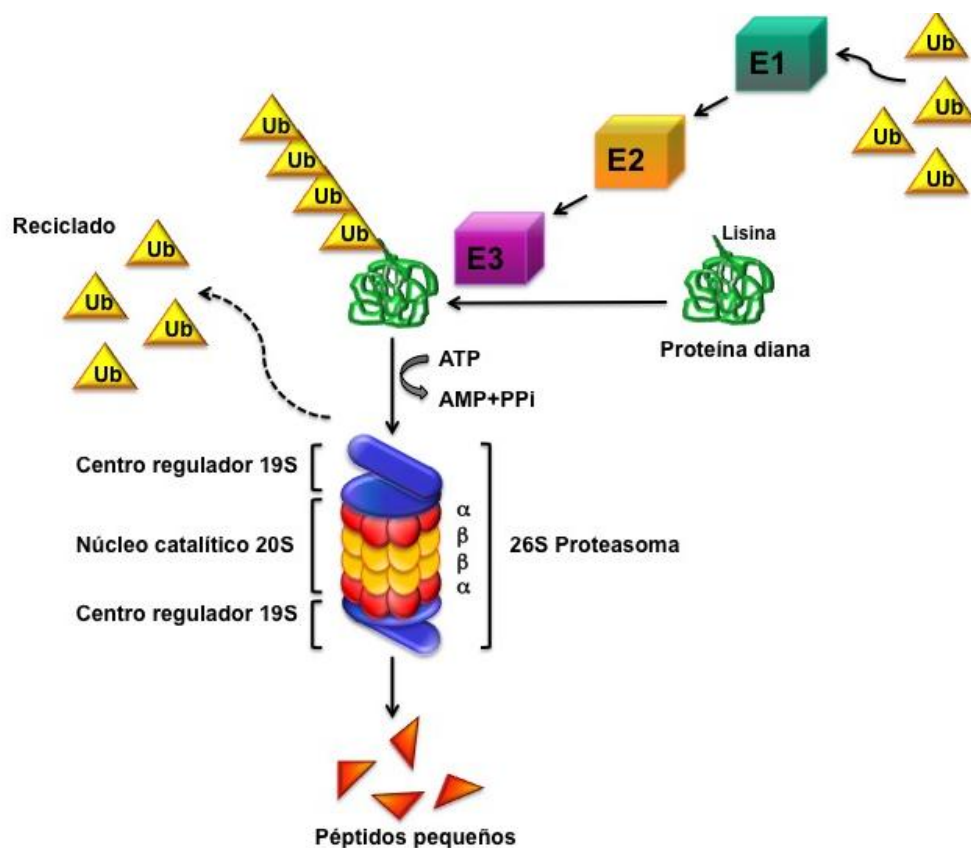
El proteasoma es un complejo proteolítico que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de todas las células eucariotas. Forma parte del sistema ubiquitina proteasoma (UPS, *Ubiquitin Proteasome System*) y es un regulador clave en la estabilidad y función de las proteínas de la célula (D'Arcy *et al.* 2014). Además, desempeña un papel fundamental en la regulación y el mantenimiento de muchos procesos esenciales en la célula, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular, la señalización celular, la reparación del ADN, la transcripción de genes, la apoptosis y la generación de péptidos antigénicos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I a las células T (Ebstein *et al.* 2012). Entre los sustratos a los que degrada o activa mediante proteólisis parcial se incluyen factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, c-Myc y p53, proteínas de ciclo celular, como los CKIs p21<sup>Cip</sup> y p27<sup>kip1</sup>, y el oncosupresor Rb. Un mal procesamiento de estas proteínas puede conducir a la degeneración maligna de la célula y posterior desarrollo de una enfermedad. Por ello, el proteasoma es importante para la salud humana al intervenir en gran variedad de procesos y enfermedades (Finley 2009).

El proteasoma 26S es una gran proteasa intracelular que consta de un núcleo catalítico 20S, o *core*, y dos subunidades reguladoras 19S. Cada unidad reguladora 19S contiene seis subunidades ATPasa que reconocen, despliegan y translocan las proteínas sustrato al centro catalítico 20S (Finley 2009). El núcleo catalítico es el resultado del apilamiento axial de dos anillos exteriores  $\alpha$  y dos anillos interiores  $\beta$  compuestos por siete subunidades estructuralmente similares cada uno. De las siete subunidades  $\beta$  que componen los anillos interiores, tres de ellas muestran la actividad hidrolasa que escinde los enlaces peptídicos; las subunidades  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5, proteolíticamente activas, se asocian a la actividad caspasa, tripsina y quimotripsina que escinden enlaces peptídicos posteriores a un aminoácido ácido, básico e hidrofóbico respectivamente (Tanaka *et al.* 2012).

Para que una proteína sea reconocida y, posteriormente, procesada por el proteasoma, previamente debe ser marcada con una cola de múltiples moléculas de ubiquitina (Ub). La Ub es un polipéptido pequeño de 76 aminoácidos altamente conservado en células eucariotas. La ubiquitilación (**Figura 4**) se produce mediante reacciones secuenciales catalizadas por tres enzimas: una enzima activadora de Ub (E1), una enzima conjugadora de Ub (E2) y una ubiquitín ligasa, es decir, una enzima ligasa proteína-ubiquitina (E3). El sistema de ubiquitilación en mamíferos contiene varios cientos de enzimas, incluyendo una enzima E1, cerca de 50 enzimas E2 y

alrededor de 500 enzimas E3. Este hecho ofrece multitud de posibles combinaciones entre las enzimas generando una enorme lista de proteínas sustrato (Cadwell y Coscoy 2005; Finley 2009).

La señal mínima de degradación por el proteasoma es una cadena de cuatro moléculas de Ub conectadas en serie por un enlace isopeptídico entre el C-terminal de una molécula y la Lys 48 de otra molécula (Thrower *et al.* 2000). Una vez ubiquitilada, la proteína es reconocida por el complejo 19S y se une a él, a continuación pasa al interior del complejo 20S donde es degradada en péptidos más pequeños (Finley 2009).



**Figura 4:** Esquema representativo del mecanismo de acción del proteasoma. Cuando una proteína marcada con una cola de múltiples unidades de ubiquitina, proceso llevado a cabo por los enzimas E1, E2 y E3, es reconocida por el complejo 19S es deubiquitilada y desplegada. Posteriormente pasa al interior del complejo 20S, donde es degradada en péptidos más pequeños (Vink *et al.* 2006).

### **1.4.1 El inmunoproteasoma**

El proteasoma constitutivo es conocido como tal cuando el núcleo catalítico presenta las subunidades  $\beta 1$  (*PSMB6*),  $\beta 2$  (*PSMB7*) y  $\beta 5$  (*PSMB5*). Tras la exposición a citoquinas inflamatorias, como el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), las subunidades del proteasoma constitutivo quedan intercambiadas por las subunidades del inmunoproteasoma  $\beta 1i$  (*LMP2*),  $\beta 2i$  (*MECL-1*) y  $\beta 5i$  (*LMP7*). La subunidad  $\beta 1i$  presenta actividad quimotripsina en lugar de caspasa como su homóloga ( $\beta 1$ ) del proteasoma constitutivo. De esta manera, la actividad del inmunoproteasoma genera péptidos que pueden adaptarse mejor a las moléculas del CMH de Clase I (Groettrup *et al.* 2010; Tanaka *et al.* 2012), siendo más eficientes en la activación de células T que los péptidos generados por el proteasoma constitutivo (Niewerth *et al.* 2014).

La exposición al IFN- $\gamma$  desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen la oxidación de proteínas y su posterior acumulación en forma de agregados de proteínas nocivas. En respuesta a esta situación, el inmunoproteasoma protege la viabilidad celular al degradar proteínas ubicuitiladas más rápido que el proteasoma constitutivo; de hecho, los conjugados de poliubiquitina que se acumulan en situación de estrés oxidativo son preferentemente degradados por el inmunoproteasoma. Por todo esto el inmunoproteasoma no sólo interviene en el procesamiento de antígenos, sino que también ofrece protección celular frente al daño oxidativo inducido por citoquinas (Seifert *et al.* 2010).

La regulación negativa de  $\beta 5i$  inhibe la diferenciación de adipocitos murinos y humanos *in vitro*. Este hallazgo identifica a  $\beta 5i$  como un componente regulador esencial no sólo de la inflamación sino también de la diferenciación de adipocitos, lo que indica que el inmunoproteasoma tiene funciones pleiotrópicas en el mantenimiento de la homeostasis en varios tipos de células (Tanaka *et al.* 2012). Además, se ha relacionado la existencia de mutaciones en la subunidad  $\beta 5i$  con varios síndromes como el de la paniculitis lipodistrófica inducida, la dermatosis neutrofílica atípica crónica con elevada temperatura (CANDLE) y el síndrome autoinmune de Nakajo-Nishimura (Agarwal *et al.* 2010; Arima *et al.* 2011; Kitamura *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012).

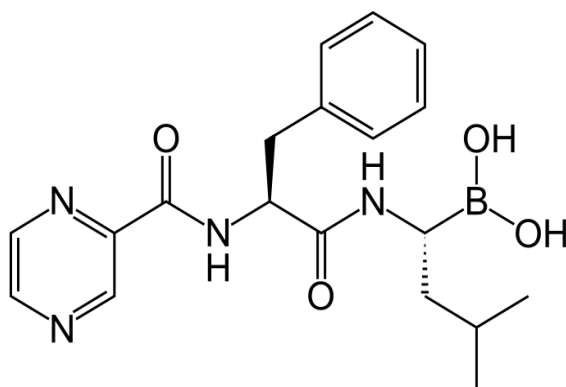
Recientemente, en estudios *in vitro* con líneas celulares de leucemia humana, se han identificado mecanismos de resistencia adquirida al inhibidor del proteasoma Bortezomib, debido principalmente a una regulación positiva de las subunidades

constitutivas (Balsas *et al.* 2012), así como la adquisición de mutaciones en la subunidad  $\beta 5$  que disminuyen la unión del Bortezomib (Franke *et al.* 2012; Niewerth *et al.* 2014). Así mismo, se ha visto que altos ratios del inmunoproteasoma *versus* proteasoma constitutivo se correlacionan con un aumento en la sensibilidad a los inhibidores del proteasoma en leucemias agudas pediátricas (Niewerth *et al.* 2013).

#### 1.4.2 Inhibición del proteasoma: Bortezomib

El sistema de degradación de proteínas formado por la maquinaria de ubiquitilación y el proteasoma (UPS) se encuentra desregulado en diferentes patologías, incluido el cáncer. Por esta razón los inhibidores del UPS se han convertido en uno de los principales objetivos de las estrategias terapéuticas (Hoeller y Dikic 2009).

El primer inhibidor del proteasoma disponible en clínica, el Bortezomib (Btz) (PS-341, comercializado como Velcade® por Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, Ma, EE.UU.), es un análogo del ácido dipeptidil borónico (**Figura 5**) que inhibe de forma selectiva y reversible la actividad quimi tripsina del proteasoma mediante su unión directa al núcleo catalítico 20S (Sunwoo *et al.* 2001; Boccadoro *et al.* 2005; Vink *et al.* 2006).



**Figura 5:** Estructura química del Bortezomib. Ácido dipeptidil borónico.

El Btz se ha establecido como tratamiento eficaz para los casos con recaída y refractarios de mieloma múltiple y muestra un gran potencial terapéutico en otros tumores malignos hematológicos, especialmente cuando se combina con otros fármacos (Kane *et al.* 2006; Attar *et al.* 2008). Además, ensayos clínicos en fase I y II en niños con leucemia o linfoma muestran que una combinación de Btz con quimioterapia, como vincristina, dexametasona y doxorubicina, ofrece una respuesta activa con una toxicidad aceptable (Messinger *et al.* 2012).

La combinación de dos o más fármacos puede resultar en un efecto sinérgico, es decir, la administración conjunta de los fármacos resulta en un efecto mayor que la suma de sus efectos por separado. Esto se debe a que uno de los fármacos sensibiliza a la célula de tal manera que el segundo fármaco tiene un mayor efecto que si actuara solo. El sinergismo entre fármacos permite obtener muy buenos resultados disminuyendo las dosis de estos compuestos y, además, reduciéndose sus efectos secundarios. Así pues, el Btz podría ser un buen candidato para estudios de sinergismo.



## 2 OBJETIVOS

---

---

*“El experimentador que no sabe lo que está  
buscando no comprenderá lo que encuentra”*

*Claude Bernard (1813-1878)*



## 2 OBJETIVOS

La aparición de inhibidores específicos de la actividad kinasa de Bcr-Abl, como el IM, ha mejorado el tratamiento de la LCM. Sin embargo, en LAL-B Ph+ el beneficio clínico es, generalmente, de corta duración (Faderl *et al.* 2010) puesto que la mayoría de los pacientes sufren recaída a menos que se sometan a un trasplante alogénico de células madre (Ottmann y Pfeifer 2009). La capacidad de esta leucemia de desarrollar rápidamente resistencia a los inhibidores y la mayor incidencia que aumenta con la edad, limita la opción del trasplante alogénico de células madre. Todo esto hace que siga habiendo importantes obstáculos en el tratamiento de esta enfermedad (Ottmann y Pfeifer 2009; Bassan 2014).

Por todo esto es interesante y necesario buscar nuevas dianas terapéuticas que puedan ofrecer una alternativa a estos tratamientos. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que Bcr-Abl induce la degradación proteasomal del inhibidor del ciclo celular p27<sup>kip1</sup> (Andreu *et al.* 2005), y que el tratamiento con Btz induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en células que expresan mutantes Bcr-Abl resistentes a IM (Albero *et al.* 2010). Además, el uso del Btz ha sido exitoso en el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma del manto (Chauhan *et al.* 2005; Perez-Galan *et al.* 2006) por lo que proponemos el proteasoma como diana terapéutica y el Btz como inhibidor del proteasoma para desarrollar nuevos protocolos de tratamiento tanto de LAL-B Ph+ como de LAL-T.

Con esta hipótesis de trabajo, se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto del Btz sobre la proliferación y supervivencia de células de leucemia aguda linfoblástica.
2. Estudiar los mecanismos moleculares de apoptosis afectados por el Btz en los modelos celulares de LAL.
3. Analizar el efecto combinado de IM y Btz en células de LAL-B Ph+.



# 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

*“El éxito no se logra sólo con cualidades especiales.  
Es sobre todo un trabajo de constancia,  
de método y de organización”*

*Jean Pierre Sergent (1958-)*



### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en la realización de este trabajo han sido SD-1 NALM-20, TOM-1 y SUP-B15 como modelo de LAL-B Ph+; y JURKAT, MOLT-4 y LOUCY para el estudio de LAL-T.

Las células SD-1 y NALM-20 derivan de células B de sangre periférica de pacientes con LAL Ph+ (Dhut *et al.* 1991; Matsuo *et al.* 1991). Las células TOM-1 y SUP-B15 derivan de células B de médula ósea de pacientes con LAL Ph+ (Okabe *et al.* 1987; Naumovski *et al.* 1988). En cultivo, las células crecen en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) como antibiótico y suero bovino fetal (FBS) al 10% las células SD-1 y 20% las células TOM-1 y NALM-20. Las células SUP-B15 crecen en medio McCoy's 5A suplementado con un 20% de FBS y un 1% P/S.

Las células JURKAT, MOLT-4 y LOUCY derivan de células T de sangre periférica de pacientes con LAL-T (Minowada *et al.* 1972; Schneider *et al.* 1977; Ben-Bassat *et al.* 1990). Estas células crecen en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con un 1% de P/S y FBS a una concentración del 10% para las células JURKAT y 20% para las células MOLT-4 y LOUCY.

Estas líneas celulares se obtuvieron de la colección europea DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) y su mantenimiento en cultivo se realizó en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (F75) a una densidad de siembra de  $2.5 \times 10^5$  células/ml.

Todos los medios, antibióticos y suplementos usados para el cultivo celular fueron de Life Technologies. Todo el trabajo de manipulación de los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A. El crecimiento de las líneas celulares se llevó a cabo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO<sub>2</sub> (5%).

### 3.2 Análisis de la proliferación y del ciclo celular

En los experimentos realizados las células fueron tratadas con dos fármacos: el IM (Imatinib, STI571, Gleevec®), inhibidor de la actividad tirosina kinasa de Bcr-Abl, y el Btz (Bortezomib, PS-341, Velcade®), inhibidor reversible del proteasoma.

Para analizar la proliferación celular, en presencia y ausencia de los inhibidores, todas las líneas celulares fueron sembradas a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/ml, excepto las células SD-1 que se sembraron a  $1 \times 10^5$  células/ml. En el momento de la siembra se añadieron los fármacos y se recogió una alícuota del cultivo a 24 y 48 h, para realizar un conteo de células viables en una cámara de hemocitometría Neubauer mediante ensayo de viabilidad con azul de tripano. Con estos datos se elaboraron curvas de crecimiento.

Las gráficas de proliferación y de dosis-respuesta de los fármacos se realizaron representando crecimiento celular (células  $\times 10^4$ /ml) a un tiempo determinado o porcentaje de supervivencia celular (referido a la condición control) frente al logaritmo de la concentración de IM y Btz ajustándolo a una curva de regresión no lineal. Las curvas de proliferación se realizaron con el programa bioestadístico GraphPad Prism 6.0. La concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) se determinó mediante el programa informático Calcsyn (Biosoft, Cambridge, Reino Unido).

Para estudiar el efecto de los fármacos sobre el ciclo celular, utilizamos la tinción del ADN con yoduro de propidio (PI) mediante el kit *DNA Prep™ Reagent System* (Beckman Coulter). Las células se sembraron en frascos de 175 cm<sup>2</sup> (F175) y se tomaron muestras de los cultivos a distintos tiempos de tratamiento. En cada caso, se recogieron  $5 \times 10^5$  células por centrifugación en una centrífuga de cabezal basculante Eppendorf 5810 R y se lavaron dos veces con PBS (5 ml), centrifugando a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se resuspendieron en 25  $\mu$ l de PBS y se añadieron 25  $\mu$ l del reactivo *DNA Prep LPR* y 300  $\mu$ l del reactivo *DNA Prep Stain*.

Una vez teñidas las células, se analizaron en un citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter) utilizando los programas *Cytomics™ RXP Cytometer*, *Cytomics™ RXP Analysis*, WinMDI 2.8. y *Cylchred Analysis* (Cardiff University).



### 3.3 Análisis de la muerte celular por apoptosis

Para caracterizar el tipo de muerte celular y cuantificar la muerte por apoptosis utilizamos la tinción con Anexina V-PI mediante el kit *Annexin V-FLUOS staining* (Roche). Las células se sembraron en frascos de 175 cm<sup>2</sup> (F175) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml las células SD-1 y a  $2.5 \times 10^5$  células/ml las células TOM-1, NALM-20, SUP-B15, JURKAT, MOLT-4 y LOUCY. En cada caso, a distintos tiempos de tratamiento, se recogieron  $5 \times 10^5$  células por centrifugación en una centrifuga de cabezal basculante Eppendorf 5810 R, y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación (500g, 5 min). Las células se resuspendieron en 25  $\mu$ l de solución de marcaje Anexina V-FLUOS (10  $\mu$ l Anexina V-Fluoresceína y 10  $\mu$ l de PI en 500  $\mu$ l de *Incubation Buffer*). Transcurridos 10 min, se añadieron 240  $\mu$ l de *Incubation Buffer* y se procedió a su análisis mediante citometría de flujo.

Estudiamos la implicación de las caspasas en la muerte celular inducida por Btz, sembrando las células en frascos de 175 cm<sup>2</sup> (F175) a una densidad de siembra de  $2.5 \times 10^5$  células/ml y se añadió el inhibidor irreversible pan-caspasa z-VAD (z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, Bachem) a 100  $\mu$ M de concentración. Después de 1 h se trataron las células con 3 o 12 nM Btz. Las células se procesaron igualmente en fresco, mediante el *Annexin V-FLUOS staining* y el *DNA Prep<sup>TM</sup> Reagent System* (Beckman Coulter) y se analizaron por citometría de flujo.

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

Para realizar la extracción de proteínas se recogieron las células por centrifugación, después se realizaron dos lavados con PBS y se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlas a -80°C. Una vez obtenidas todas las muestras, se resuspendieron en tampón de lisis (1% TritónX-100, 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT), más un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini*, Roche) y de fosfatasa (10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) y se incubaron durante 30 min en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (15000 rpm, 20 min, 4°C en una centrifuga refrigerada Eppendorf 5417 R con rotor de ángulo fijo) se procedió a la cuantificación de los sobrenadantes con el método Bradford (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) usando BSA para establecer una recta patrón.

La metodología de Western Blot empleada ha sido la descrita en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan *et al.* 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 11% de poliacrilamida, cargando 30  $\mu$ g de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5x (15% SDS;

50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-Cl, pH 6.8; 16%  $\beta$ -mercapto-etanol) y se calentaron a 95°C durante 5 min. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean II (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realizó a 200 V durante 60 min. La transferencia se hizo a una membrana de PVDF (*Inmobilon<sup>TM</sup>-P Tranfer Membrane*, Millipore) durante 1 h a 100 V en un aparato MiniProtean II (Bio-Rad) y con un tampón compuesto por 20% metanol, 20 mM Tris y 150 mM glicina.

Tras la transferencia se lavaron las membranas con TBS (*Tris-Buffered Saline*) más 0.1% Tween-20 (TBT) y procedimos a su incubación en solución de bloqueo (5% de leche en polvo desnatada en TBT) durante 1 h a temperatura ambiente, y en agitación.

A continuación se procedió a incubar las membranas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C, y después se realizaron dos lavados con TBT y uno con TBS durante 30 min cada uno. Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente y en agitación, y se volvieron a lavar dos veces con TBT y una vez con TBS durante 30 min cada lavado. Los anticuerpos empleados para la inmunodetección se especifican en la **Tabla 1**, y fueron preparados a las concentraciones que se indica en una solución compuesta por 3% BSA en TBT y 0.02% de azida sódica. Los anticuerpos secundarios se prepararon en solución de bloqueo a las concentraciones que se indica en dicha tabla.

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el kit *Amersham ECL Western Blotting* (GE Healthcare). Las membranas se cubrieron con papel transparente y se procedió a la captura y el análisis de las imágenes utilizando el ImageQuant LAS 4000 Control Software en combinación con el software de análisis de GE Healthcare, ImageQuant TL.

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo primario distinto, fueron tratadas con 200 mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 20 min a temperatura ambiente en agitación y se lavaron abundantemente en TBT.

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
<b>Caspasa-3 (Asp175)</b>	Cell Signaling	#9664	1:1000	Monoclonal de conejo
<b>Caspasa-8 (1C12)</b>	Cell Signaling	#9746	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Caspasa-9 (C9)</b>	Cell Signaling	#9508	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Proteasome Subunit <math>\beta</math>1 (MCP421)</b>	Enzo	PW8140	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Proteasome Subunit <math>\beta</math>2 (MCP168)</b>	Enzo	PW8145	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Proteasome Subunit <math>\beta</math>1i (LMP2-13)</b>	Enzo	PW8840	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Proteasome Subunit <math>\beta</math>2i MECL-1 (E-20)</b>	Santa Cruz	sc-18170	1:1000	Policlonal de cabra
<b><math>\beta</math>-Actina-Peroxidasa</b>	Sigma	A-3854	1:20000	Monoclonal de ratón

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Referencia	Dilución	Concentración
<b>Anti Rabbit IgG-HRP (Fc)</b>	Pierce	31463	1:5000	0.08 $\mu$ g/ml
<b>Anti Mouse IgG-HRP (Fc)</b>	Pierce	31437	1:5000	0.08 $\mu$ g/ml
<b>Anti Goat IgG-HRP (Fc)</b>	Santa Cruz	Sc-2020	1:2500	0.08 $\mu$ g/ml

**Tabla 1:** Lista de anticuerpos empleados en la inmunodetección.

### 3.5 Extracción de ARN y análisis por qRT-PCR

Se analizó la expresión de genes implicados en la apoptosis en las células SUP-B15, NALM-20, MOLT-4 y JURKAT. Para ello, se sembraron las células a una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células/ml y posteriormente se trataron con Btz, a una concentración de 3 nM para todas las células excepto las JURKAT que fue de 8 nM. Las células control se mantuvieron a la misma densidad que las células tratadas mediante su dilución a las 24 h.

Después de 48 h se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con PBS frío. A continuación se extrajo el ARN total siguiendo las instrucciones del manual del *RNeasy Mini kit* (QIAGEN) para  $< 5 \times 10^6$  células en suspensión. Tratamos el ARN con la DNasa I, *RNase-Free DNase Set* (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor. Este ARN se cuantificó en un espectrofotómetro Genesys 10 uv a una longitud de onda de 260 nm y fue empleado en una reacción de Transcripción Reversa (RT). Utilizando 0.5  $\mu$ g del ARN total realizamos la reacción de RT mediante el kit *RT<sup>2</sup> HT First Strand Kit* de QIAGEN siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en placas *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (96-well Format) (Human Apoptosis, QIAGEN) en las que se encuentran los cebadores de 84 genes relevantes en el proceso de apoptosis y los controles de calidad del propio método (5 *housekeeping genes*, 1 control del ADN genómico, 3 controles de RT y 3 controles positivos de PCR). Para cada reacción de qRT-PCR se utilizó el *RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix* (QIAGEN) en un volumen total de 25  $\mu$ l, que contenía 1  $\mu$ l ADNc (sintetizado en la reacción anterior), 12.5  $\mu$ l 2x *RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix* y 11.5  $\mu$ l *RNase-free H<sub>2</sub>O*.

Las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la qRT-PCR fueron las siguientes:

1. 95°C / 10 min (1 ciclo)
2. 95°C / 15 seg; 60°C / 1 min (40 ciclos)
3. 95°C / 1 min (1 ciclo)
4. 55°C / 1 min (1 ciclo)
5. +0,5°C / 10 seg (80 ciclos)

El paso 1 de la qRT-PCR es un paso previo que necesita la enzima para activarse. En el paso 5 se produce un aumento gradual de la temperatura de 0.5°C cada 10 segundos, desde 55°C a 95°C. Con esto se consigue elaborar una curva de desnaturalización que nos indica la especificidad con la que se ha dado la reacción, lo que nos permite detectar si se han producido errores en la amplificación o la formación de dímeros entre los cebadores.

La qRT-PCR se realizó en un termociclador iCycler (Bio-Rad). Las reacciones se hicieron por triplicado y en presencia de SYBR Green (*RT<sup>2</sup> SYBR Green Fluor qPCR Mastermix*) que es una molécula que emite fluorescencia sólo cuando se encuentra unida al ADN. La técnica de PCR cuantitativa (qPCR) se basa en la amplificación de un ADNc concreto al que se incorpora *SYBR Green*, ello nos permite determinar la cantidad de ADN amplificado. El incremento en la fluorescencia emitida por el *SYBR Green* queda registrado a tiempo real a medida que la reacción transcurre, con lo que podemos determinar el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (*background*). A este ciclo se le denomina ciclo umbral (*Cycle Threshold* o CT).

Para calcular las variaciones en la expresión de los genes y relativizarlas respecto a sus controles, se utilizaron las fórmulas:

$$CT_{\text{gen}} - CT_{\text{housekeeping genes}} = \Delta CT$$

$$\Delta CT_{\text{experimento}} - \Delta CT_{\text{control}} = \Delta\Delta CT$$

CT indica el valor umbral de amplificación de cada gen. El valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$  representa las veces que se expresa más o menos el gen que estamos analizando respecto al de su control (Livak y Schmittgen 2001). La obtención del valor CT fue mediante el programa de ordenador iCycler<sup>TM</sup> iQ (*Optical System Software*, Bio-Rad). El análisis de la cantidad de ARNm se realizó mediante el software de la web de QIAGEN que se basa en el valor  $\Delta\Delta CT$ .

### 3.6 Análisis del sinergismo (método Chou-Talalay)

En los experimentos para el estudio del sinergismo se sembraron las células TOM-1, NALM-20 y SUP-B15 a una densidad de siembra de  $2.5 \times 10^5$  células/ml y las células SD-1 a  $1 \times 10^5$  células/ml. Seguidamente administramos los inhibidores a las siguientes concentraciones: 0, 1, 2 y 3 nM de Btz, y 0, 0.1, 0.2 y 0.3  $\mu$ M de IM en las células TOM-1, NALM-20 y SUP-B15; 0, 3, 4, y 5 nM Btz y 0, 0.3, 0.4 y 0.5 de  $\mu$ M IM en las células SD-1. En cada caso, a las 24 y 48 h, se recogieron las muestras y se procesaron para su análisis.

Estudiamos la presencia o no de sinergismo cuando se administra Btz e IM al mismo tiempo cuantificando la muerte por apoptosis (células Anexina V +) mediante el kit *Annexin V-FLUOS staining* (Roche) como se indica en el punto 3.3. Al valor de muerte celular causada por los inhibidores se le restó el valor de la muerte basal (el de las células control) para obtener el valor real de la muerte producida por los fármacos. También, estudiamos el sinergismo cuando aplicamos Btz e IM a diferente tiempo; en este caso se realizó el estudio mediante el ensayo de proliferación de *CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution* (MTS, Promega). El compuesto de tetrazolio MTS (reactivo de Owen) queda biorreducido por enzimas deshidrogenasas en las células metabólicamente activas, dando lugar a un producto de formazán que es soluble en el medio de cultivo (Berridge y Tan 1993). Se añadieron 20  $\mu$ l de MTS por cada 100  $\mu$ l de volumen de cultivo (por pocillo) y se dejó incubar durante 2 horas. Pasado este tiempo se monitorizó la proliferación celular midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en el lector de placas VICTOR<sup>™</sup>X3 PerkinElmer 2030.

Los datos de absorbancia obtenidos a las 0, 24 y 48 h se procesaron mediante el programa Microsoft Excel 2013. Cada condición de cultivo se sembró por triplicado en una placa de 96 pocillos por día, de manera que se promediaron las medidas de absorbancia obtenidas y se sustrajo el promedio del blanco (medio de cultivo empleado para cada línea celular). Cada ensayo se realizó un mínimo de tres veces en días distintos.

Es necesario transformar los valores tanto de muerte como de proliferación celular obtenidos para determinar el efecto que tiene cada fármaco o su combinación. De tal manera que, para analizar la muerte celular (células Anexina V +), asignamos el valor de 1 al 100% de la muerte y referimos respecto a ese 1 los valores de la muerte producida por los fármacos. Para analizar la proliferación celular, se realizó el cociente

de los valores de crecimiento a 24 y 48 h respecto al día 0, y seguidamente se refirió cada día el crecimiento de las células tratadas al crecimiento de las células sin tratar. De este modo, el crecimiento de las células sin tratar equivale a 1 y las células tratadas tienen valores proporcionales referidos al crecimiento en ausencia de tratamiento. Por tanto, el efecto producido por cada dosis de fármaco tiene un valor que resulta de restar el crecimiento de las células sin fármaco (1) menos el crecimiento de las células tratadas. Estos datos fueron introducidos en el programa informático Calculusyn (Biosoft, Cambridge, Reino Unido), el cual se basa en el método de Chou-Talalay para determinar el sinergismo entre varios fármacos. Este método se basa en una ecuación derivada por Chou (Chou 2006) a partir de modelos de cinética enzimática.

El Calculusyn calcula el índice de combinación (CI), valor que indica si la combinación de dos o más fármacos resulta en un efecto aditivo ( $CI=1$ ), sinérgico ( $CI<1$ ) o antagónico ( $CI>1$ ). Por definición, el sinergismo es más que un efecto aditivo, mientras que el antagonismo es menos (Chou 2006; Chou 2010). Así pues, si la administración simultánea de dos fármacos resulta en un efecto mayor que la suma de sus efectos por separado, ambos fármacos pueden tener un efecto sinérgico.

En base a una serie de algoritmos se pueden hacer simulaciones para hallar el sinergismo o el antagonismo a cualquier efecto y dosis de fármaco, generando gráficos de fracción de células afectada por el fármaco-índice de combinación (Fa-CI), de dosis-efecto o de dosis-respuesta y los isobogramas (gráficos que indican las combinaciones equipotenciales de varias dosis de dos fármacos y se pueden usar para ilustrar el efecto aditivo, el sinergismo o el antagonismo a diferentes dosis (Chou 2006). Se trata de diferentes maneras de representar el efecto de la dosis del fármaco sobre la proliferación celular o el efecto de la dosis de los fármacos al combinarlos en la determinación de la sinergia. En este estudio se han seleccionado las representaciones de dosis-respuesta y los isobogramas.

Además, el programa Calculusyn aporta los valores de las Dosis Efectivas 50, 75 y 90 ( $DE_{50}$ ,  $DE_{75}$  y  $DE_{90}$ , respectivamente), necesarias para causar un efecto sobre el 50, 75 o 90% de las células, respectivamente. A partir de estas dosis se representan los isobogramas. En el tratamiento contra el cáncer, el sinergismo a una elevada dosis efectiva (ej.  $DE_{95}$ ,  $DE_{99}$ ) es mucho más relevante que a un efecto bajo (ej.  $DE_{30}$ ,  $DE_{50}$ ) (Chou 2006).

En este trabajo, la aplicación del método de Chou-Talalay fue empleando un ratio constante de dosis basado en diluciones de ambos fármacos en torno al  $IC_{50}$ . Las curvas de proliferación y de dosis-respuesta de los fármacos sobre el crecimiento celular se realizaron mediante el programa bioestadístico GraphPad Prism 6.0, representando crecimiento celular (Absorbancia) a un tiempo determinado o porcentaje de supervivencia celular (referido a la condición control) frente al logaritmo de la concentración de IM y Btz ajustándolo a una curva de regresión no lineal.

### **3.7 Análisis estadístico**

Los datos se representan como desviación estándar (SD) o como error estándar de la media (SEM) en función del número de experimentos, de manera que realizamos SD cuando tenemos tres experimentos y SEM si se trata de cuatro o más experimentos.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa bioestadístico GraphPad Prism 6.0. La comparación entre las medias se realizó mediante la prueba *t* de Student cuando el estudio era de una línea celular con un único tratamiento, y el Análisis de la Varianza (ANOVA de dos factores) con un post-test de Bonferroni para comparar varias líneas celulares o tratamientos.



## 4 RESULTADOS

---

---

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo  
y no en el resultado. Un esfuerzo total  
es una victoria completa”*

*Mahatma Gandhi (1869-1948)*



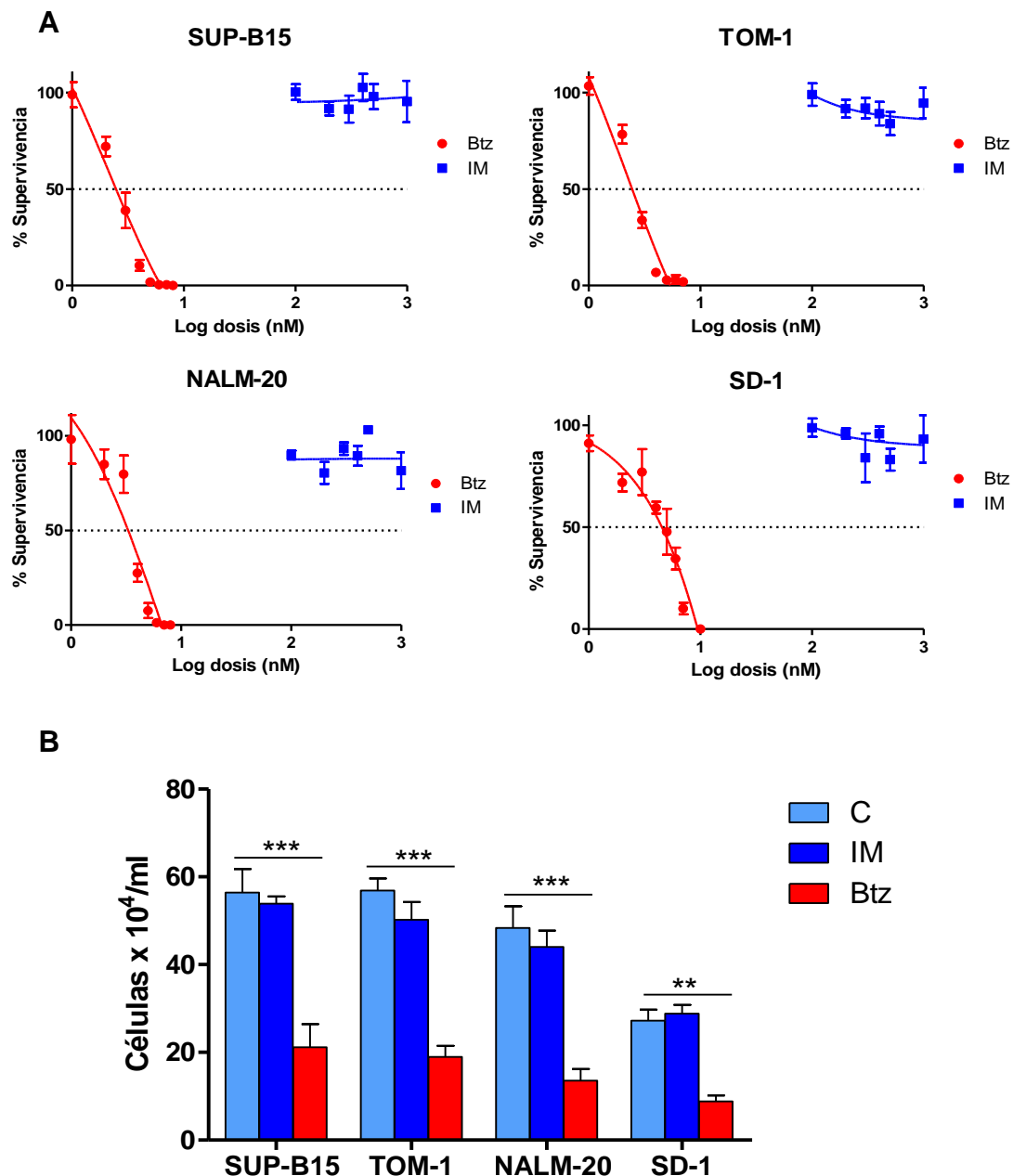
## 4 RESULTADOS

### 4.1 El tratamiento con Btz inhibe el crecimiento de células de LAL-B Ph+

Existen datos en la literatura que evidencian la baja eficacia del tratamiento convencional de la LAL-B Ph+ con el inhibidor tirosina kinasa IM (Faderl *et al.* 2010; Bassan 2014). Por otra parte, hay estudios que manifiestan el éxito en el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma del manto con el inhibidor del proteasoma Btz (Chauhan *et al.* 2005; Perez-Galan *et al.* 2006). Además, resultados previos de nuestro grupo demuestran que el Btz induce detención del ciclo celular y apoptosis en células que expresan mutantes Bcr-Abl resistentes a IM (Albero *et al.* 2010).

A la luz de estos datos quisimos comprobar el efecto citotóxico del IM y Btz en células de LAL-B Ph+. Para ello cultivamos células SUP-B15, TOM-1, NALM-20 y SD-1 en presencia de los inhibidores a dosis comprendidas en un intervalo de 0 a 2  $\mu$ M de IM, o de 0 a 10 nM de Btz durante 48 h, tras las cuales se valoró y cuantificó la viabilidad celular mediante tinción de las células con azul de tripano. A partir de estos datos elaboramos curvas de supervivencia celular, analizamos estadísticamente el efecto de los fármacos y realizamos un estudio dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>).

Como se muestra en las **Figuras 6A** y **6B**, el IM no afecta a la proliferación de las células y, por el contrario, el Btz reduce la supervivencia celular y presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a las células control. Además, aparece una gran diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre las líneas celulares lo que evidencia que cada línea celular se comporta de manera diferente. Los valores de IC<sub>50</sub> para el Btz, de 2.51 a 5.04 nM, muestran la sensibilidad de estas células al inhibidor del proteasoma (**Tabla 2**).



**Figura 6:** El Btz inhibe el crecimiento en células de LAL-B Ph+. **(A)** Se representa el porcentaje de la supervivencia celular después de 48 h en cultivo (referido al cultivo control) frente al logaritmo de la concentración de Btz e IM, ajustándolo a una curva de regresión no lineal. **(B)** Crecimiento de células cultivadas sin tratamiento (C), con 2  $\mu$ M IM o con la dosis letal 50 de Btz (3 nM para las células SUP-B15 y TOM-1, 4 nM las células NALM-20 y 5 nM las células SD-1), a las 48 h post-tratamiento. Se muestra la media + SEM de, al menos, siete experimentos independientes. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) con un post-test de Bonferroni revela diferencias significativas entre el tratamiento con Btz y las células control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Línea celular	IC <sub>50</sub> Btz (nM)
SUP-B15	2.51
TOM-1	2.80
NALM-20	3.60
SD-1	5.04

**Tabla 2:** IC<sub>50</sub> de Btz para las diferentes líneas celulares. Estos valores se han obtenido con una significación de  $r \geq 0.93$  a partir de un estudio dosis-respuesta a las 48h post-tratamiento de los mismos experimentos de la **Figura 1**.

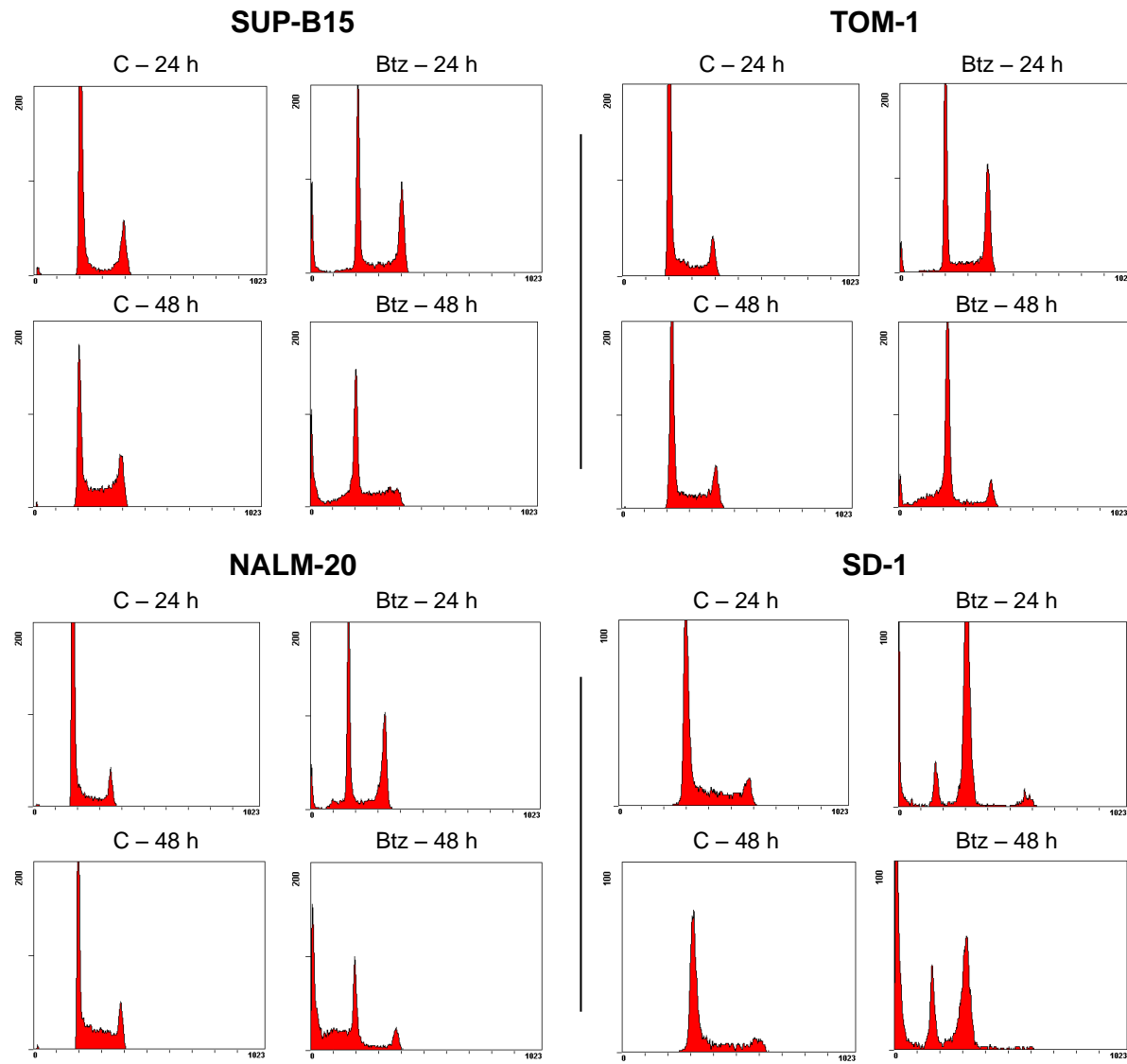
Con estos resultados podemos decir que el Btz inhibe la proliferación celular, dependiendo de la dosis, y confirmamos que el IM no afecta al crecimiento de células de LAL-B Ph+ SUP-B15, TOM-1, NALM-20 y SD-1.

#### 4.2 El tratamiento con Btz inhibe el ciclo celular en células de LAL-B Ph+

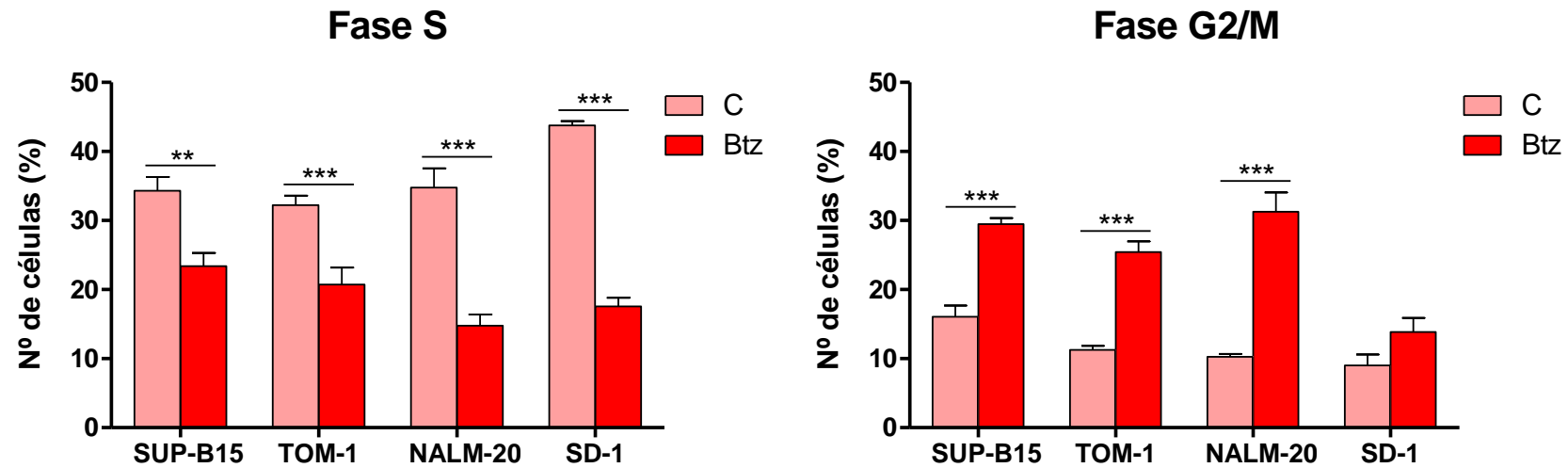
Después de comprobar que el Btz inhibe la proliferación de células de LAL-B Ph+, decidimos analizar el efecto del Btz sobre el ciclo celular. Fijamos la dosis del inhibidor en función del valor IC<sub>50</sub> obtenido, de tal manera que incubamos con 3 nM Btz las células SUP-B15 y TOM-1, 4 nM Btz las células NALM-20 y 5 nM Btz las células SD-1. Pasadas 24 o 48 h tomamos una muestra para analizarla mediante citometría de flujo tras tinción del ADN con PI, tal y como se describe en Material y Métodos.

Analizando el perfil de ciclo de las células SUP-B15, TOM-1 y NALM-20 (**Figura 7A**), pudimos comprobar como el Btz inicialmente, a las 24 h, provoca bajada de la fase S y acumulación de células en G2/M y, posteriormente, a las 48 h, también se produce la reducción de la fase G2/M y, además, aumenta la población subG0/G1, células con un contenido en ADN inferior al diploide, indicativo de muerte celular. En las células SD-1, a las 24 h se aprecia un descenso de la fase S y aumento de la población G2/M y subG0/G1, a las 48 h se produce un descenso de las poblaciones proliferantes (S y G2/M) y un mayor aumento de la población subG0/G1. Estas observaciones se confirman al realizar el análisis estadístico de las diferentes fases a 24 h y ver que hay diferencias significativas entre las células tratadas con Btz y las células control en las fases S y G2/M (**Figura 7B**) y en la fase G1 solo hay diferencias en las células SD-1 (datos no mostrados).

**A**



B



**Figura 7:** El Btz provoca disminución de la fase S y acumulación en fase G2/M del ciclo celular en células de LAL-B Ph+. (A) Perfiles de ADN de células sin tratar (C) y tratadas con Btz. A 24 y 48 h las células fueron teñidas con PI y la proliferación celular fue analizada por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo de cuatro experimentos independientes. (B) Cantidad de células, en porcentaje, que aparece en las fases S y G2/M del ciclo celular según los resultados obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el programa Cylchred a las 24 h post-tratamiento. Las barras representan la media + SEM de los experimentos del apartado A. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) se realizó con un post-test de Bonferroni (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 4.3 El tratamiento con Btz induce muerte por apoptosis en células de LAL-B Ph+

En los experimentos anteriores detectamos que el tratamiento con Btz provoca la aparición de células con un contenido en ADN inferior al diploide, población subG0/G1 que aparecía en la **Figura 7**, indicativo de muerte celular. Para estudiar con detalle este efecto, decidimos valorar la viabilidad celular mediante la doble tinción con Anexina V-PI, y poder caracterizar si esta muerte es debida a apoptosis o necrosis. Para ello incubamos las células con las mismas dosis que en el apartado anterior. Tomamos muestras a 24 y 48 h post-tratamiento, las procesamos y las teñimos con Anexina V-PI para analizarlas por citometría de flujo, tal y como se describe en Material y Métodos.

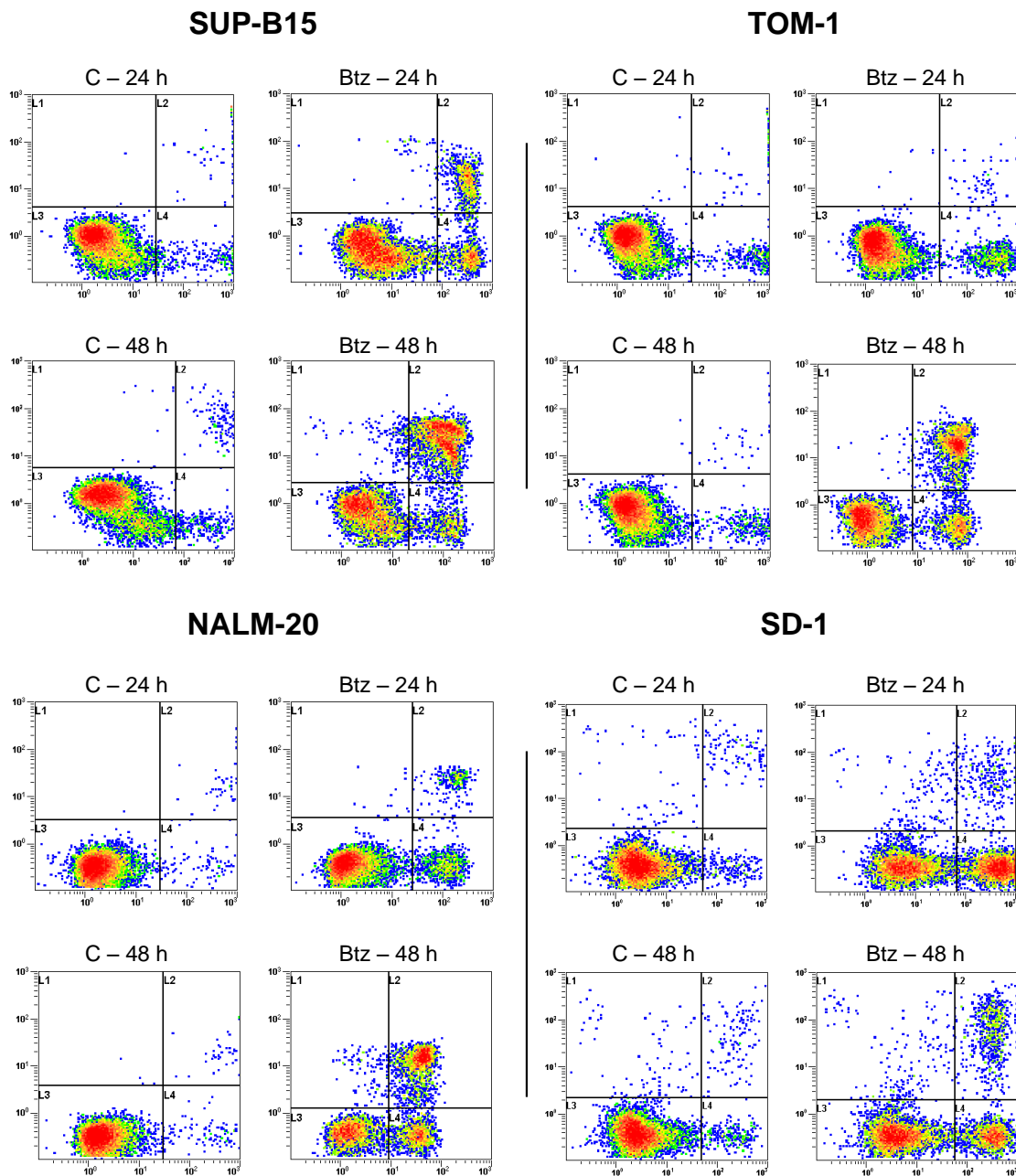
Como observamos en la **Figura 8A** el tratamiento con Btz da lugar a la aparición de una mayor cantidad de células positivas al marcaje con Anexina V respecto a las células control, lo que indica que hay muerte por apoptosis. Además se puede apreciar la evolución, de 24 a 48 h, de la población desde apoptosis temprana (An+/PI-) a apoptosis tardía (An+/PI+).

Cuantificamos la apoptosis como el porcentaje de células positivas para Anexina V, analizamos estadísticamente los datos, y averiguamos que hay diferencias significativas entre las células tratadas con Btz y las muestras sin tratar (**Figura 8B**).

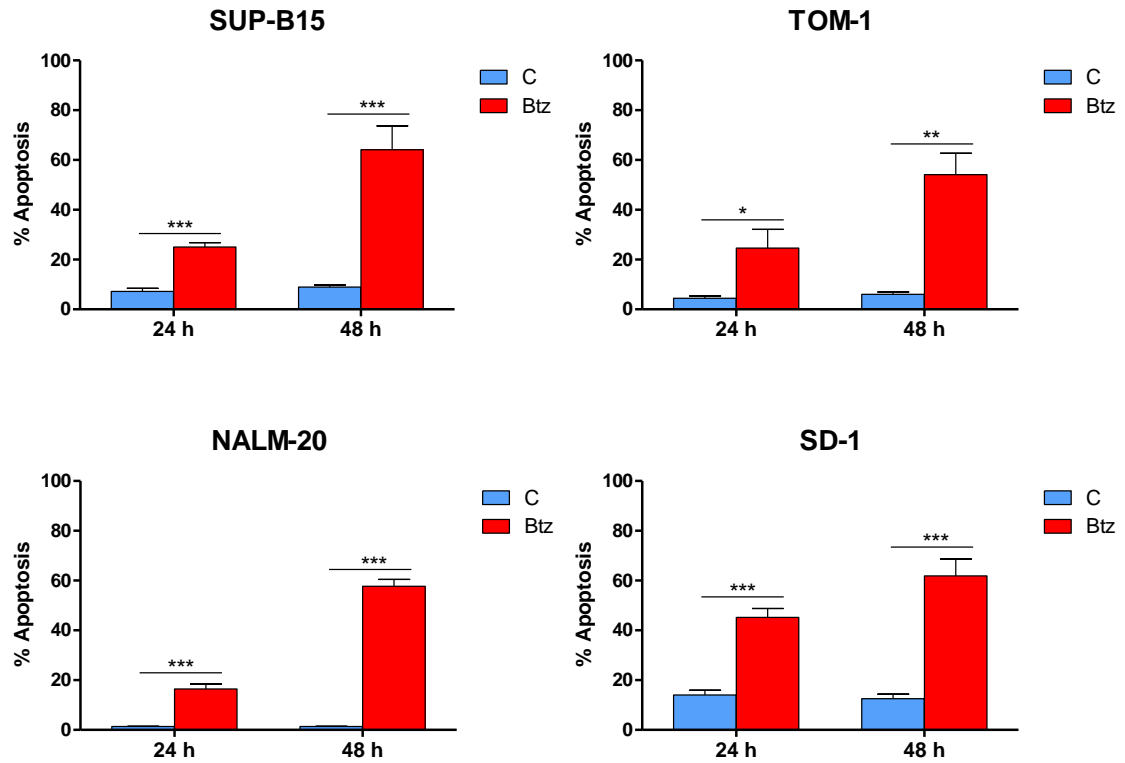
Las células SD-1 presentan mayor marcaje con Anexina V a las 24 h post-tratamiento, confirmando que el efecto muerte es más rápido que en las otras líneas celulares, algo que ya veíamos al teñir el ADN con PI.

Estos resultados indican que la muerte celular producida por el Btz se debe a la apoptosis de las células de LAL-B Ph+.





**Figura 8A:** El tratamiento con Btz induce un aumento de las poblaciones apoptóticas en células de LAL-B Ph+. Las células SUP-B15 y TOM-1 fueron tratadas con 3 nM Btz, las células NALM-20 con 4 nM Btz y las células SD-1 con 5 nM Btz. Se recogieron las células a los tiempos indicados y se tiñeron con Anexina V-PI para su análisis por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo de cuatro experimentos independientes.

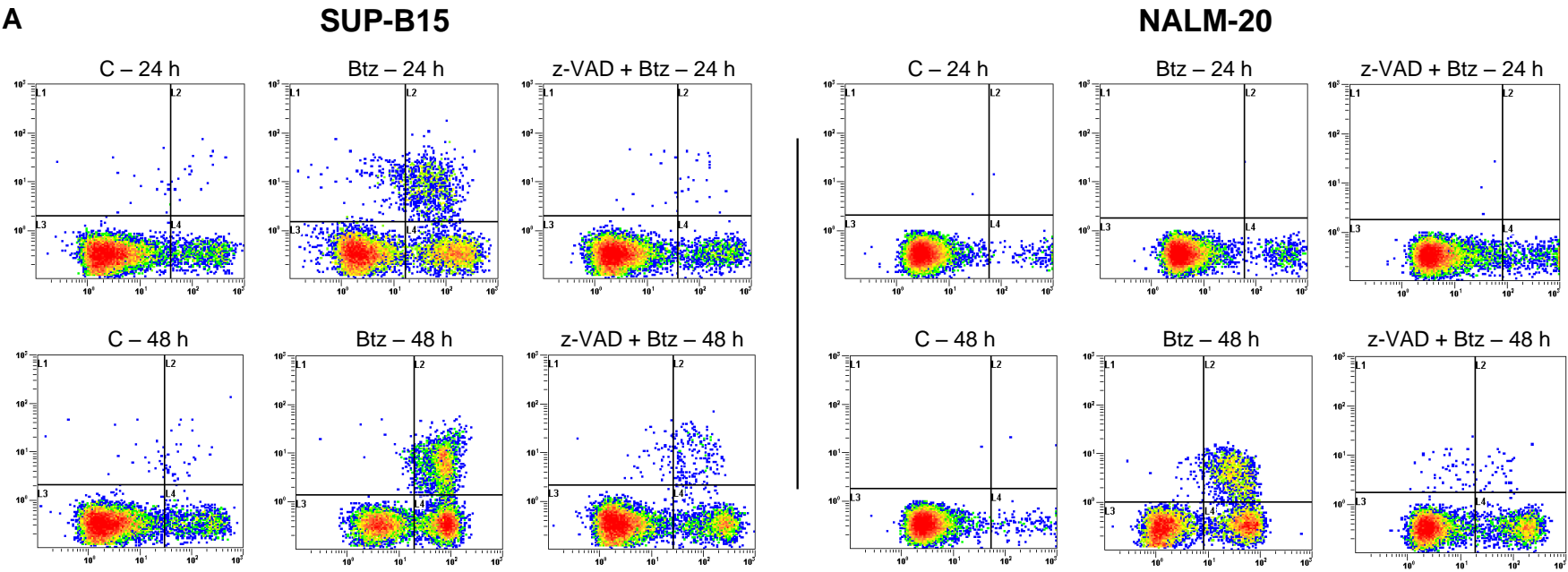
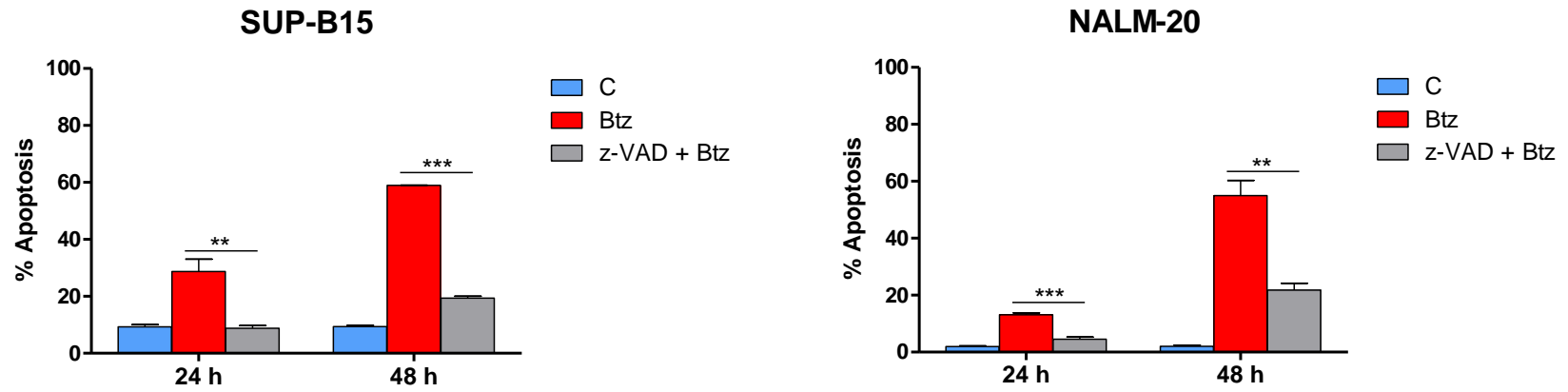


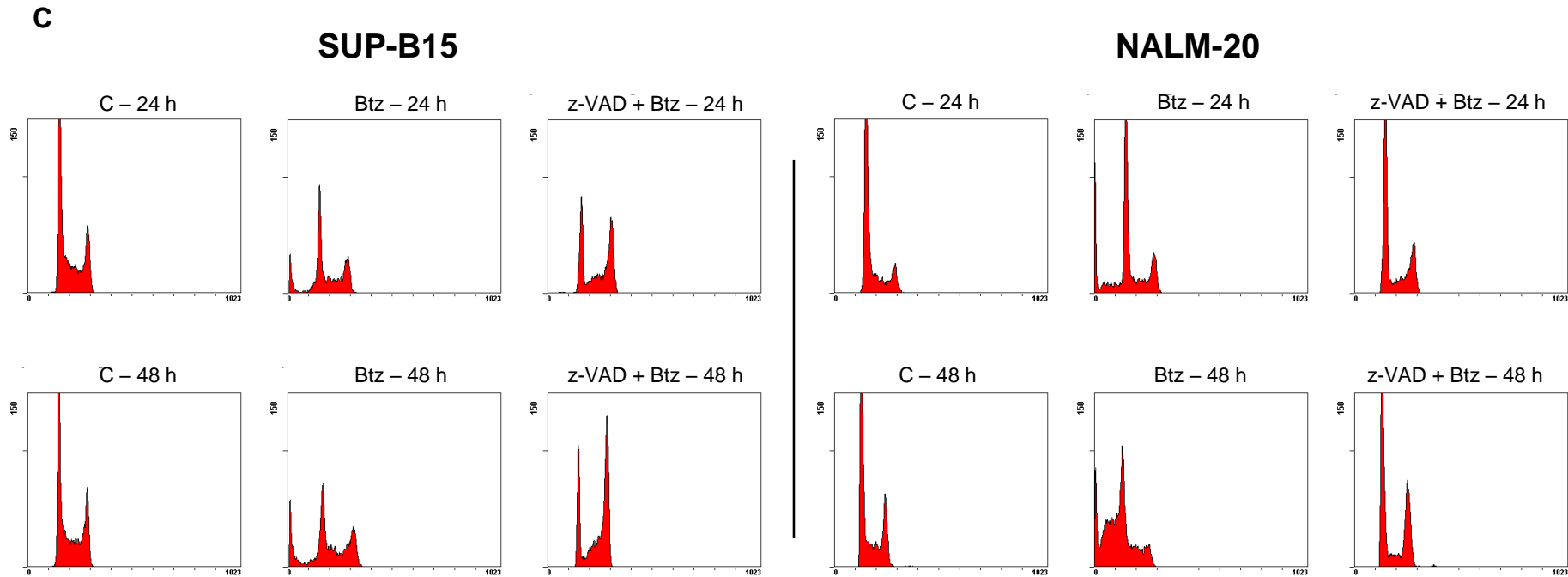
**Figura 8B:** El tratamiento con Btz induce un aumento de las poblaciones apoptóticas en células de LAL-B Ph+. Las barras representan la media + SEM del porcentaje de apoptosis (Anexina V +) de las células analizadas en el apartado A. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### **4.3.1 El Btz induce activación de caspasas**

Una vez comprobado que el Btz induce muerte por apoptosis, como indicaban los cambios en la membrana plasmática y el ADN detectados mediante la tinción con Anexina V-PI, nos planteamos estudiar la implicación de las caspasas en este efecto. Para ello utilizamos dos líneas celulares (SUP-B15 y NALM-20) representativas de la enfermedad estudiada (LAL-B Ph+) y las incubamos en presencia del inhibidor irreversible de caspasas z-VAD a 100  $\mu$ M de concentración. Después de 1 h se trataron las células SUP-B15 con 3 nM Btz, y las células NALM-20 con 4 nM Btz. Pasadas 24 y 48 h se tomaron muestras para su análisis mediante citometría de flujo y Western Blot.

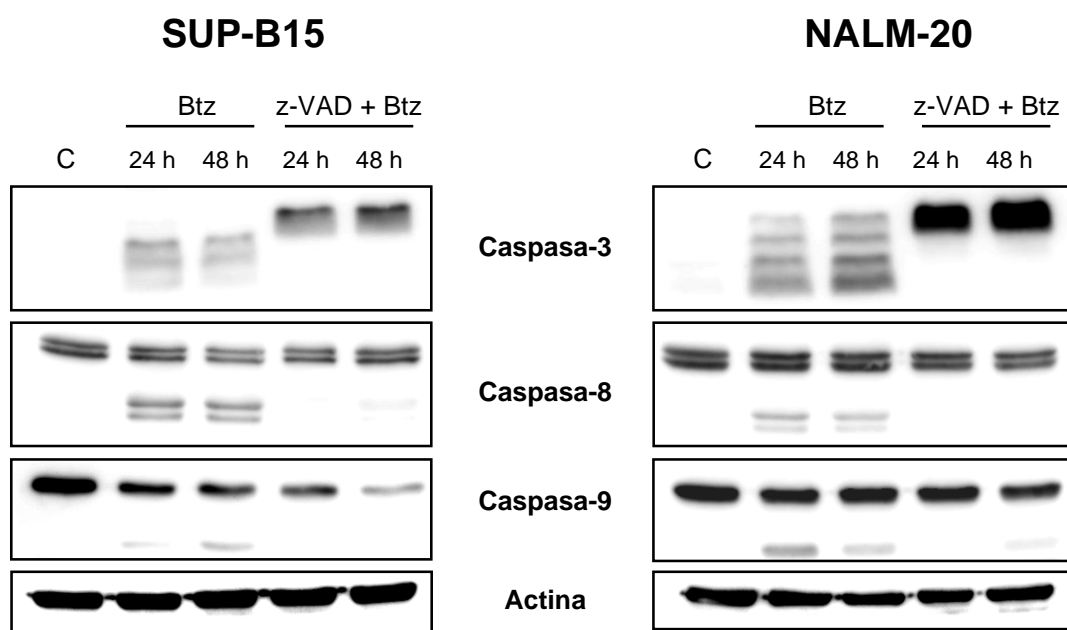
Como se observa en la **Figura 9A**, el pretratamiento con el inhibidor de caspasas z-VAD reduce la muerte por apoptosis inducida por el Btz y presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células incubadas solo con Btz (**Figura 9B**). Además, en las células pretratadas con z-VAD, vemos como el Btz induce acumulación de células en G2/M (**Figura 9C**), acentuándose a las 48 h, confirmando así la parada del ciclo celular en esta fase que ya habíamos visto previamente, pero ya no aparece la población sub-G0/G1 indicativa de muerte.

**A****B**



**Figura 9:** La inhibición de caspasas reduce la muerte celular inducida por Btz en células de LAL-B Ph+. **(A)** Células SUP-B15 y NALM-20 no tratadas (C), tratadas con 3 y 4 nM Btz respectivamente (Btz) y tratadas con 100  $\mu$ M z-VAD 1 h antes de añadir el Btz (z-VAD + Btz) se recogieron a los tiempos indicados y se marcaron con Anexina V-PI. **(B)** Las barras representan la media + SD del porcentaje de células apoptóticas correspondientes a las células marcadas con Anexina V. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). **(C)** Análisis del ciclo celular con PI de las células SUP-B15 y NALM-20 sin tratar (C), tratadas con Btz (Btz) y pretratadas con z-VAD 1 h antes de añadir el Btz (z-VAD + Btz) a las 24 y 48 h. En todos los casos se muestra un ejemplo representativo de un total de tres experimentos independientes.

Para completar nuestro estudio de la implicación de las caspasas en el efecto del Btz, analizamos mediante Western Blot la aparición de la forma procesada (activa) de las caspasas 8 y 9 (caspasas iniciadoras, ver Introducción) y de la caspasa 3 (caspasa efectora). En la **Figura 10** se observa que, al tratar las células SUP-B15 y NALM-20 con Btz, aparecen bandas de menor tamaño correspondientes a las formas activadas de las caspasas 3, 8 y 9, tanto a las 24 h como a 48 h post-tratamiento. Además, el tratamiento previo de las células con el inhibidor z-VAD inhibe, casi completamente, la activación de estas caspasas.



**Figura 10: El Btz induce activación de las caspasas 3, 8 y 9 en células de LAL-B Ph+.** Las células SUP-B15 y NALM-20 no tratadas (C), tratadas con 3 nM Btz y 4 nM Btz respectivamente, y pretratadas con 100  $\mu$ M z-VAD 1 h antes que el Btz (z-VAD+Btz) se estudiaron mediante la técnica de Western Blot. Se recogieron los extractos celulares y se analizaron para ver la expresión de las caspasas 3, 8 y 9. Las bandas de mayor movilidad electroforética corresponden a las formas procesadas (activas) de cada una de las caspasas. La expresión de Actina se utilizó como control de carga. La figura muestra un ejemplo representativo de tres experimentos independientes.

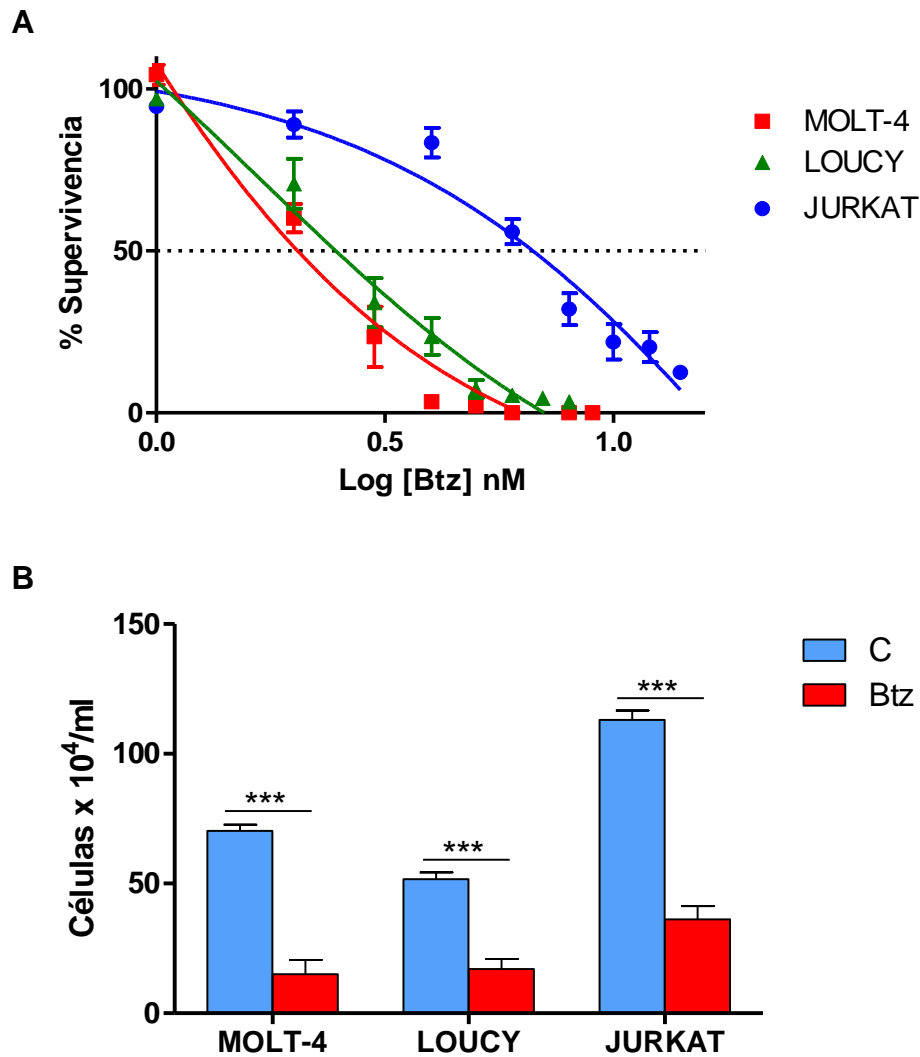
Todos estos resultados revelan que el Btz es eficaz induciendo la muerte de células de LAL-B Ph+ que son resistentes al tratamiento con IM. En primer lugar, este inhibidor del proteosoma provoca una parada del ciclo celular, con bajada de la fase S y acumulación en la fase G2/M, y posteriormente la muerte por apoptosis con activación de caspasas.

#### 4.4 El Btz inhibe la proliferación, detiene el ciclo celular e induce la muerte por apoptosis en células de LAL-T

Después de comprobar que el Btz induce la muerte en células de LAL-B Ph+, quisimos conocer si las células de LAL-T también se ven afectadas por dicho fármaco. Para ello empleamos las líneas celulares MOLT-4, LOUCY y JURKAT a las que cultivamos en presencia del inhibidor a dosis comprendidas en un intervalo de 0 a 10 nM. Pasadas 48 h valoramos y cuantificamos la viabilidad celular mediante tinción con azul tripano y con los datos obtenidos realizamos curvas de supervivencia y proliferación celular.

Como se puede ver en la **Figura 11A**, el Btz reduce la supervivencia en células de LAL-T presentando diferencias estadísticamente significativas respecto a las células sin tratamiento (**Figura 11B**). También aparecen diferencias significativas entre las tres líneas celulares ( $p < 0.0001$ ), haciendo patente que la proliferación de las células y su respuesta al Btz es diferente de una línea celular a otra.

Así mismo, calculamos la  $IC_{50}$  del Btz (**Tabla 3**) y descubrimos que resulta efectivo a dosis similares a las empleadas en las células de LAL-B Ph+. Basándonos en los valores de las  $IC_{50}$  obtenidos, determinamos que la dosis que emplearíamos en los siguientes experimentos sería de 3 nM Btz para las células MOLT-4 y LOUCY, y de 8 nM Btz para las células JURKAT.



**Figura 11: El Btz inhibe el crecimiento en células de LAL-T. (A)** Se representa el porcentaje de la supervivencia celular después de 48 h en cultivo (referido al cultivo control) frente al logaritmo de la concentración de Btz ajustándolo a una curva de regresión no lineal. **(B)** Crecimiento de las células cultivadas sin tratamiento (C), con 3 nM Btz en las células MOLT-4 y LOUCY y 8 nM Btz las células JURKAT (Btz) a las 48 h post-tratamiento. Se muestra la media + SEM de seis experimentos independientes. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) con un post-test de Bonferroni revela diferencias significativas entre las células tratadas con Btz y las células control (\*\*p<0.001).



Línea celular	IC <sub>50</sub> Btz (nM)
MOLT-4	2.59
LOUCY	2.71
JURKAT	8.07

**Tabla 3: IC<sub>50</sub> de Btz para las células de LAL-T.** Estos valores se han obtenido con una significación de  $r \geq 0.97$  a partir del estudio dosis-respuesta a 48 h post-tratamiento de los experimentos de la **Figura 6**.

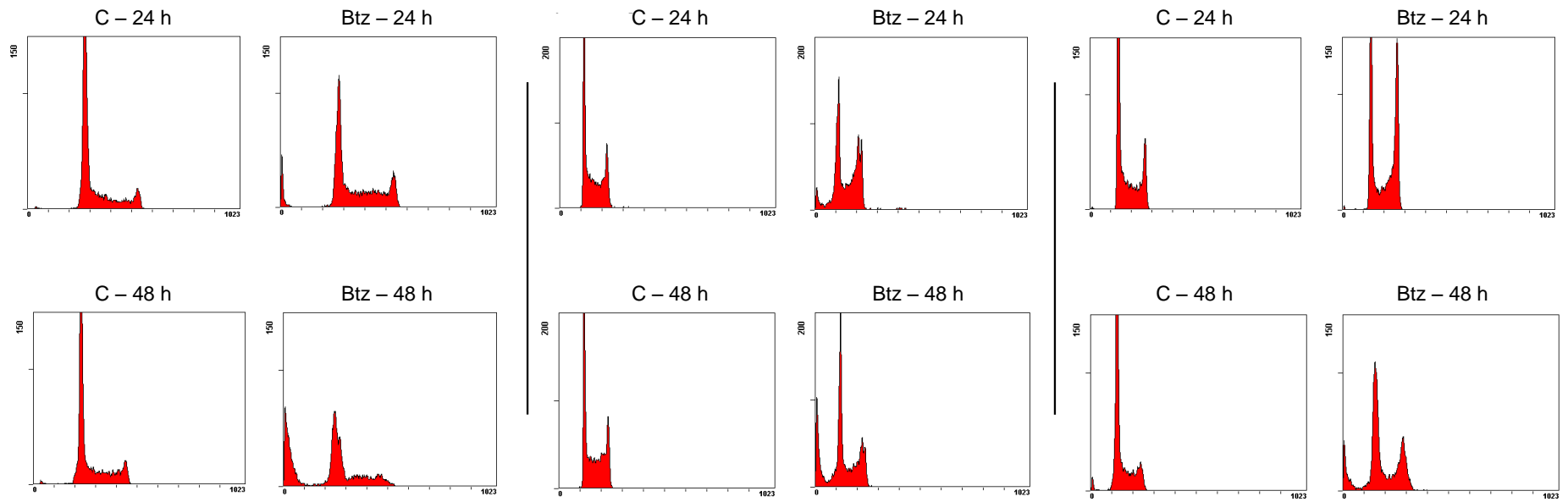
Analizando el perfil del ciclo celular (**Figura 12A**), vemos cómo el Btz provoca inicialmente, a las 24 h, un descenso de la fase S y aumento de la fase G2/M, efectos que se confirman al haber diferencias significativas entre las células control y las células tratadas con el inhibidor (**Figura 12B**) y, en G1, por el contrario, no aparecen cambios significativos (figura no mostrada). Y, finalmente, a las 48 h, se produce un aumento de la población sub-G0/G1 que indica la muerte de las células.

**A**

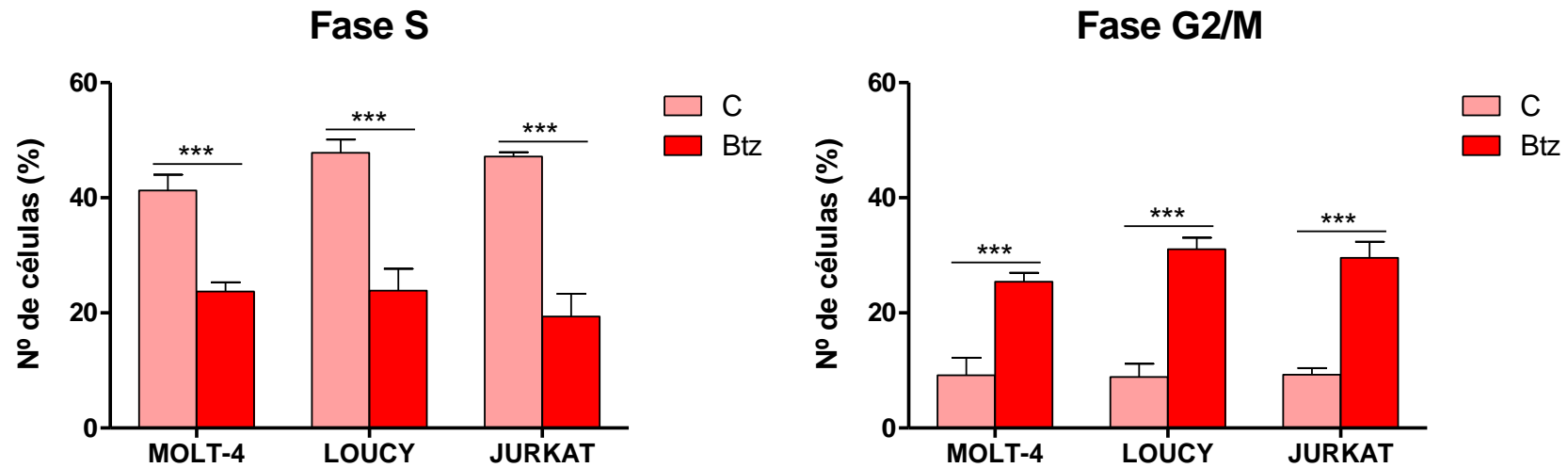
**MOLT-4**

**LOUCY**

**JURKAT**

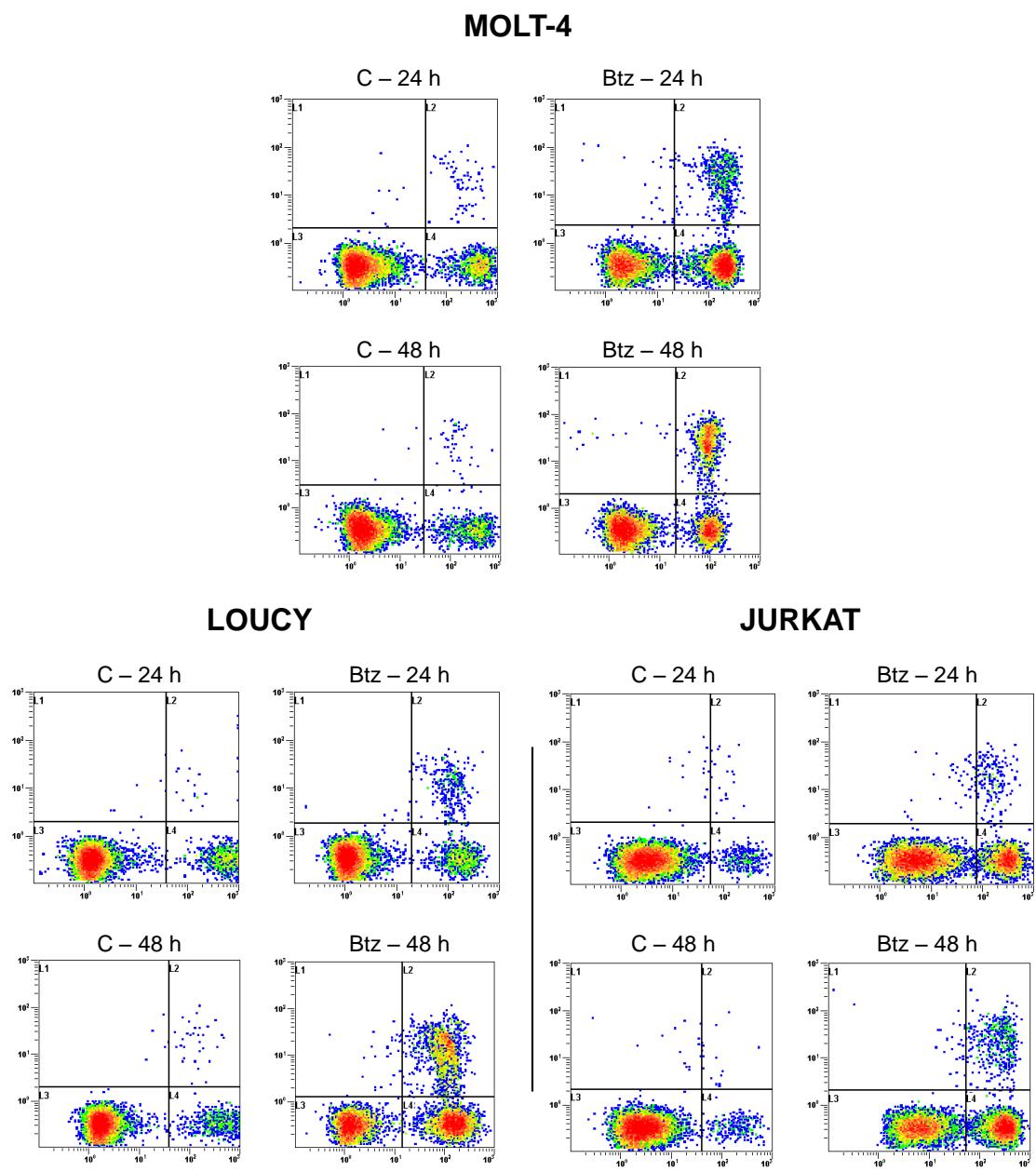


**B**

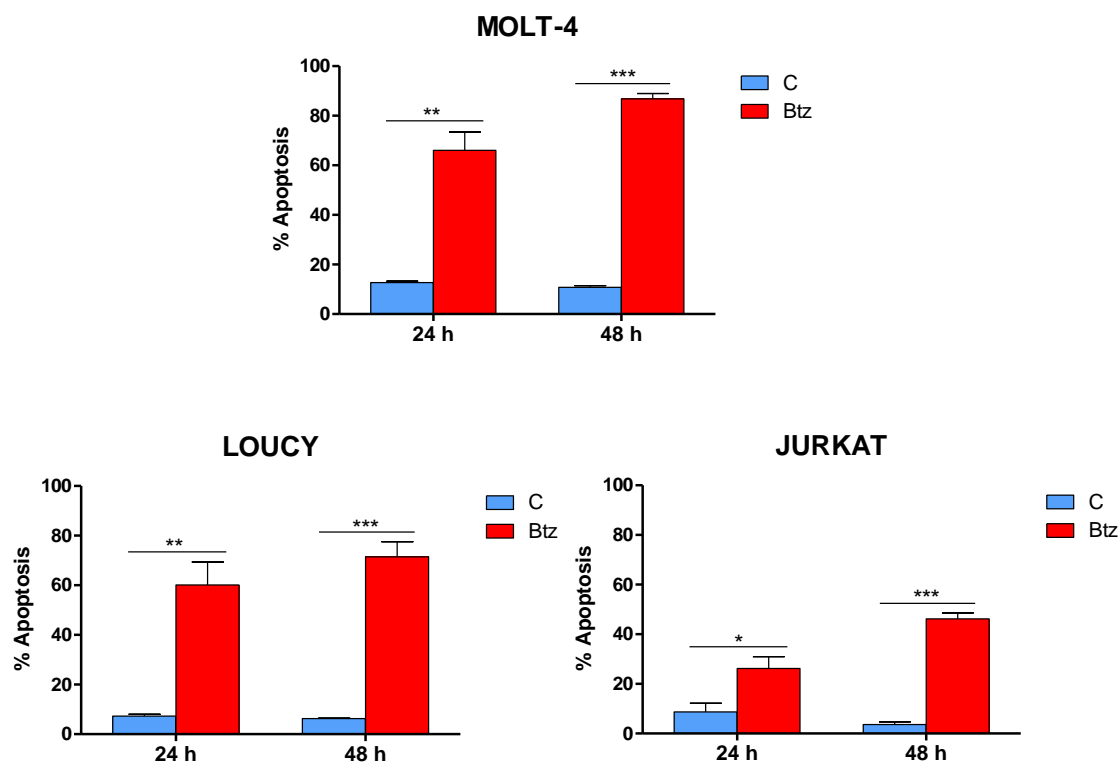


**Figura 12:** El Btz reduce la fase S aumentando la fase G2/M del ciclo celular en células de LAL-T. **(A)** Perfiles de ADN de células MOLT-4, LOUCY y JURKAT sin tratar (C) y tratadas con Btz (Btz). A 24 y 48 h las células fueron teñidas con PI y la proliferación celular fue analizada por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo de cuatro experimentos independientes. **(B)** Porcentaje de la cantidad de células de las fases S y G2/M del ciclo celular según los resultados obtenidos por citometría de flujo tras tinción con PI y analizados mediante el programa Cylchred a las 24 h post-tratamiento. Las barras representan la media + SEM de los experimentos del apartado A. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) se realizó con un post-test de Bonferroni (\*\*p<0.001).

Al estudiar la viabilidad celular mediante la doble tinción con Anexina V-PI (Figura 13A y 13B) vimos que el Btz también provoca la apoptosis en las células de LAL-T, habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con Btz frente a las células control.

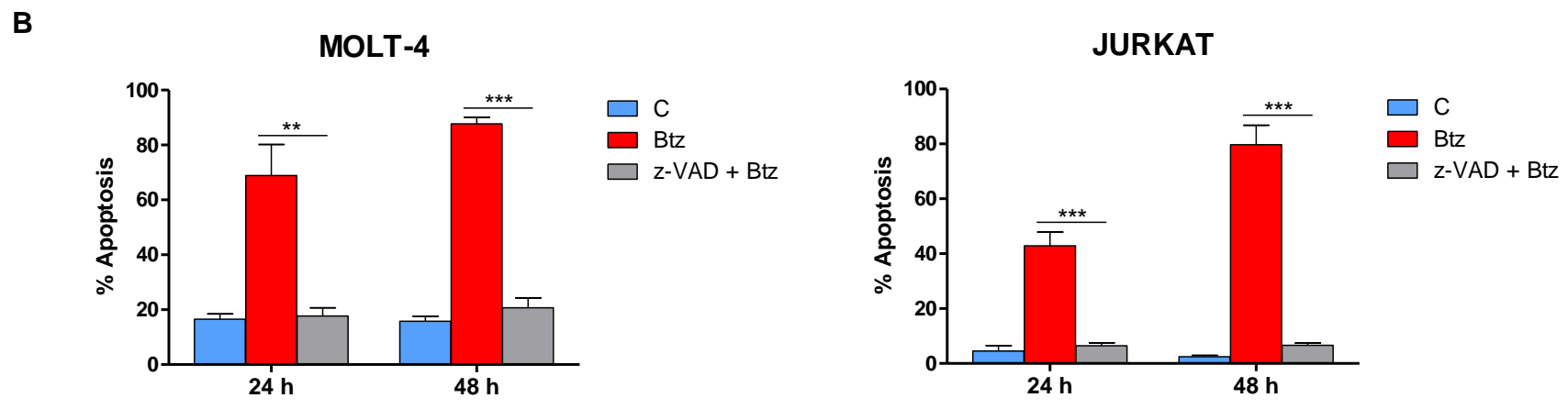
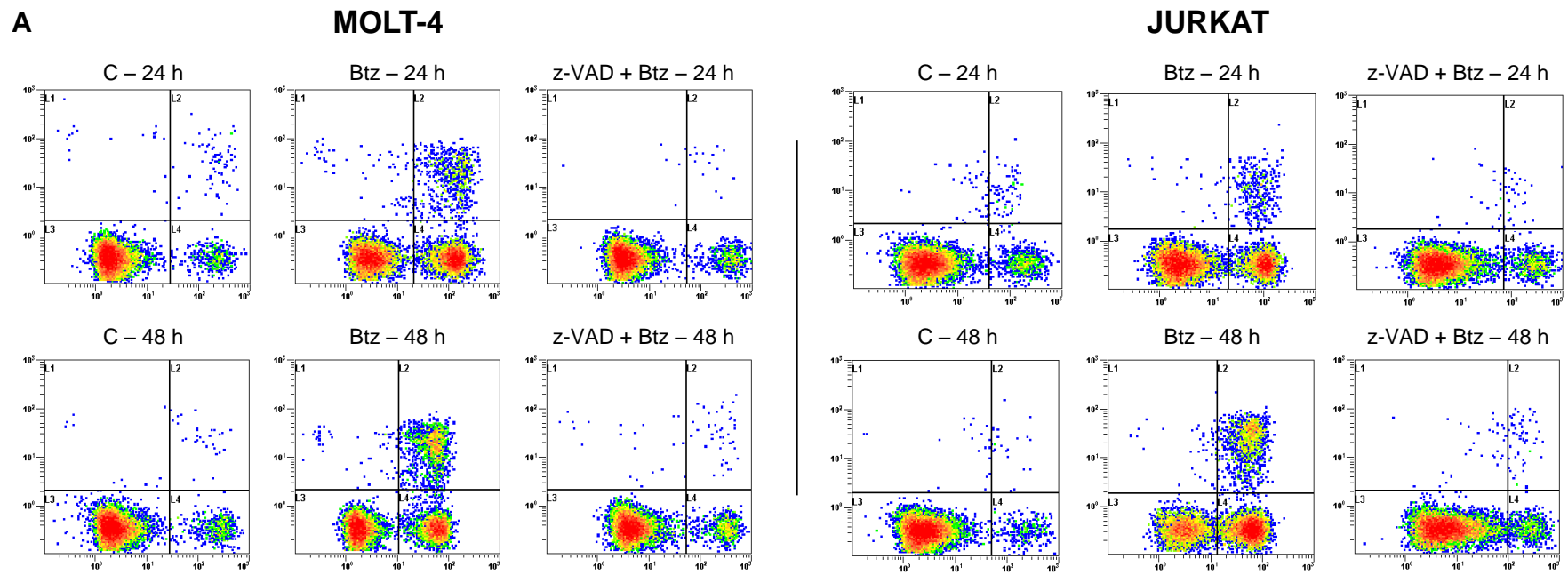


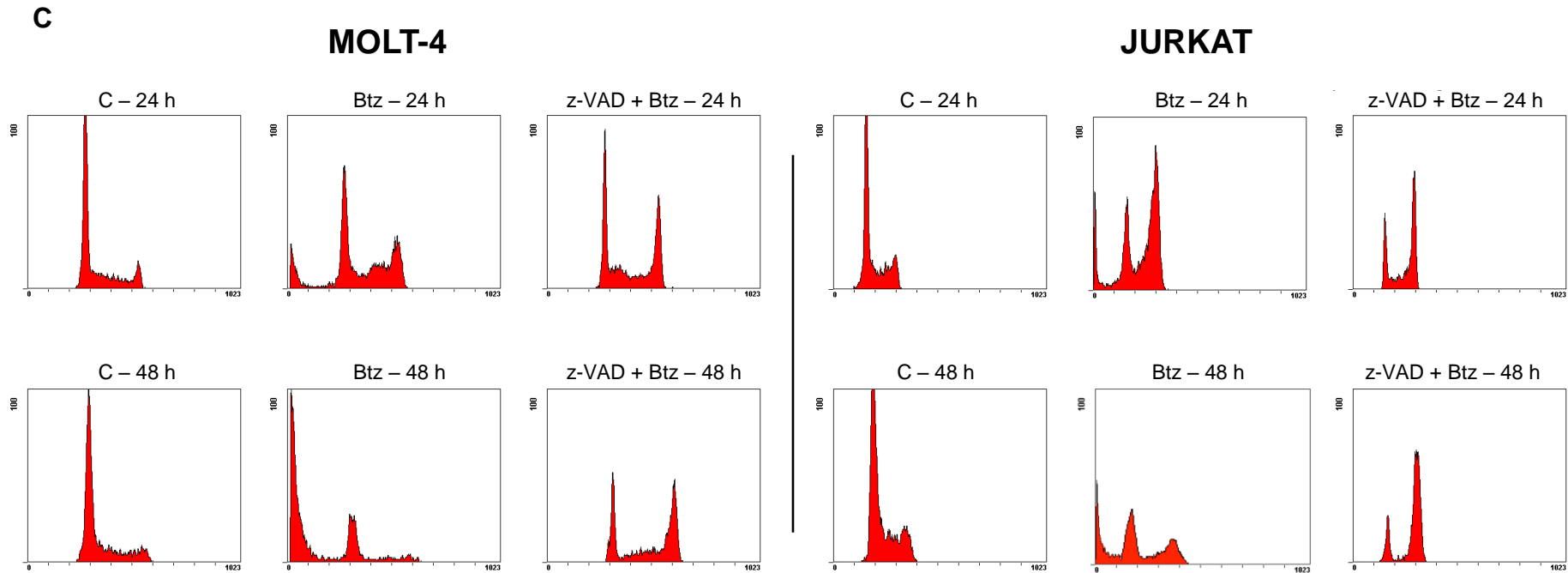
**Figura 13A:** El tratamiento con Btz induce apoptosis en células de LAL-T. Las células MOLT-4 y LOUCY fueron tratadas con 3 nM Btz y las células JURKAT con 8 nM Btz. Se recogieron las células a los tiempos indicados y se tiñeron con Anexina V-PI para su análisis por citometría de flujo.



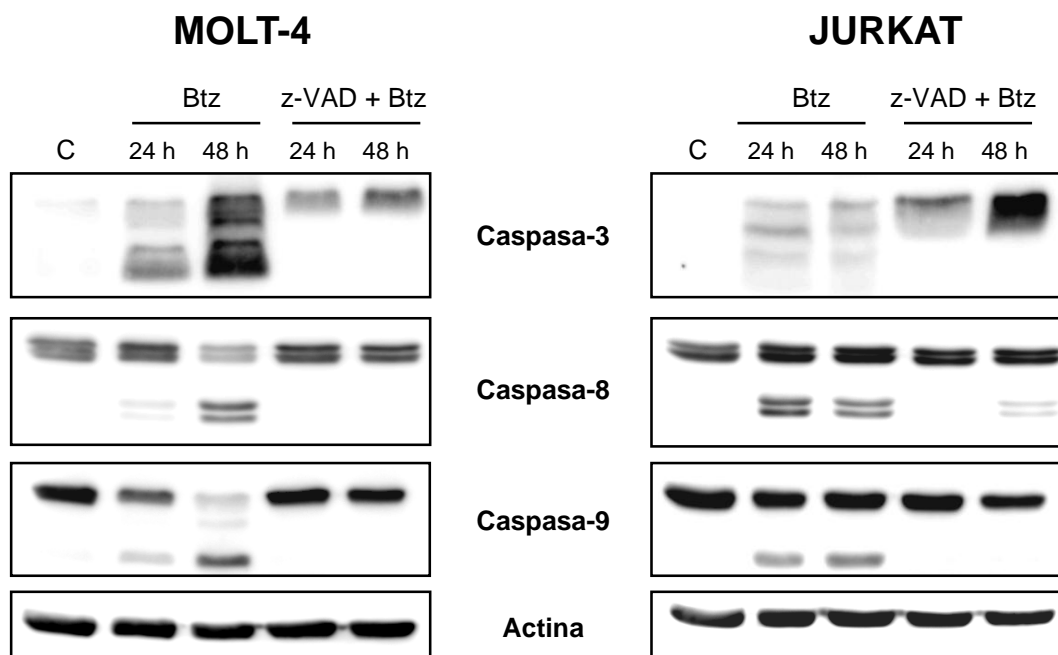
**Figura 13B:** El tratamiento con Btz induce apoptosis en células de LAL-T. Representación del porcentaje de células apoptóticas (Anexina V +) del estudio realizado mediante citometría de flujo. Las barras representan la media + SEM de cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Cuando estudiamos la implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por Btz comprobamos, mediante la doble tinción con Annexina V-PI, que el inhibidor de caspasas z-VAD es capaz de reducir significativamente la muerte celular producida por el Btz (**Figura 14A** y **14B**). En la **Figura 14C**, que muestra el perfil del ciclo celular tras teñir el ADN con PI, se puede ver cómo la inhibición previa de las caspasas reduce la muerte celular haciendo que haya mayor cantidad de células en fase G2/M, efecto propio del Btz. Además, el análisis de la forma procesada (activa) de las caspasas 3, 8 y 9 mediante Western Blot (**Figura 15**) confirma que el Btz induce la activación de las caspasas.





**Figura 14: La inhibición de caspasas reduce la muerte inducida por Btz en células de LAL-T. (A)** Células MOLT-4 y JURKAT no tratadas (C), tratadas con 3 nM Btz y 12 nM Btz respectivamente y tratadas con 100  $\mu$ M z-VAD 1 h antes de añadir el Btz (z-VAD + Btz) se recogieron a los tiempos indicados y se marcaron con Anexina V-PI. En **(B)** las barras representan la media + SD del porcentaje de células apoptóticas correspondientes a las células marcadas con Anexina V. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). **(C)** Análisis del ciclo celular con PI de las células MOLT-4 y JURKAT. En todos los casos se muestra un ejemplo representativo de un total de tres experimentos.



**Figura 15: El Btz induce activación de las caspasas 3, 8 y 9 en células de LAL-T.** Estudio mediante la técnica de Western Blot de las células MOLT-4 y JURKAT control (C), tratadas con 3 o 12 nM Btz, respectivamente (Btz), y pretratadas 1 h antes con el inhibidor de caspasas z-VAD (z-VAD + Btz). Las bandas de mayor movilidad electroforética corresponden a las formas procesadas (activas) de las caspasas 3, 8 y 9. La expresión de Actina se utilizó como control de carga. La figura muestra un ejemplo representativo de tres experimentos independientes.

Con todos estos resultados podemos concluir que el Btz también induce la muerte en células de LAL-T. Primero produce una parada del ciclo celular, con descenso de la fase S y aumento de la fase G2/M, seguido de la activación de caspasas que, finalmente, da lugar a la apoptosis de las células.



#### 4.5 El tratamiento con Btz disminuye la expresión de *Bcl-2* en células de LAL-B Ph+ y LAL-T

Después de comprobar que el Btz induce apoptosis, decidimos estudiar qué vías de señalización de la apoptosis se ven afectadas por este inhibidor. Para realizar los experimentos escogimos aquellas líneas celulares con menor y mayor sensibilidad al Btz, por si la diferente sensibilidad al inhibidor tuviera relación con la expresión de genes implicados en la apoptosis. De tal manera que, de mayor a menor sensibilidad, utilizamos las células SUP-B15 y NALM-20, de LAL-B Ph+, y las células MOLT-4 y JURKAT, de LAL-T. Cultivamos las células a las mismas dosis que en los experimentos anteriores, y pasadas 48 h realizamos la extracción del ARN y su análisis por qRT-PCR (ver Material y Métodos). De esta manera, con el *array* de PCR, conocimos los niveles de expresión de los genes implicados en la apoptosis tanto de las células tratadas con Btz como de las células no tratadas.

Primero analizamos la expresión de los genes implicados en la apoptosis en células sin tratamiento. Al comparar la expresión de los genes de las células más sensibles frente a las más resistentes, SUP-B15 frente a NALM-20 y MOLT-4 frente a JURKAT, descubrimos que coincidían en que las células más resistentes presentan mayor expresión de genes anti-apoptóticos de la familia BAG (*BAG1* en NALM-20 y *BAG3* en JURKAT).

Después comparamos los resultados de expresión de las células tratadas con el inhibidor frente a las células sin tratamiento (control). De esta manera pudimos conocer qué genes ven alterada su expresión y, por tanto, qué vías de transducción de señales quedan afectadas cuando las células son tratadas con Btz. Los valores de expresión de los genes que presentan diferencias entre las células tratadas con Btz con respecto a las células control se muestran en la **Tabla 4**. En esta misma tabla, queda reflejado cómo el Btz induce una menor expresión de *Bcl-2* en todas las líneas celulares y, en diferente medida, favorece la expresión de genes pro-apoptóticos como *BAX*, *DR5*, *FAS* y *FADD*. Así mismo las células menos sensibles al Btz, NALM-20 y JURKAT, presentan una mayor expresión de genes que favorecen la supervivencia (*Akt1*, *BIRC3*, *NOL3* y *GADD45A*) y una menor expresión de *BAD* cuando se encuentran en presencia de Btz.

Líneas celulares	Pro-supervivencia					Pro-apoptosis				
	<i>Bcl-2</i>	<i>Akt1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>NOL3</i>	<i>GADD45A</i>	<i>BAD</i>	<i>BAX</i>	<i>DR5</i>	<i>FAS</i>	<i>FADD</i>
SUP-B15	-4.92							3.03	3	
NALM-20	-3.73	256	12.99	4.60	4.29	-27.86	2	8.57		3.48
MOLT-4	-68.59	-8				2.14				3.03
JURKAT	-51.98		5.28	3.48	10.56	-2.46	2.14	2.83	6	

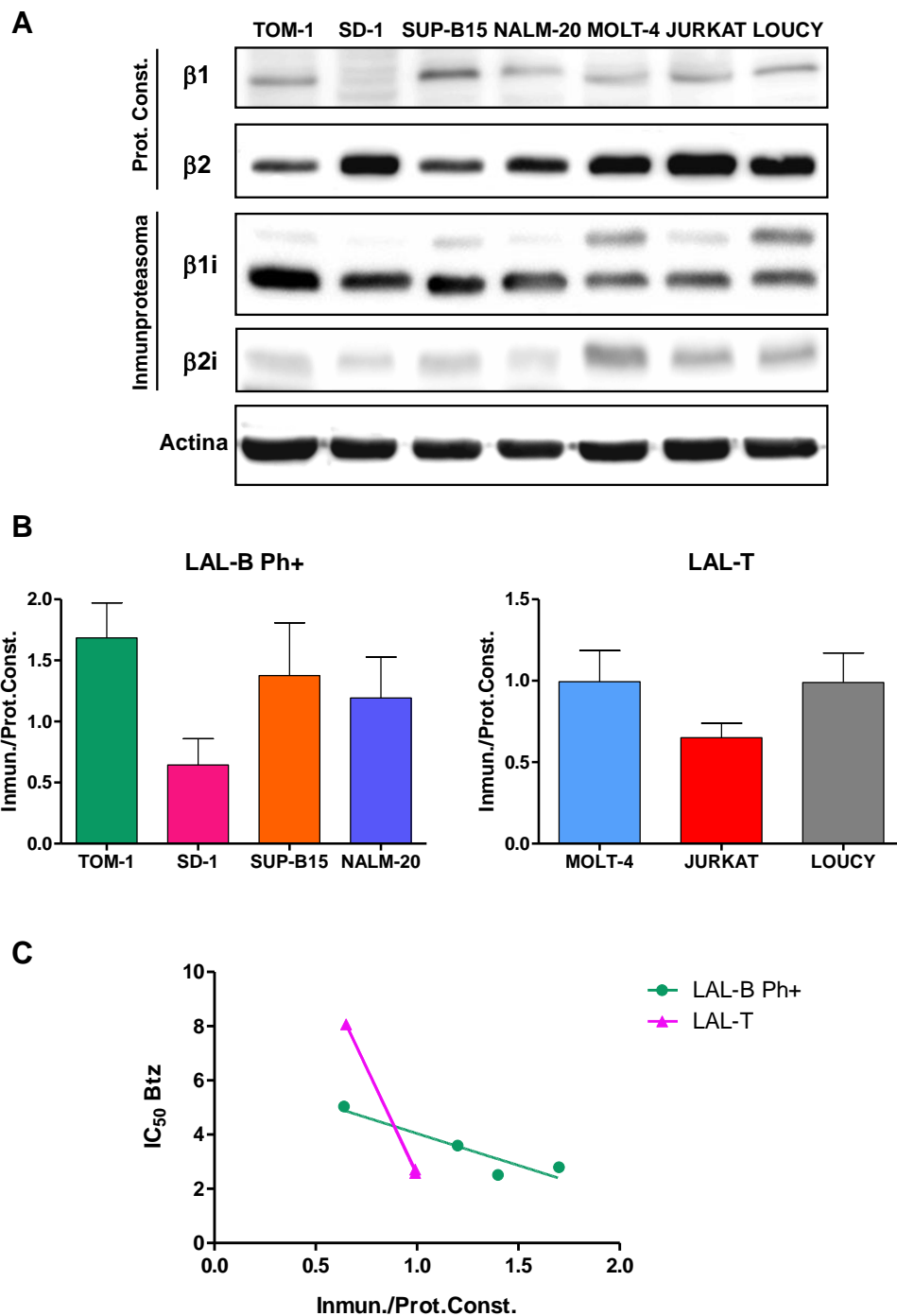
**Tabla 4:** Valores de expresión de genes implicados en la apoptosis, en células SUP-B15, NALM-20, MOLT-4 y JURKAT tratadas con Btz referidos a los valores de expresión de estos mismos genes en las células control (sin tratamiento). Un valor de expresión positivo significa que aumenta la expresión del gen cuando la célula es tratada con Btz, y un valor de expresión negativo significa descenso en la expresión de ese gen cuando la célula es tratada con el fármaco.

Con este estudio podemos decir que el Btz afecta a todas las líneas celulares, da lugar a una menor expresión del gen anti-apoptótico *Bcl-2* y favorece, en diferente medida, la expresión de genes pro-apoptóticos. Además, las células más resistentes (NALM-20 y JURKAT) presentan mayor expresión de genes pro-supervivencia y menor expresión del gen pro-apoptótico *BAD* cuando son cultivadas en presencia de Btz. Esto, junto a la mayor expresión de genes anti-apoptóticos de la familia BAG que aparece en estas mismas células, respecto a las células más sensibles (SUP-B15 y MOLT-4), evidencia que hay una expresión diferencial de los genes implicados en la apoptosis, ya sea de manera natural o como respuesta al tratamiento con el inhibidor, que resulta en una diferente sensibilidad al Btz.

#### 4.6 Las células más resistentes al Btz expresan menos inmunoproteasoma

En los estudios anteriores comprobamos cómo las células SUP-B15, TOM-1, MOLT-4 y LOUCY son más sensibles al Btz que las células NALM-20, SD-1 y JURKAT. Puesto que hay cierta correlación entre la expresión del inmunoproteasoma y la sensibilidad al Btz (Balsas *et al.* 2012; Franke *et al.* 2012) y, por tanto, el ratio inmunoproteasoma *versus* proteasoma constitutivo puede ser valor predictivo de la sensibilidad al inhibidor (Niewerth *et al.* 2013), decidimos analizar la expresión de inmunoproteasoma y proteasoma constitutivo para verificar si se correlaciona con la diferente sensibilidad al Btz.

En este estudio se tomaron muestras de cuatro cultivos sin tratamiento de cada línea celular de LAL-B Ph+ (SUP-B15, TOM-1, NALM-20 y SD-1) y LAL-T (MOLT-4, LOUCY y JURKAT). Las muestras se procesaron para analizarlas mediante Western Blot, como se indica en Material y Métodos. Empleando los anticuerpos anti- $\beta$ 1 (*PSMB6*) y anti- $\beta$ 2 (*PSMB7*) para el estudio del proteasoma constitutivo y anti- $\beta$ 1i (*LMP2*) y anti- $\beta$ 2i (*MECL-1*) para el inmunoproteasoma, pudimos ver y cuantificar la cantidad de proteína expresada correspondiente a cada subunidad (**Figura 16A**). Los valores obtenidos los normalizamos con el de  $\beta$ -Actina e hicimos el promedio de las cuatro muestras tomadas. Después, consideramos que la expresión del proteasoma constitutivo era la suma del valor de  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 y la del inmunoproteasoma la suma de  $\beta$ 1i y  $\beta$ 2i. Con estos datos calculamos el ratio inmunoproteasoma/proteasoma constitutivo de cada línea celular y, pese a no haber diferencias significativas entre las líneas celulares, comprobamos que las células con un ratio menor (SD-1 y JURKAT) son también aquellas que presentan menos sensibilidad al Btz (**Figura 16B**). Además, al estudiar la relación entre los valores  $IC_{50}$  y el ratio inmunoproteasoma/proteasoma constitutivo descubrimos que cuanto mayor es el valor  $IC_{50}$  mayor es la expresión del proteasoma constitutivo (**Figura 16C**), lo cual indica que hay una tendencia que relaciona la sensibilidad al Btz con el tipo de proteasoma expresado.



**Figura 16:** Las células con mayor expresión del proteasoma constitutivo tienden a ser más resistentes al Btz. (A) Estudio mediante Western Blot de la expresión de las diferentes subunidades del inmunoproteasoma y del proteasoma constitutivo en células de LAL-B Ph+ y LAL-T. La expresión de Actina se utilizó como control de carga. Se muestra un ejemplo representativo de cuatro muestras independientes. (B) Las barras representan la media + SEM del ratio inmunoproteasoma/proteasoma constitutivo de las muestras del apartado A. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) reveló que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). En (C) se representa la relación entre el valor  $IC_{50}$  y el ratio inmunoproteasoma/proteasoma constitutivo de las mismas muestras anteriores.

#### 4.7 IM y Btz tienen un efecto sinérgico en células de LAL-B Ph+

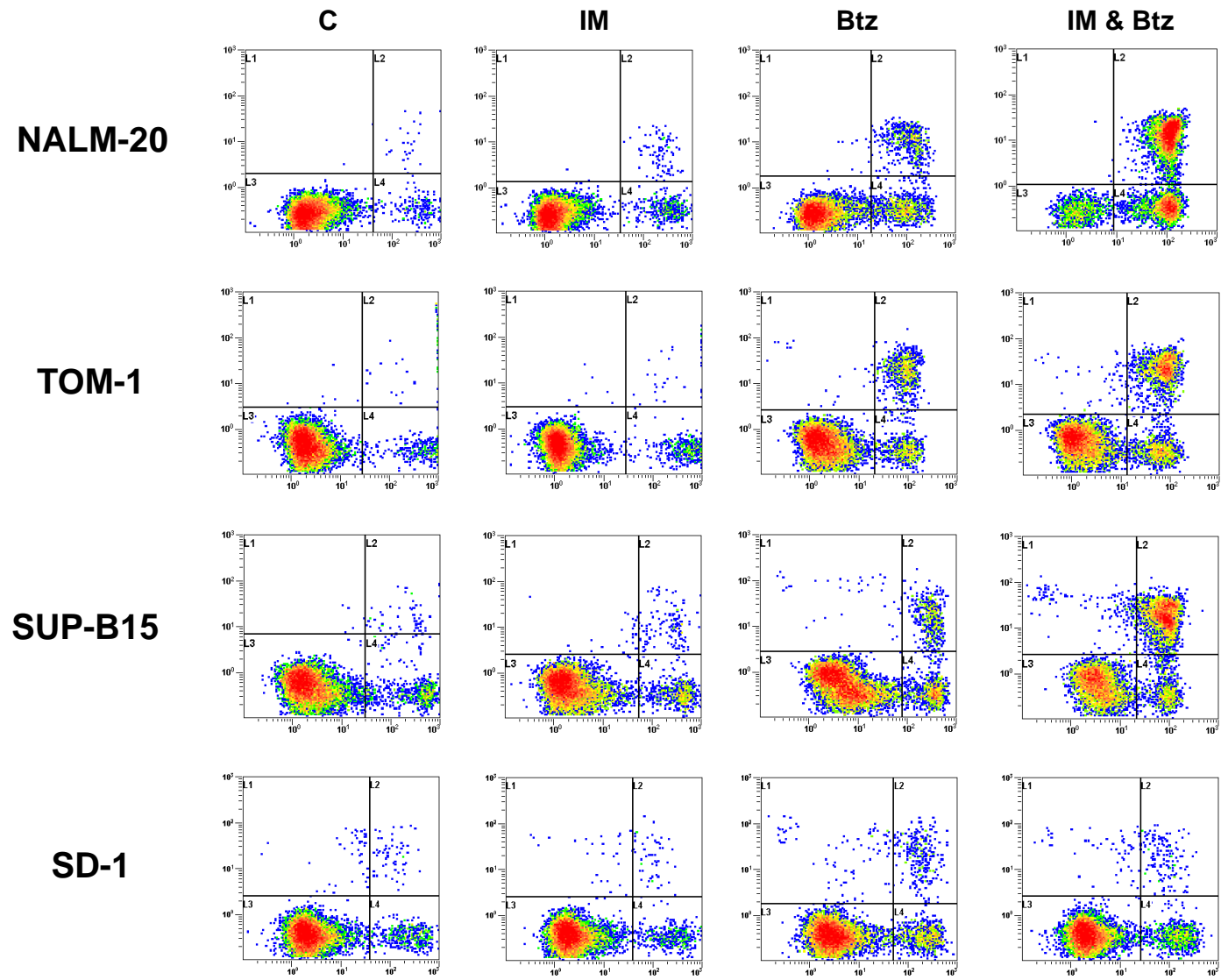
Puesto que el tratamiento con Btz es efectivo en células de LAL-B Ph+, quisimos estudiar si este inhibidor podía mejorar el efecto del IM, que se usa normalmente en el tratamiento de la enfermedad.

Para comprobar el efecto conjunto de ambos fármacos tratamos las células NALM-20, TOM-1, SUP-B15 y SD-1 con IM y Btz administrados, por un lado, de manera individual y, por otro lado, de manera combinada siguiendo un diseño diagonal a un ratio constante (1:100), como se indica en Material y Métodos. Pasadas 48 h en cultivo estudiamos la viabilidad celular mediante citometría de flujo con la doble tinción de Anexina V-PI (**Figura 17A**). Al cuantificar la apoptosis (células Anexina V +) comprobamos que existen diferencias significativas entre el tratamiento conjunto de IM y Btz respecto al tratamiento con Btz a solas en las células NALM-20, TOM-1 y SUP-B15 incluso a dosis inferiores al IC<sub>50</sub> del Btz (**Figura 17B**).

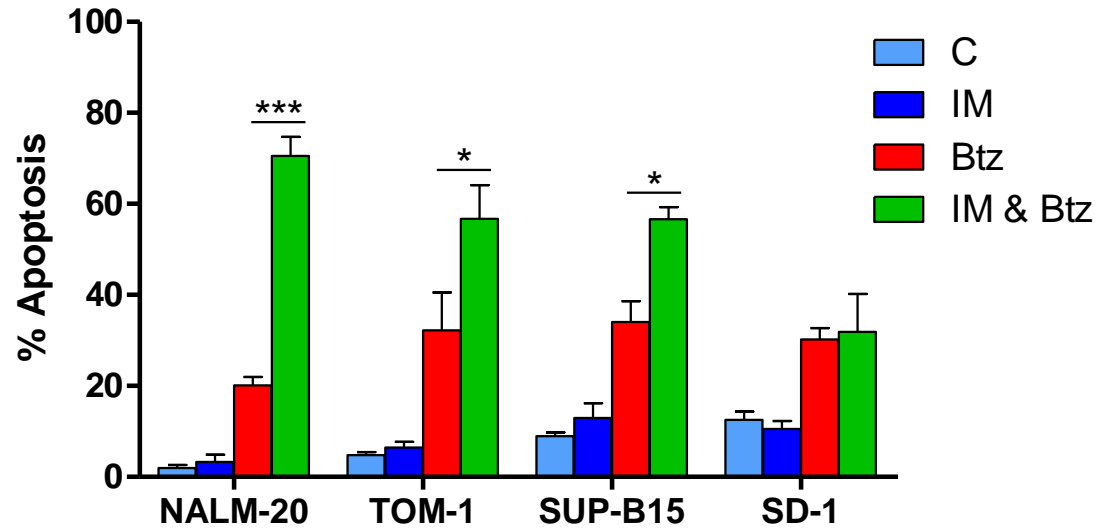
Asimismo, con los datos de apoptosis calculamos el índice de combinación (CI), que es la manera más simple posible de cuantificar si la combinación de dos o más fármacos resulta en un efecto sinérgico (Chou 2010). En el tratamiento contra el cáncer el sinergismo a una elevada dosis efectiva es mucho más relevante que a una dosis efectiva baja (Chou 2006), por esta razón principalmente tuvimos en cuenta los valores CI necesarios para causar un efecto sobre el 90% de las células (DE<sub>90</sub>). Al analizar los datos de apoptosis mediante el programa Calcsyn descubrimos que la aplicación conjunta de IM y Btz resulta en un efecto sinérgico fuerte en las células NALM-20 (CI: 0.42) y TOM-1 (CI: 0.45), moderado en las células SUP-B15 (CI: 0.76) y ausencia de sinergismo para las células SD-1 (CI: 1.28).

Tal y como se ve en la **Figura 18**, el sinergismo se hace evidente en las células NALM-20, TOM-1 y SUP-B15, al aparecer la curva dosis-respuesta en presencia de ambos fármacos (de color rojo) más desplazada hacia la izquierda que en presencia de un solo fármaco, es decir, se produce una caída de la viabilidad a dosis menores. Además, en los isoblogramas (**Figura 19**) los valores CI de la DE<sub>90</sub> quedan representados por debajo de la línea trazada entre ambas dosis efectivas reflejando el efecto sinérgico que tienen el IM y Btz en estas células. Por el contrario, en las curvas dosis-respuesta de las células SD-1 (**Figura 18**) se aprecia como la combinación de IM y Btz produce un descenso de la población menor al producido por el efecto del Btz a solas. También, en el isoblograma correspondiente (**Figura 19**), aparece el valor CI de la DE<sub>90</sub> representado por encima de la línea trazada entre ambas dosis, de manera que es un valor superior a 1 indicando que no hay sinergismo.

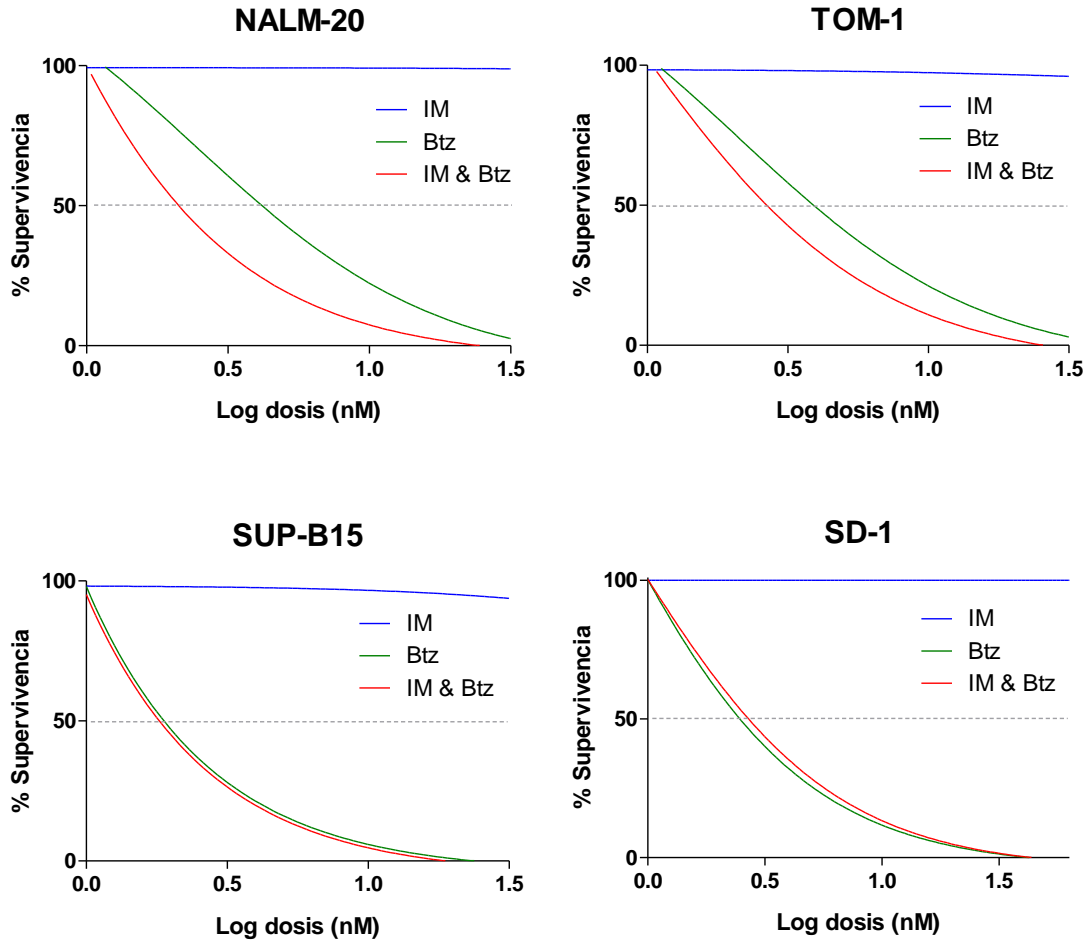
A



**B**

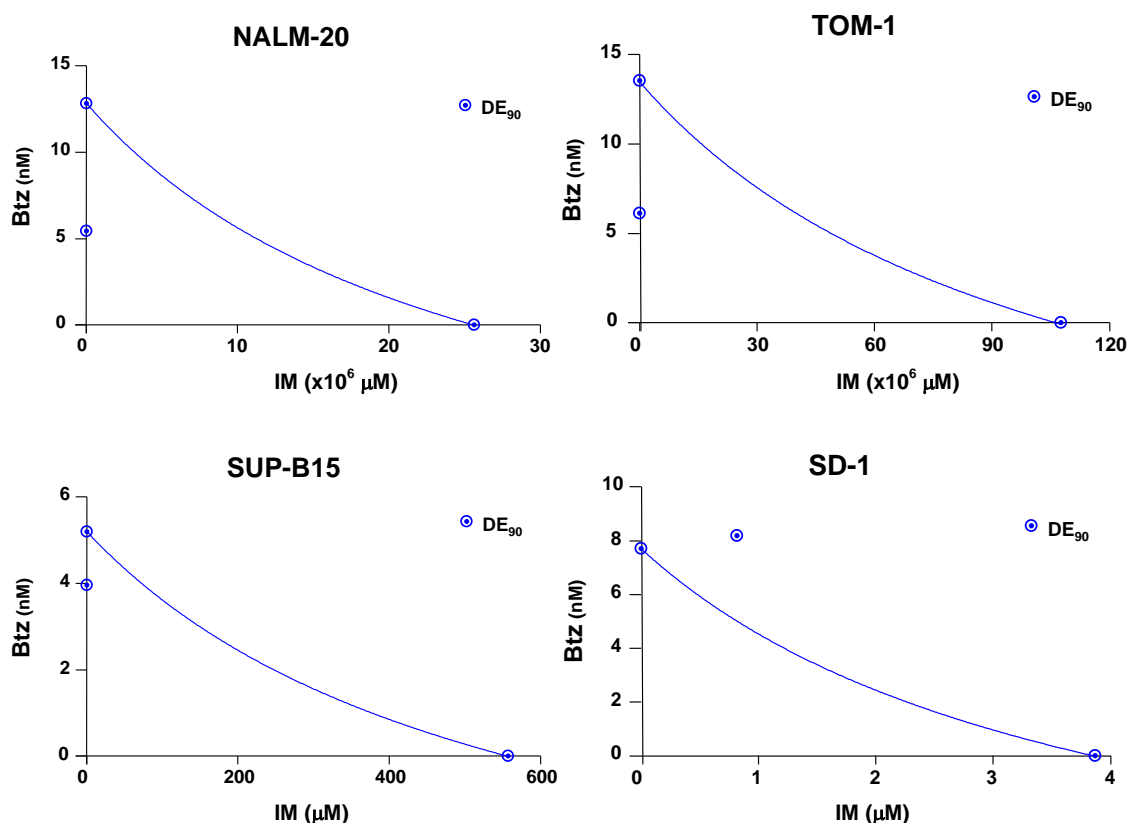


**Figura 17: IM y Btz tienen un efecto sinérgico en células de LAL-B Ph+.** (A) Análisis por citometría de flujo de células de LAL-B Ph+ marcadas con Anexina V-PI a las 48 h en cultivo de células control (C), tratadas con IM (IM), con Btz (Btz) o con IM y Btz administrados simultáneamente (IM & Btz). Las dosis empleadas fueron de 2 nM Btz y/o 0.2  $\mu$ M IM en las células TOM-1 y SUP-B15, 3 nM Btz y/o 0.3  $\mu$ M IM en las células NALM-20, y 4 nM Btz y/o 0.4  $\mu$ M IM en las células SD-1. Se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos independientes. (B) Las barras representan la media + SD del porcentaje de apoptosis (Anexina V +) de los experimentos del apartado A. Además, realizamos el análisis estadístico (ANOVA de dos factores) con un post-test de Bonferroni (\* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001).



**Figura 18:** Curvas dosis-respuesta de células de LAL-B Ph+. Simulación generada con el programa Calcsyn del efecto del IM, Btz y la combinación de ambos (IM & Btz) a partir de los datos de apoptosis (células Anexina V +) obtenidos a las 48 h post-tratamiento en las células NALM-20, TOM-1, SUP-B15 y SD-1.

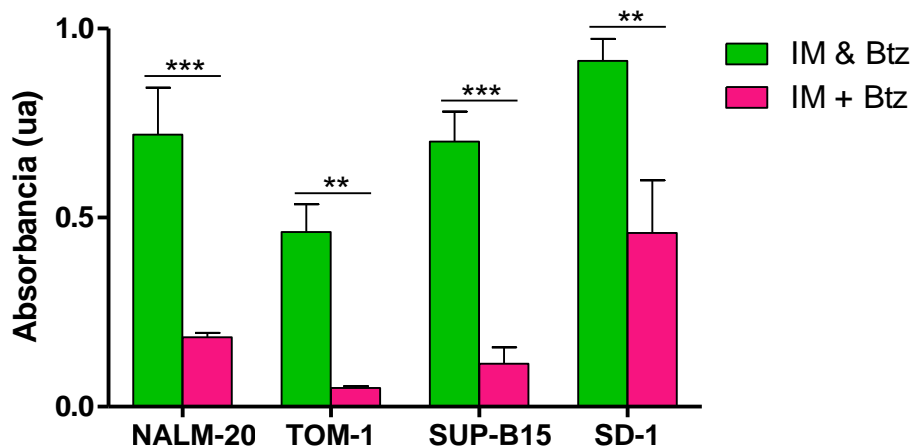




**Figura 19: Isobogramas de células de LAL-B Ph+.** Gráfica generada por el programa Calcsyn a partir de los datos de apoptosis (células Anexina V +) obtenidos a las 48 h post-tratamiento en las células NALM-20, TOM-1, SUP-B15 y SD-1. Se indica la dosis efectiva 90% (DE<sub>90</sub>) de cada fármaco unidas mediante una línea azul, quedando representado por un punto azul el valor de CI para la dosis efectiva en la combinatoria.

En ocasiones, el sinergismo ocurre cuando un fármaco inefectivo puede aumentar cualitativa o cuantitativamente la respuesta de otro fármaco, es lo que se conoce como sinergismo de facilitación o sensibilización. Al comprobar que la aplicación conjunta de IM y Btz producía un efecto sinérgico en las células SUP-B15, TOM-1 y NALM-20 descubrimos que el IM, pese a no tener un efecto significativo (**Figura 6**), debe contribuir de alguna manera con el Btz para que haya un mayor efecto y por eso se produce el sinergismo. Ante la posibilidad de que el IM sensibilice las células frente al Btz, estudiamos si la administración de los inhibidores a diferente tiempo resultaba en un mayor efecto citotóxico. Para este estudio realizamos ensayos de proliferación celular con MTS, como se indica en Material y Métodos, tratando primero con IM y pasadas 24 h con Btz.

La **Figura 20** muestra el crecimiento de las células a la mínima dosis empleada en los experimentos (ver Material y Métodos); así pues, vemos que se produce mayor inhibición en el crecimiento celular cuando aplicamos Btz un día después de haber administrado el IM. Además el análisis estadístico revela diferencias significativas entre el tratamiento secuencial de IM y Btz respecto al tratamiento de los inhibidores al mismo tiempo, incluso empleando dosis inferiores al  $IC_{50}$ .



**Figura 20:** El tratamiento secuencial de IM seguido de Btz inhibe el crecimiento de las células a dosis inferiores al  $IC_{50}$ . Las barras representan el crecimiento celular a las 48 h, referido al crecimiento de las células control, de las células tratadas con IM y Btz administrados simultáneamente (IM & Btz) e IM a tiempo 0 y Btz administrado 24 h después (IM + Btz). Las dosis empleadas fueron de 1 nM Btz y/o 0.1  $\mu$ M IM en las células NALM-20, TOM-1 y SUP-B15 y 3 nM Btz y/o 0.3  $\mu$ M IM en las células SD-1. Se muestra la media + SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico (ANOVA de dos factores) se realizó con un post-test de Bonferroni (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Cuando realizamos el estudio del sinergismo encontramos que los valores CI, a las 48 h post-tratamiento, en el tratamiento secuencial de IM seguido de Btz eran inferiores a los del tratamiento conjunto de los dos inhibidores, resultando en un sinergismo muy fuerte para las células NALM-20, TOM-1 y SUP-B15 (**Tabla 5**).

Línea celular	CI <sub>90</sub> (IM & Btz)	CI <sub>90</sub> (IM + Btz)
NALM-20	0.14	0.05
TOM-1	0.02	0.01
SUP-B15	0.92	0.12
SD-1	1.41	1.01

**Tabla 5:** Valores de CI<sub>90</sub> del tratamiento combinado de Btz e IM administrados al mismo tiempo (IM & Btz) y con 24 de diferencia (IM + Btz).

En resumen, los estudios que hemos realizado revelan que el Btz es capaz de inducir la muerte tanto de células de LAL-T como de LAL-B Ph+. También demostramos que en células Bcr-Abl positivas, donde el IM no es efectivo, se produce un efecto sinérgico cuando se administra el Btz junto al IM en la mayoría de las células estudiadas. Además, nuestros resultados indican que la administración secuencial de IM seguido de Btz, con 24 h de diferencia, resulta en un efecto sinérgico mayor que cuando se administran los dos inhibidores de manera conjunta. Y en el caso en el que no hay efecto sinérgico, como sucede con las células SD-1, administrar primero IM y pasado un tiempo Btz mejora el efecto de este último incluso a dosis inferiores al IC<sub>50</sub>.



## 5 DISCUSIÓN

---

---

*“No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho”*

*Aristóteles (384 AC-322 AC)*



## 5 DISCUSIÓN

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una de las principales causas de mortalidad dentro de las neoplasias hematológicas (Pui 2009; Faderl *et al.* 2010). La presencia de alteraciones cromosómicas, como la que origina el cromosoma Philadelphia y da lugar a la oncoproteína de fusión Bcr-Abl, y la capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a los tratamientos hace que la LAL sea una enfermedad difícil de tratar (Faderl *et al.* 2010). A la luz de estos antecedentes quisimos estudiar nuevas dianas moleculares que permitan mejorar el éxito en el tratamiento de esta enfermedad.

Resultados previos de nuestro grupo demuestran que Bcr-Abl induce la degradación proteasomal del inhibidor del ciclo celular p27<sup>kip1</sup>, y la no degradación de esta proteína es suficiente para detener la progresión del ciclo celular en células de LCM (Andreu *et al.* 2005), lo que indica la gran importancia que tiene la actividad del proteasoma sobre la proliferación de estas células. Además, las células que expresan Bcr-Abl son más sensibles a la inducción de apoptosis por la inhibición del proteasoma que células que no expresan dicha oncoproteína; este hecho ha sido demostrado por nuestro grupo utilizando el Btz como inhibidor del proteasoma (Albero *et al.* 2010) y por otros grupos que utilizan el inhibidor BzLLCOCHO (Crawford *et al.* 2009).

Todos estos estudios sugieren que la expresión de Bcr-Abl está directamente relacionada con la actividad proteasomal, lo que nos hace pensar en el proteasoma como diana terapéutica y en el Btz como inhibidor específico del proteasoma para tratar leucemias Ph+. Además, en células de LAL-T donde mutaciones que activan Notch1 juegan un papel oncogénico principal (Paganin y Ferrando 2011), el Btz es capaz de inhibir el crecimiento celular e inducir la apoptosis al inhibir la expresión de genes diana de Notch1 (Huang *et al.* 2012; Du y Chen 2013). Esto mismo ocurre con NF-κB al verse inhibido vía Notch/Hes1 en el tratamiento con Btz (Espinosa *et al.* 2010), represión que se asocia con una menor carga de la leucemia, prolongada supervivencia de modelos murinos de LAL-T e incluso retraso en el crecimiento del tumor de xenotrasplante de células MOLT-4 (Huang *et al.* 2012). Con estos argumentos, en este trabajo hemos querido caracterizar el uso del inhibidor del proteasoma Btz sobre proliferación y muerte celular por apoptosis de células de LAL, tanto con cromosoma Philadelphia (LAL-B Ph+) como de LAL-T. También, hemos analizado el efecto combinado de IM y Btz sobre las células de LAL-B Ph+, células en las que el tratamiento con IM no es efectivo (Faderl *et al.* 2010; Lee *et al.* 2011).

Utilizando dosis comparables de Btz, en cuanto al efecto sobre el crecimiento de los cultivos celulares, averiguamos que este inhibidor es capaz de detener la proliferación celular en todas las células estudiadas. Al estudiar detenidamente cómo afecta el Btz al ciclo celular para que quede inhibida la proliferación, comprobamos que primero se produce una parada del ciclo celular y, posteriormente, la muerte de las células. Aunque estos efectos ya se han descrito previamente por nuestro grupo en células que expresan Bcr-Abl de LCM (Albero *et al.* 2010), en el presente estudio mostramos como el Btz también afecta de manera similar a la proliferación de células de LAL-B Ph+ y de LAL-T.

En referencia a la parada del ciclo celular provocada por el Btz, nuestros resultados indican que se produce una reducción de la fase S y acumulación de células en G2/M. Este efecto se aprecia mucho mejor cuando tratamos las células con z-VAD para inhibir las caspasas al no producirse la muerte celular. Está descrito en la bibliografía que el Btz afecta a vías implicadas en la progresión del ciclo celular provocando una disminución de la fase S (Gatto *et al.* 2003) y acumulación de las células en diferentes fases según el modelo de estudio. Así, en las células murinas BaF/3-p210, que expresan la proteína Bcr-Abl, se observa una acumulación mayoritaria en G0/G1 (Albero *et al.* 2010), mientras que en otros modelos, como las células KBM-5 y KBM-7 de LCM (Gatto *et al.* 2003), la acumulación de las células se produce mayoritariamente en G2/M. Este hecho también se ha observado en células procedentes de Mieloma Múltiple (Colado *et al.* 2008), de cáncer de pulmón (Zou *et al.* 2006), cáncer de ovario (Bruning *et al.* 2009), cáncer de próstata (Adams *et al.* 1999), neuroblastoma (Brignole *et al.* 2006) e incluso en modelos celulares derivados de pacientes de LAL (Gatto *et al.* 2003; Lu *et al.* 2008; Tao *et al.* 2013). Por lo tanto, aunque queda claro que el Btz detiene la proliferación celular parece que su efecto sobre la maquinaria de control del ciclo celular varía de unos modelos a otros.

En cuanto al mecanismo mediante el cual el Btz provoca la muerte de las células, en los ensayos realizados en nuestros modelos celulares, vemos claramente que se debe a la activación de caspasas ya que el tratamiento con el inhibidor de caspasas z-VAD previene de la muerte celular inducida por el Btz. Además, a nivel molecular comprobamos que el z-VAD impide la aparición de las formas procesadas y por tanto activas de las caspasas iniciadoras 8 y 9 y la caspasa efectora 3 que sí aparecían en las células tratadas únicamente con Btz. Existen numerosos estudios que demuestran que el Btz induce apoptosis por activación de la ruta de las caspasas (Selimovic *et al.* 2013), al producirse una sobreexpresión de las diferentes isoformas



de estas enzimas (Gu *et al.* 2008; Abdi *et al.* 2014). Este hecho ha sido demostrado en células de linfoma del manto y en mieloma múltiple (Kane *et al.* 2007; Suh *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014a) al encontrarse que hay relación directa entre el efecto del Btz y la activación de la apoptosis mediada por caspasas. También, estudios previos de nuestro grupo ya demostraban que el Btz es capaz de inducir apoptosis dependiente de caspasas en células de LCM tanto sensibles como resistentes al IM (Albero *et al.* 2010). Por los resultados obtenidos, que coinciden con estudios previos de nuestro grupo y los realizados por otros investigadores en modelos celulares diferentes a los utilizados en este trabajo, podemos afirmar que la muerte inducida por el Btz en células de LAL-B Ph+ y LAL-T se debe, principalmente, a la activación de la apoptosis mediada por caspasas.

Al ver que el Btz es capaz de inducir apoptosis en células de LAL, estudiamos qué vías de señalización de la apoptosis se ven afectadas por este inhibidor analizando la expresión de genes implicados en la apoptosis. Así mismo, habíamos visto que la sensibilidad de las células al Btz es diferente entre las líneas celulares: en LAL-B Ph+ las células más sensibles son SUP-B15 y TOM-1, y las más resistentes son NALM-20 y SD-1; de LAL-T las células más sensibles son MOLT-4 y LOUCY, y las más resistentes son las JURKAT. Por esta razón quisimos conocer si existe alguna diferencia en la expresión de los genes estudiados que pudiera relacionarse con la diferente sensibilidad de las células a este inhibidor. Abordamos esta cuestión comparando, por un lado, la expresión de genes implicados en la apoptosis de células sensibles frente a las más resistentes y, por otro lado, la expresión de estos mismos genes en células tratadas con Btz frente a células sin tratamiento (control). Además, para un mejor conocimiento de las causas que dan lugar a diferencias en la sensibilidad de las células al Btz, también estudiamos la posibilidad de que el tipo de proteasoma expresado influyera en la sensibilidad al inhibidor. Para ello estudiamos la relación entre la sensibilidad al Btz ( $IC_{50}$ ) y el ratio inmunoproteasoma/proteasoma constitutivo en las diferentes líneas celulares.

De esta manera descubrimos que el Btz induce una menor expresión del oncogén *Bcl-2* en todas las células. B-Cell Lymphoma-2 (*Bcl-2*) es un gen que ejerce su efecto oncogénico promoviendo la supervivencia celular, suprimiendo la muerte, en lugar de promover la proliferación (Adams y Cory 2007; Taylor *et al.* 2008). Se ha visto que aparece en multitud de células tumorales como en el linfoma (Adams y Cory 2007), el cáncer de mama (Soundararajan *et al.* 2008), cáncer de próstata (Khor *et al.* 2007) y células de neuroblastoma (Bender *et al.* 2011). Esto hace pensar que la menor

expresión de *Bcl-2* causada por el Btz, es indicativo de que las células han perdido malignidad. De hecho, en LAL infantil la expresión de *Bcl-2* se usa como valor predictivo del pronóstico de la enfermedad (Liu *et al.* 2014) al encontrarse que los pacientes con una expresión negativa de *Bcl-2* tienen el doble de probabilidad de una completa remisión de la leucemia en comparación con los pacientes *Bcl-2* positivo (Fakler *et al.* 2009).

Al estudiar las posibles causas que dan lugar a diferencias en la sensibilidad de las células al Btz descubrimos que las células más resistentes (NALM-20 y JURKAT) tienen una mayor expresión de genes anti-apoptóticos de la familia BAG respecto a las células más sensibles (SUP-B15 y MOLT-4). También conocimos que las células NALM-20 y JURKAT presentan mayor expresión de genes pro-supervivencia (*Akt1*, *BIRC3*, *NOL3* y *GADD45*) y menor expresión del gen pro-apoptótico *BAD* cuando son cultivadas en presencia de Btz. Además, comprobamos que cuanto mayor es el valor IC<sub>50</sub> mayor es la expresión del proteasoma constitutivo. Por un lado, sabemos que una de las señas de identidad en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo tumoral es la sobreexpresión y/o aumento en la actividad de proteínas que favorecen la supervivencia celular. Proteínas como las de la familia BAG, que mediante su unión a *Bcl-2* regulan el crecimiento celular y bloquean la apoptosis (Doong *et al.* 2002), Akt y GADD45, que participan en la regulación de la respuesta al daño del ADN y en la estabilidad del genoma (Tamura *et al.* 2012), y las proteínas BIRC3 y NOL3, que inhiben la apoptosis al regular negativamente las caspasas (Wagenknecht *et al.* 1999; Medina-Ramirez *et al.* 2011; Rossi *et al.* 2012), forman parte de las mencionadas proteínas pro-supervivencia. Por otro lado, estudios recientes indican que una regulación positiva de las subunidades constitutivas del proteasoma, así como mutaciones en la subunidad  $\beta 5$ , son la razón en muchos casos de una menor sensibilidad al Btz (Balsas *et al.* 2012; Franke *et al.* 2012; Lu y Wang 2013). También se ha visto que altos ratios del inmunoproteasoma *versus* proteasoma constitutivo se correlacionan con un aumento en la sensibilidad a los inhibidores del proteasoma en leucemias agudas pediátricas (Niewerth *et al.* 2013). Según nuestros resultados, la diferencia que aparece en la expresión de los genes pro-supervivencia y pro-apoptóticos en las células NALM-20 y JURKAT cuando se cultivan en presencia de Btz, sugiere que es debida a una mejor respuesta frente al daño producido por el Btz en estas células. Este hallazgo junto a la mayor expresión de genes anti-apoptóticos de la familia BAG por estas mismas células y la relación que observamos entre la expresión del proteasoma constitutivo y la resistencia al Btz, explicaría por qué son necesarias dosis mayores de Btz en las células NALM-20 y JURKAT respecto a las

células SUP-B15 y MOLT-4 para obtener un mismo efecto. Con estos resultados podemos decir que hay una expresión diferencial en los genes implicados en la apoptosis, de manera natural o como respuesta al tratamiento con el inhibidor, que resulta en una diferente sensibilidad al Btz. Además, existe relación entre la sensibilidad al Btz y el tipo de proteasoma expresado y, por tanto, el ratio inmunoproteasoma *versus* proteasoma constitutivo y la expresión de BAG pueden servir como valor predictivo de la sensibilidad al inhibidor en células de LAL-B Ph+ y LAL-T.

A los pacientes con LAL-B Ph+ actualmente se les trata con un inhibidor de tirosina quinasa en combinación con quimioterapia y, si es posible, con el trasplante alogénico de células madre (Ottmann y Pfeifer 2009; Bassan 2014). El inhibidor de tirosina quinasa IM se ha convertido en parte integral de la terapia de primera línea, al ser de los pocos fármacos que es específico de las células leucémicas Bcr-Abl positivas. Pero el beneficio clínico es, generalmente, de corta duración puesto que la mayoría de los pacientes sufren recaída a menos que se sometan a un trasplante alogénico de células madre (Ottmann y Pfeifer 2009). Nuestros resultados indican que administrar de manera conjunta IM y Btz resulta en un efecto sinérgico induciendo la muerte en todas las células estudiadas excepto en las SD-1; células menos sensibles al Btz, con mayor IC<sub>50</sub>, y que expresan menor cantidad de inmunoproteasoma. Además, cuando tratamos primero con IM y pasadas 24 h con Btz se produce una mayor inhibición del crecimiento celular, el efecto sinérgico de los fármacos es mayor que cuando se dan al mismo tiempo e incluso es efectivo en células SD-1 en las que no hay sinergismo cuando IM y Btz se dan conjuntamente. De manera que la combinación de IM y Btz podría ser una alternativa al tratamiento único con IM.

Existen estudios donde se ha visto que Bcr-Abl regula positivamente BCL-2 (Sanchez-Garcia y Grutz 1995) a través de STAT-5, inhibe la liberación del citocromo c (Amarante-Mendes *et al.* 1998) y previene la activación de la caspasa 9 (Deming *et al.* 2004). Por tanto, Bcr-Abl confiere resistencia a la apoptosis en las células leucémicas. Hu y colaboradores, describieron un efecto sinérgico al administrar de manera combinada IM y Btz en células que expresan Bcr-Abl (K562) y células leucémicas primarias CD34+ de pacientes con LCM. Además observan que la aplicación conjunta de IM y Btz causa colapso del potencial de membrana en la mitocondria, una regulación negativa de BCL-2, un incremento del citocromo c citoplasmático y activación de las caspasas 9, 8 y 3 (Hu *et al.* 2009). Nuestros resultados, en concordancia con éstos, sugieren que, en la combinación de los dos fármacos, el Btz

regula negativamente BCL-2 y activa las caspasas, por un lado, y, por otra parte, el IM inhibe a Bcr-Abl/STAT-5 que a su vez podría potenciar la regulación negativa de BCL-2 y la activación de las caspasas (Di Bacco y Cotter 2002). Además, las caspasas activadas pueden mejorar el catabolismo de Bcr-Abl y su inactivación. Por tanto, administrar IM más Btz puede desencadenar una retroalimentación positiva en la red de señalización de la apoptosis, que conduce a una amplificación significativa de los efectos apoptóticos de cada fármaco (Hu *et al.* 2009). De esta manera se explicaría el efecto sinérgico pro-apoptótico de la aplicación conjunta de IM y Btz hallado en las células NALM-20, TOM-1 y SUP-B15.

Respecto al efecto que vemos al administrar IM y 24 h después Btz en los cultivos celulares, Crawford y colaboradores observaron un efecto parecido al ver que la administración secuencial del IM seguido de un inhibidor del proteasoma, BzLLCOCHO en este caso, resulta en un mayor efecto que el obtenido cuando se invierte este orden o se añaden de manera simultánea los inhibidores en células de LCM (Crawford *et al.* 2009). Los estudios de la estructura cristalina de la unión del IM con el dominio quinasa c-Abl han demostrado que es necesaria la conformación específica inactiva de Abl para que el IM se pueda unir (Schindler *et al.* 2000). La potencia del IM contra las formas activas de Bcr-Abl surge de la naturaleza dinámica de las moléculas quinasa, que pueden cambiar entre forma inactiva y activa transitoriamente, permitiendo al IM que pueda unirse (Nagar *et al.* 2002). Así, hipotéticamente, al tratar primero con IM se deja tiempo para que este inhibidor interactúe con un mayor número de moléculas de Bcr-Abl inhibiendo más las vías de señalización afectadas por esta proteína. Esto permite que el inhibidor del proteasoma actúe de manera óptima dando como resultado un mayor efecto de la combinación de los dos fármacos (Crawford *et al.* 2009).

En nuestro trabajo, observamos cómo el Btz en primer lugar provoca la inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis, y a continuación induce la apoptosis causando la muerte en todas las células estudiadas tanto de LAL-B Ph+ como de LAL-T. A su vez, nuestros resultados se suman a los publicados anteriormente por nuestro grupo (Albero *et al.* 2010), donde se indicaba que la resistencia al IM no parece influir en la sensibilidad al Btz en células Bcr-Abl positivas. Así mismo, el hallazgo de sinergismo entre IM y Btz abre un nuevo campo de acción en cuanto a la clínica de la LAL-B Ph+. Además, la administración a dosis inferiores al IC<sub>50</sub> y a diferentes tiempos, primero IM y 24 h después Btz, resulta en una clara inducción de la muerte celular incluso en células SD-1, células poco sensibles al Btz y

en las que IM y Btz administrados conjuntamente no tienen efecto sinérgico. Este hecho no solo ofrece una mejor efectividad en el tratamiento de esta leucemia, sino también en la reducción de los efectos secundarios asociados a estos fármacos. Son especialmente relevantes nuestros resultados puesto que los regímenes basados en la utilización de un inhibidor de Bcr-Abl, como el IM, constituyen en la actualidad la elección de primera línea en el tratamiento de leucemias con cromosoma Philadelphia. Por esta razón, en LAL-B Ph+, la administración de IM, pese a tener poco efecto, seguido de Btz es beneficiosa para inducir la apoptosis de las células. Estos resultados, por tanto, ofrecen la posibilidad de desarrollar técnicas más apropiadas en el tratamiento de las células de leucemia aguda linfoblástica tanto tipo B Ph+ como tipo T.



## 6 CONCLUSIONES

---

---

*“Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí”*

*Confucio (551 AC- 478 AC)*





## 6 CONCLUSIONES

1. El tratamiento con Btz reduce la proliferación celular, produce acumulación en la fase G2/M del ciclo celular e induce muerte por apoptosis en células de LAL-B Ph+ y de LAL-T.
2. Las líneas más resistentes a Btz expresan mayor cantidad de proteínas anti-apoptóticas de la familia de BAG.
3. El tratamiento con Btz induce una menor expresión de *Bcl-2* en todas las líneas estudiadas. Además, hay una expresión diferencial de genes implicados en la apoptosis entre las líneas celulares al tratarlas con Btz que correlaciona con una diferente sensibilidad al fármaco.
4. Existe relación entre la sensibilidad al Btz y el tipo de proteasoma expresado, es decir, a mayor inmunoproteasoma expresado mayor sensibilidad al Btz. Por tanto, el ratio inmunoproteasoma *versus* proteasoma constitutivo puede servir como valor predictivo de la sensibilidad al inhibidor en células de LAL.
5. El tratamiento combinado con IM y Btz tiene un efecto sinérgico en la mayoría de células Bcr-Abl positivas, excepto las células SD-1 que son las menos sensibles a Btz y las que expresan una menor cantidad de inmunoproteasoma.
6. El IM sensibiliza a las células frente al Btz, de tal forma que la administración secuencial de IM seguido de Btz, con una diferencia de 24 h, produce un efecto sinérgico mayor que al administrar los fármacos de manera conjunta en todas las líneas estudiadas, incluyendo la línea SD-1.
7. Con nuestros resultados podemos proponer el proteasoma como diana terapéutica y el uso del Btz para inducir la apoptosis en células de LAL, pudiendo utilizarse la expresión del inmunoproteasoma como valor predictivo de la respuesta al tratamiento con Btz. La administración consecutiva de IM seguido de Btz podría suponer una mejoría en el tratamiento de leucemias Bcr-Abl positivas.



## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

---

*“Dadas las circunstancias adecuadas, sin más base que los sueños, la determinación y la libertad de intentarlo, personas muy corrientes hacen constantemente cosas extraordinarias”*

*Dee Ward Hock (1929-)*



## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. y Redegeld, F.A., 2014. Toll-like receptor (TLR)-1/2 triggering of multiple myeloma cells modulates their adhesion to bone marrow stromal cells and enhances bortezomib-induced apoptosis. *PLoS one* **9**: e96608.
- Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S. y Elliott, P.J., 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research* **59**: 2615-2622.
- Adams, J.M. y Cory, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.
- Agarwal, A.K., Xing, C., De Martino, G.N., Mizrachi, D., Hernandez, M.D., Sousa, A.B., Martinez de Villarreal, L., Dos Santos, H.G. y Garg, A., 2010. PSMB8 encoding the beta5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *American journal of Human Genetics* **87**: 866-872.
- Albero, M.P., Vaquer, J.M., Andreu, E.J., Villanueva, J.J., Franch, L., Ivorra, C., Poch, E., Agirre, X., Prosper, F. y Perez-Roger, I., 2010. Bortezomib decreases Rb phosphorylation and induces caspase-dependent apoptosis in Imatinib-sensitive and -resistant Bcr-Abl1-expressing cells. *Oncogene* **29**: 3276-3286.
- Amarante-Mendes, G.P., Naekyung, Kim C., Liu, L., Huang, Y., Perkins, C.L., Green, D.R. y Bhalla, K., 1998. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* **91**: 1700-1705.
- Andreu, E.J., Lledo, E., Poch, E., Ivorra, C., Albero, M.P., Martinez-Climent, J.A., Montiel-Duarte, C., Rifon, J., Perez-Calvo, J., Arbona, C. *et al.*, 2005. BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer research* **65**: 3264-3272.
- Arima, K., Kinoshita, A., Mishima, H., Kanazawa, N., Kaneko, T., Mizushima, T., Ichinose, K., Nakamura, H., Tsujino, A., Kawakami, A. *et al.*, 2011. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 14914-14919.
- Attar, E.C., De Angelo, D.J., Supko, J.G., D'Amato, F., Zahrieh, D., Sirulnik, A., Wadleigh, M., Ballen, K.K., McAfee, S., Miller, K.B. *et al.*, 2008. Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* **14**: 1446-1454.
- Balsas, P., Galan-Malo, P., Marzo, I. y Naval, J., 2012. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSMbeta5 overexpression and polyploidy. *Leukemia research* **36**: 212-218.
- Bassan, R., 2014. Ph+ ALL: imatinib grows older with patients. *Blood* **123**: 801-803.
- Ben-Bassat, H., Shlomai, Z., Kohn, G. y Prokocimer, M., 1990. Establishment of a human T-acute lymphoblastic leukemia cell line with a (16;20) chromosome translocation. *Cancer genetics and cytogenetics* **49**: 241-248.

- Bender, A., Opel, D., Naumann, I., Kappler, R., Friedman, L., Von Schweinitz, D., Debatin, K.M. y Fulda S., 2011. PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene* **30**: 494-503.
- Berridge, M.V. y Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics* **303**: 474-482.
- Boccadoro, M., Morgan, G. y Cavenagh, J., 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* **5**: 18.
- Brignole, C., Marimpietri, D., Pastorino, F., Nico, B., Di Paolo, D., Cioni, M., Piccardi, F., Cilli, M., Pezzolo, A., Corrias, M.V. *et al.*, 2006. Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **98**: 1142-1157.
- Bruning, A., Burger, P., Vogel, M., Rahmeh, M., Friese, K., Lenhard, M. y Burges, A., 2009. Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. *Investigational new drugs* **27**: 543-551.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B.J. y Lydon, N.B., 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer research* **56**: 100-104.
- Cadwell, K. y Coscoy, L., 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**: 127-130.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. y Letai, A., 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell* **9**: 351-365.
- Cilloni, D. y Saglio, G., 2012. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* **18**: 930-937.
- Colado, E., Alvarez-Fernandez, S., Maiso, P., Martin-Sanchez, J., Vidriales, M.B., Garayoa, M., Ocio, E.M., Montero, J.C., Pandiella, A. y San Miguel, J.F., 2008. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica* **93**: 57-66.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. y Wingfield, P.T., 2003. Current Protocols in Protein Science. USA: *John Wiley & Sons, Inc.*
- Crawford, L.J., Windrum, P., Magill, L., Melo, J.V., McCallum, L., McMullin, M.F., Ovaa, H., Walker, B. e Irvine, A.E., 2009. Proteasome proteolytic profile is linked to Bcr-Abl expression. *Experimental hematology* **37**: 357-366.
- Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A. y McCubrey, J.A., 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**: 1263-1293.
- Chauhan, D., Hideshima, T., Mitsiades, C., Richardson, P. y Anderson, K.C., 2005. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics* **4**: 686-692.
- Chou, T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* **58**: 621-681.

- Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research* **70**: 440-446.
- D'Arcy, P., Wang, X. y Linder, S., 2014. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics*.
- Da Fonseca, R.R., Kosiol, C., Vinar, T., Siepel, A. y Nielsen, R., 2010. Positive selection on apoptosis related genes. *FEBS letters* **584**: 469-476.
- Deming, P.B., Schafer, Z.T., Tashker, J.S., Potts, M.B., Deshmukh, M. y Kornbluth, S., 2004. Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Molecular and cellular biology* **24**: 10289-10299.
- Dhut, S., Gibbons, B., Chaplin, T. y Young, B.D., 1991. Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the p190 bcr-abl chimaeric protein. *Leukemia* **5**: 49-55.
- Di Bacco, A.M. y Cotter, T.G., 2002. p53 expression in K562 cells is associated with caspase-mediated cleavage of c-ABL and BCR-ABL protein kinases. *British journal of haematology* **117**: 588-597.
- Doong, H., Vrailas, A. y Kohn, E.C., 2002. What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer letters* **188**: 25-32.
- Druker, B.J., 2008. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**: 4808-4817.
- Druker, B.J. y Lydon, N.B., 2000. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **105**: 3-7.
- Du, X.L. y Chen, Q., 2013. Recent advancements of bortezomib in acute lymphocytic leukemia treatment. *Acta haematologica* **129**: 207-214.
- Ebstein, F., Kloetzel, P.M., Kruger, E. y Seifert, U., 2012. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**: 2543-2558.
- Eckstein, N., Roper, L., Haas, B., Potthast, H., Hermes, U., Unkrig, C., Naumann-Winter, F. y Enzmann, H., 2014. Clinical pharmacology of tyrosine kinase inhibitors becoming generic drugs: the regulatory perspective. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **33**: 15.
- Espinosa, L., Cathelin, S., D'Altri, T., Trimarchi, T., Statnikov, A., Guiu, J., Rodilla, V., Ingles-Esteve, J., Nomdedeu, J., Bellosillo, B. *et al.*, 2010. The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer cell* **18**: 268-281.
- Faderl, S., O'Brien, S., Pui, CH., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D. y Kantarjian, H.M., 2010. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* **116**: 1165-1176.
- Fakler, M., Loeder, S., Vogler, M., Schneider, K., Jeremias, I., Debatin, K.M. y Fulda, S., 2009. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood* **113**: 1710-1722.
- Fielding, A.K., Richards, S.M., Chopra, R., Lazarus, H.M., Litzow, M.R., Buck, G., Durrant, I.J., Luger, S.M., Marks, D.I., Franklin, I.M. *et al.*, 2007. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* **109**: 944-950.
- Finley, D., 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* **78**: 477-513.

- Franke, N.E., Niewerth, D., Assaraf, Y.G., Van Meerloo, J., Vojtekova, K., Van Zantwijk, C.H., Zweegman, S., Chan, E.T., Kirk, C.J., Geerke, D.P. *et al.*, 2012. Impaired bortezomib binding to mutant beta5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia* **26**: 757-768.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. y Samali, A., 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International journal of cell biology* **2010**: 214074.
- Gallipoli, P., Cook, A., Rhodes, S., Hopcroft, L., Wheadon, H., Whetton, A.D., Jorgensen, H.G., Bhatia, R. y Holyoake, T.L., 2014. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood* **124**: 1492-1501.
- Gatto, S., Scappini, B., Pham, L., Onida, F., Milella, M., Ball, G., Ricci, C., Divoky, V., Verstovsek, S., Kantarjian, H.M. *et al.*, 2003. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica* **88**: 853-863.
- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N. y Sawyers, C.L., 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**: 876-880.
- Groettrup, M., Kirk, C.J. y Basler, M., 2010. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nature reviews Immunology* **10**: 73-78.
- Gu, H., Chen, X., Gao, G. y Dong, H., 2008. Caspase-2 functions upstream of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by bortezomib in human myeloma cells. *Molecular cancer therapeutics* **7**: 2298-2307.
- Hales, E.C., Taub, J.W. y Matherly, L.H., 2014. New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of gamma-secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cellular signalling* **26**: 149-161.
- Hoeller, D. y Dikic, I., 2009. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* **458**: 438-444.
- Hu, Z., Pan, X.F., Wu, F.Q., Ma, L.Y., Liu, D.P., Liu, Y., Feng, T.T., Meng, F.Y., Liu, X.L., Jiang, Q.L. *et al.*, 2009. Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *PloS one* **4**: e6257.
- Huang, C., Hu, X., Wang, L., Lu, S., Cheng, H., Song, X., Wang, J. y Yang, J., 2012. Bortezomib suppresses the growth of leukemia cells with Notch1 overexpression in vivo and in vitro. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **70**: 801-809.
- Jaso, J., Thomas, D.A., Cunningham, K., Jorgensen, J.L., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J. y Wang, S.A., 2011. Prognostic significance of immunophenotypic and karyotypic features of Philadelphia positive B-lymphoblastic leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* **117**: 4009-4017.
- Kane, R.C., Dagher, R., Farrell, A., Ko, C.W., Sridhara, R., Justice, R. y Pazdur, R., 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **13**: 5291-5294.
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Sridhara, R. y Pazdur, R., 2006. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* **12**: 2955-2960.
- Kharas, M.G., Deane, J.A., Wong, S., O'Bosky, K.R., Rosenberg, N., Witte, O.N. y Fruman, D.A., 2004. Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells. *Blood* **103**: 4268-4275.



- Khor, L.Y., Moughan, J., Al-Saleem, T., Hammond, E.H., Venkatesan, V., Rosenthal, S.A., Ritter, M.A., Sandler, H.M., Hanks, G.E., Shipley, W.U. *et al.*, 2007. Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. *Clin Cancer Res* **13**: 3585-3590.
- Kitamura, A., Maekawa, Y., Uehara, H., Izumi, K., Kawachi, I., Nishizawa, M., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Standley, D.M., Tanaka, K. *et al.*, 2011. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest* **121**: 4150-4160.
- Kurosu, T., Nagao, T., Wu, N., Oshikawa, G. y Miura, O., 2013. Inhibition of the PI3K/Akt/GSK3 pathway downstream of BCR/ABL, Jak2-V617F, or FLT3-ITD downregulates DNA damage-induced Chk1 activation as well as G2/M arrest and prominently enhances induction of apoptosis. *PloS one* **8**: e79478.
- Lee, H.J., Thompson, J.E., Wang, E.S. y Wetzler, M., 2011. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer* **117**: 1583-1594.
- Liu, N., Liu, C., Li, X., Liao, S., Song, W., Yang, C., Zhao, C., Huang, H., Guan, L., Zhang, P. *et al.*, 2014a. A novel proteasome inhibitor suppresses tumor growth via targeting both 19S proteasome deubiquitinases and 20S proteolytic peptidases. *Scientific reports* **4**: 5240.
- Liu, Y., He, P., Liu, F., Shi, L., Zhu, H., Cheng, X., Zhao, J., Wang, Y. y Zhang, M., 2014. Prognostic significance of B-cell lymphoma 2 expression in acute leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Molecular and clinical oncology* **2**: 411-414.
- Liu, Y., Ramot, Y., Torrelo, A., Paller, A.S., Si, N., Babay, S., Kim, P.W., Sheikh, A., Lee, C.C., Chen, Y. *et al.*, 2012. Mutations in proteasome subunit beta type 8 cause chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature with evidence of genetic and phenotypic heterogeneity. *Arthritis and rheumatism* **64**: 895-907.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lu, S. y Wang, J., 2013. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker research* **1**: 13.
- Lu, S., Yang, J., Song, X., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., Song, N., Bao, X., Chen, P. y Wang, J., 2008. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **326**: 423-431.
- Matsuo, Y., Ariyasu, T., Ohmoto, E., Kimura, I. y Minowada, J., 1991. Bi-phenotypic t(9;22)-positive leukemia cell lines from a patient with acute leukemia: NALM-20, established at the onset; and NALM-21, NALM-22 and NALM-23, established after relapse. *Human cell* **4**: 335-338.
- McIlroy, D., Sakahira, H., Talanian, R.V. y Nagata, S., 1999. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* **18**: 4401-4408.
- Medina-Ramirez, C.M., Goswami, S., Smirnova, T., Bamira, D., Benson, B., Ferrick, N., Segall, J., Pollard, J.W. y Kitsis, R.N., 2011. Apoptosis inhibitor ARC promotes breast tumorigenesis, metastasis, and chemoresistance. *Cancer research* **71**: 7705-7715.

- Messinger, Y.H., Gaynon, P.S., Sposto, R., Van der Giessen, J., Eckroth, E., Malvar, J., Bostrom, B.C., Therapeutic Advances in Childhood L, Lymphoma C. 2012. Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Blood* **120**: 285-290.
- Minowada, J., Onuma, T. y Moore, G.E., 1972. Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *Journal of the National Cancer Institute* **49**: 891-895.
- Nagar, B., Bornmann, W.G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B. y Kuriyan, J., 2002. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer research* **62**: 4236-4243.
- Naumovski, L., Morgan, R., Hecht, F., Link, M.P., Glader, B.E. y Smith, S.D., 1988. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines without classical breakpoint cluster region rearrangement. *Cancer research* **48**: 2876-2879.
- Niewerth, D., Franke, N.E., Jansen, G., Assaraf, Y.G., Van Meerloo, J., Kirk, C.J., Degenhardt, J., Anderl, J., Schimmer, A.D., Zweegman, S. *et al.*, 2013. Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica* **98**: 1896-1904.
- Niewerth, D., Kaspers, G.J., Assaraf, Y.G., Van Meerloo, J., Kirk, C.J., Anderl, J., Blank, J.L., Van de Ven, P.M., Zweegman, S., Jansen, G. *et al.*, 2014. Interferon-gamma-induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *Journal of hematology & oncology* **7**: 7.
- Okabe, M., Matsushima, S., Morioka, M., Kobayashi, M., Abe, S., Sakurada, K., Kakinuma, M. y Miyazaki, T., 1987. Establishment and characterization of a cell line, TOM-1, derived from a patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Blood* **69**: 990-998.
- Ottmann, O.G. y Pfeifer, H., 2009. First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults. *Current opinion in oncology* **21 Suppl 1**: S43-46.
- Paganin, M. y Ferrando, A., 2011. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood reviews* **25**: 83-90.
- Parrish, A.B., Freel, C.D. y Kornbluth, S., 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**.
- Perez-Galan, P., Roue, G., Lopez-Guerra, M., Nguyen, M., Villamor, N., Montserrat, E., Shore, G.C., Campo, E. y Colomer, D., 2008. BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclax) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **22**: 1712-1720.
- Perez-Galan, P., Roue, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E. y Colomer, D., 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* **107**: 257-264.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. y Greenwood, M.T., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 238-259.
- Pui, CH., 2009. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. *Seminars in hematology* **46**: 1-2.
- Ren, R., 2005. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature reviews Cancer* **5**: 172-183.

- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Bruscaggin, A. *et al.*, 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**: 2854-2862.
- Sanchez-Garcia, I. y Grutz, G., 1995. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5287-5291.
- Sayers, T.J., 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **60**: 1173-1180.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B. y Kuriyan, J., 2000. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**: 1938-1942.
- Schneider, U., Schwenk, H.U. y Bornkamm, G., 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **19**: 621-626.
- Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M. *et al.*, 2010. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**: 613-624.
- Selimovic, D., Porzig, B.B., El-Khattouti, A., Badura, H.E., Ahmad, M., Ghanjati, F., Santourlidis, S., Haikel, Y. y Hassan, M., 2013. Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells. *Cellular signalling* **25**: 308-318.
- Soundararajan, S., Chen, W., Spicer, E.K., Courtenay-Luck, N. y Fernandes, D.J., 2008. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer research* **68**: 2358-2365.
- Suh, K.S., Tanaka, T., Sarojini, S., Nightingale, G., Gharbaran, R., Pecora, A. y Goy, A., 2013. The role of the ubiquitin proteasome system in lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* **87**: 306-322.
- Sunwoo, J.B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crawl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P. y Van Waes, C., 2001. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**: 1419-1428.
- Tamura, R.E., De Vasconcellos, J.F., Sarkar, D., Libermann, T.A., Fisher, P.B. y Zerbini, L.F., 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine* **12**: 634-651.
- Tanaka, K., Mizushima, T. y Saeki, Y., 2012. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biological chemistry* **393**: 217-234.
- Tao, Y., Gao, L., Wu, X., Wang, H., Yang, G., Zhan, F. y Shi, J., 2013. Down-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by bortezomib sensitizes Jurkat leukemia T cells against glucocorticoid-induced apoptosis. *PLoS one* **8**: e67067.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. y Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 231-241.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. y Pickart, C.M., 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* **19**: 94-102.

- Vaculova, A. y Zhivotovsky, B., 2008. Caspases: determination of their activities in apoptotic cells. *Methods in enzymology* **442**: 157-181.
- Vilimas, T., Mascarenhas, J., Palomero, T., Mandal, M., Buonamici, S., Meng, F., Thompson, B., Spaulding, C., Macaroun, S., Alegre, M.L. *et al.*, 2007. Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nature medicine* **13**: 70-77.
- Vink, J., Cloos, J. y Kaspers, G.J., 2006. Proteasome inhibition as novel treatment strategy in leukaemia. *British journal of haematology* **134**: 253-262.
- Wagenknecht, B., Glaser, T., Naumann, U., Kugler, S., Isenmann, S., Bahr, M., Korneluk, R., Liston, P. y Weller, M., 1999. Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell death and differentiation* **6**: 370-376.
- Zou, W., Yue, P., Lin, N., He, M., Zhou, Z., Lonial, S., Khuri, F.R., Wang, B. y Sun, S.Y., 2006. Vitamin C inactivates the proteasome inhibitor PS-341 in human cancer cells. *Clin Cancer Res* **12**: 273-280.