

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de modelos experimentales murinos para la
evaluación preclínica de nuevos tratamientos en tumores
hematológicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Alejandra Ortiz Ruiz

Directores

**María Linares Gómez
Miguel Gallardo Delgado
Joaquín Martínez López**

Madrid

© María Alejandra Ortiz Ruiz, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS PARA LA
EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE NUEVOS TRATAMIENTOS EN TUMORES
HEMATOLÓGICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Alejandra Ortiz Ruiz

DIRECTOR

María Linares Gómez
Miguel Gallardo Delgado
Joaquín Martínez López

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS PARA LA
EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE NUEVOS TRATAMIENTOS EN TUMORES
HEMATOLÓGICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Alejandra Ortiz Ruiz

Directores

María Linares Gómez

Miguel Gallardo Delgado

Joaquín Martínez López

Madrid, 2021

“El conocimiento empieza en el asombro”

Sócrates

“¡Sapere aude!”

Immanuel Kant

La presente tesis doctoral es el fruto del trabajo y del empeño de muchas personas a las que admiro y agradezco enormemente.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de tesis, la Dra. María Linares Gómez, el Dr. Miguel Gallardo Delgado y el Dr. Joaquín Martínez López. Os agradezco muchísimo haberme dado la posibilidad de desarrollar mi investigación bajo vuestra supervisión y, por supuesto, por creer en mí. Habéis sido unos magníficos referentes y ha sido un honor contar con vuestro apoyo tanto profesional como personal para desarrollarme en el aprendizaje de la investigación contra el cáncer.

En segundo lugar, pero no por importancia, quería agradecer a Fundación CRIS contra el cáncer y en especial, a los pacientes, por depositar su confianza en la investigación. Me gustaría hacer una mención especial a todos los ratones que han formado parte de esta Tesis, ya que sin ellos no hubiera sido posible mi crecimiento como veterinaria.

Además, quería agradecer a todos aquellos que han contribuido a mi formación y a mi crecimiento como persona en estos últimos 5 años. Este tercer agradecimiento está dirigido tanto al personal del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) como al servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre. Gracias en especial a MariLuz, la mejor compañera de camino de Tesis que podría haber tenido, has sido muy importante para mí. También lo han sido mis compis Alba, Pedro, Isa, Esther, Yanira, Ale, Lucía, Antonio, Almu, Vane, Lauras, Michel...así como grandes médicos y personas, como Rosa y Teresa Cedena; y mis inestimables compañeros de pecera Richard y Paqui. Cada uno de vosotros habéis contribuido a mi formación y felicidad en distintas formas y medidas. Os llevo a todos en el corazón y podría escribir un libro con todo lo que os agradezco haber formado parte de estos años. Otro agradecimiento especial es para mí tutor de tesis, el Dr. José María Bautista, y a todo el personal administrativo de la escuela de doctorado, en la Facultad de Veterinaria y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por vuestra tutoría y por ayudarme a nivel administrativo durante todo este periodo. Además, me gustaría agradecer a todos los revisores y a los miembros del tribunal de tesis por demostrar interés en mi trabajo y por vuestra disponibilidad.

El reconocimiento más emotivo es para mi familia y amigos. Vuestro apoyo incondicional ha sido una pieza clave para mí durante todo este tiempo y sin vosotros no hubiera sido posible llegar hasta este momento en buenas condiciones psíquicas.

Y, por supuesto, a ti, David, mi marido, mi mejor apoyo, mi cómplice, mi vida, mi todo. Aunque no hay universo suficiente para agradecerte todo lo que te mereces y devolverte todos los “ya voy”, millones de gracias por estar ahí siempre, por ser incondicional y por los frutos que creamos con nuestra felicidad. Toda una vida para estar agradecida de tener la suerte de tenerte.

Por último, agradezco a todas las personas que consideren leer este trabajo como una referencia en el campo, aunque sea solo en parte, y espero que lo disfruten.

ÍNDICE:

1. RESUMEN/SUMMARY	1
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL MIELOMA MÚLTIPLE	11
2.1.1. Antecedentes	11
2.1.2. Epidemiología	12
2.1.3. Desarrollo del MM	13
2.1.4. Clínica.....	16
2.1.5. Factores de riesgo	25
2.1.6. Tratamientos.....	27
2.1.7. Modelos experimentales murinos	30
2.2. METABOLISMO Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN TUMORES HEMATOLÓGICOS	32
2.2.1. Generalidades del metabolismo en cáncer	32
2.2.2. La mitocondria en cáncer.....	34
2.2.3. Patogénesis del metabolismo en MM.....	37
2.2.4. MYC: Marcador biológico en MM.....	40
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	43
3.1. HIPÓTESIS	46
3.2. OBJETIVOS	46
4. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.1. MATERIALES	49
4.1.1. Líneas celulares	49
4.1.2. Plásmidos.	49
4.1.3. Sondas Taqman y oligonucleótidos.....	50
4.1.4. Anticuerpos.	51
4.1.5. Sondas moleculares.	52
4.1.6. Enzima citocromo c oxidasa.....	53
4.1.7. Fármacos.....	53
4.2. MÉTODOS	56
4.2.1. Obtención y procesamiento de células primarias.	56
4.2.2. Cultivo de líneas celulares, generación de resistentes y generación JIN3-ffLuc-GFP.....	56
4.2.3. Análisis de la expresión de genes mitocondriales: repositorio COMMPASS y CanEvolve.....	58
4.2.4. Extracción de ADN y ARN.....	59
4.2.5. PCR a tiempo real (RT-PCR), PCR de transcripción reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	59
4.2.6. Extracción de proteínas.....	62

4.2.7. Separación de proteínas por electroforesis (Western Blot).	62
4.2.8. Determinación de los niveles de COXII por Inmunohistoquímica	63
4.2.9. Medición de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria (citocromo c oxidasa): histoenzimática de COX (HE-COX).	64
4.2.10. Citometría de flujo.	64
4.2.11. Medición de la tasa de consumo de oxígeno mediante Seahorse.	65
4.2.12. Ensayos citotoxicidad (dosis-respuesta).	66
4.2.13. Estudio de las sinergias entre fármacos.	67
4.2.14. Generación de un modelo animal de MM humano.	67
4.2.15. Análisis estadístico.	70
5. RESULTADOS	71
5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA MITOCONDRIAL.	73
5.1.1. Estudio de genes y firmas moleculares relacionados con la mitocondria. Caracterización fenotípica mitocondrial.	73
5.1.2. Estudio de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COXII).	81
5.1.3. Estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (COX)	82
5.1.4. Estudio del potencial de membrana y carga mitocondrial.	83
5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA	85
5.2.1. Caracterización del modelo celular para su estudio	85
5.2.2. Evaluación de la inhibición mitocondrial como diana terapéutica: ensayos de viabilidad con el inhibidor tigeciclina.	88
5.2.3. Validación del efecto mitocondrial producido por el inhibidor tigeciclina	90
5.2.4. Evaluación de la inhibición mitocondrial: caracterización del carfilzomib (inhibidor del proteasoma).	97
5.2.5. Efecto de la inhibición mitocondrial en la resistencia a bortezomib	98
5.2.6. Efecto de la inhibición de c-Myc sobre la reprogramación mitocondrial	102
5.2.7. Estudio del efecto de la tigeciclina sobre el receptor CD38.	107
5.2.8. Estudio del mecanismo molecular responsable de la citotoxicidad de la tigeciclina mediado por células efectoras	113
5.3. ESTUDIO EX VIVO	119
5.4. ESTUDIO IN VIVO	121
5.4.1. Bioluminiscencia	121
5.4.2. Curva de supervivencia	121
6. DISCUSIÓN	126
6.1. ELEVADA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE.	128

6.2. LA INHIBICIÓN MITOCONDRIAL ES UN MECANISMO DE CITOTOXICIDAD EN EL MIELOMA MÚLTIPLE. EFICACIA DE LA TIGECICLINA EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN CON BORTEZOMIB.	132
6.2.1. <i>Inhibición de la actividad mitocondrial del Mieloma Múltiple in vitro</i>	132
6.2.2. <i>Citotoxicidad ex vivo del inhibidor mitocondrial, tigeciclina, en células primarias de pacientes con MM</i>	138
6.2.3. <i>Reducción de la carga tumoral de MM in vivo con tigeciclina en monoterapia y en combinación con bortezomib</i>	139
7. CONCLUSIONES	144
8. BIBLIOGRAFÍA	148
9. LISTADO TABLAS	160
10. LISTADO FIGURAS	162
11. ABREVIATURAS	168
12. ANEXOS	172
12.1. ANEXO 1. TABLA DE PACIENTES	173
12.2. ANEXO 2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	176

1. RESUMEN/SUMMARY

DESARROLLO DE MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS PARA LA EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE NUEVOS TRATAMIENTOS EN TUMORES HEMATOLÓGICOS

Introducción

El mieloma múltiple es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación de las células plasmáticas en médula ósea. Representa el 1% de todos los cánceres y su prevalencia se ve agravada por el envejecimiento de la población. A pesar del desarrollo de nuevos tratamientos en los últimos años, el mieloma múltiple permanece como una enfermedad incurable, ya que la mayoría de los pacientes acaban progresando y desarrollando resistencias a los fármacos. La mitocondria juega un papel clave en el desarrollo y adquisición de un fenotipo maligno en neoplasias hematológicas, así como en la resistencia a terapias; sin embargo, su rol en la patogénesis del mieloma múltiple permanece inexplorado. Además, las células cancerígenas muestran determinados cambios metabólicos en su desarrollo, potencialmente como resultado de la desregulación de oncogenes. En mieloma múltiple existen alteraciones cromosómicas recurrentes que pueden derivar en la expresión aberrante de oncogenes como MYC (p.ej. translocaciones). Los cambios metabólicos que ocurren en pacientes con mieloma múltiple se ven afectados directamente por las terapias, lo que sugiere la posibilidad de intervenir para mejorar las terapias anti-mieloma aprovechando las vías metabólicas que se encuentran alteradas.

Objetivos y resultados

Con el objetivo de estudiar la implicación de la actividad mitocondrial en el desarrollo, progresión y resistencia a los tratamientos en el mieloma múltiple se ha caracterizado la función mitocondrial a nivel génico, proteico y funcional en pacientes en distintos estadios de la enfermedad, incluyendo los estadios pre-malignos: gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma smoldering (SM). Para profundizar en la posibilidad de actuar a nivel de actividad mitocondrial y mejorar la

respuesta a los tratamientos, evitando la progresión maligna y el desarrollo de resistencias a los fármacos habituales, se ha analizado la eficacia de uso del inhibidor mitocondrial, tigeciclina tanto en monoterapia, como en combinación con la primera línea de tratamiento para mieloma múltiple, bortezomib. Estos estudios se han llevado a cabo tanto en un modelo celular representativo de alta actividad mitocondrial, pasando por el estudio *ex vivo* en células primarias de pacientes, y finalmente en un modelo animal específico que mimetiza el mieloma y su capacidad de respuesta a los tratamientos. En esta tesis doctoral, se ha podido constatar que la reprogramación metabólica que ocurre en la progresión del MM y en respuesta a tratamientos con inhibidores del proteasoma (IP) supone una diana terapéutica mediante el uso de inhibidores mitocondriales. Los datos obtenidos han demostrado que existe un aumento de la carga mitocondrial según la enfermedad progresa, correlacionándose con una supervivencia libre de progresión más corta. Durante la progresión del MM y/o el tratamiento con IP se produce un aumento de CD38 que estimula el contenido mitocondrial con la participación de c-Myc, que en última instancia promueve la actividad de la fosforilación oxidativa. A nivel *in vitro* e *in vivo* se ha reportado una prometedora eficacia y citotoxicidad del inhibidor mitocondrial tigeciclina, tanto en monoterapia como en combinación con la primera línea de tratamiento del mieloma múltiple, bortezomib.

Conclusiones

Los resultados recogidos en esta tesis doctoral reflejan que los pacientes con estadios previos del mieloma múltiple, es decir, los estadios pre-malignos gammapatía monoclonal de significado incierto y el mieloma smoldering, presentan una reducida actividad mitocondrial que se ve elevada según progresa la enfermedad, y de forma más drástica según recaen y se hacen resistentes a los tratamientos recibidos. Por otro lado, el uso de la tigeciclina sola o en combinación con bortezomib surge como una nueva alternativa terapéutica dirigida a la dependencia de la fosforilación oxidativa en esta enfermedad.

En conjunto, los hallazgos han demostrado como la reprogramación metabólica a nivel mitocondrial aflora como una causa en la transformación del MM y en la progresión

de la enfermedad, y que además viene estimulado por los tratamientos con IP, lo que supone la eficacia de terapias dirigidas hacia estas nuevas vulnerabilidades.

DEVELOPMENT OF MICE MODELS FOR THE PRECLINIC ASSESSMENT OF NOVEL TREATMENTS IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

Introduction

Multiple myeloma is a hematological malignancy characterized for the accumulation of plasma cells in the bone marrow. It accounts for 1% of all cancers and the prevalence continues to increase due to the ageing population. Despite the progress in novel therapies over the last years, multiple myeloma still remains an incurable disease, because most of the patients progress and develop drug resistances. Mitochondria plays a key role in the development and acquisition of a malignant phenotype in hematological cancers, as well as resistance to therapies; however, is still unknown the role played in the pathogenesis of multiple myeloma. Moreover, growing cancer cells show certain metabolic features resultant of oncogenes dysregulation. In multiple myeloma many of the recurrent chromosomal alterations result in the aberrant expression of oncogenes such as MYC (e.g. translocations). Metabolic changes that occur in patients with multiple myeloma are directly affected by therapies, which suggests the possibility to interfere anti-myeloma therapies exploiting altered metabolic pathways.

Aims and results

The aim to study mitochondrial activity involvement in development, progression and drugs resistance in multiple myeloma has been assessed by characterizing mitochondrial function through distinct approaches, genetic, proteomic and functional, in patients at different stages of the disease, including those premalignant stages monoclonal gammopathy of uncertain significance (MGUS) and smouldering myeloma (SM). To deeply understand the possibility to enhance response to treatments at mitochondrial function by avoiding malignant progression and drug resistance development, an efficacy analysis of the mitochondrial inhibitor tigecycline alone or in combination with the first line drug use in myeloma, bortezomib was performed. All these studies were conducted within a cellular model featuring high mitochondrial activity, with the *ex vivo* study of

primary myeloma cells, and finally through a specific animal model that mimics myeloma and the ability to respond to treatments. In this doctoral thesis, it was established that metabolic reprogramming occurs in MM progression and in response to proteasome inhibitor (PI) treatment and can be therapeutically targeted with the exposure to mitochondrial inhibitors. The data obtained demonstrate an increase in mitochondrial load as MM disease progresses, correlating with shorter progression-free survival. The increase in CD38 expression during MM progression and PI treatment boosts the mitochondrial content with the participation of c-Myc, ultimately inducing oxidative phosphorylation activity. *In vitro* and *in vivo* therapeutic targeting using the mitochondrial inhibitor tigecycline showed promising efficacy and cytotoxicity in monotherapy and in combination with the MM frontline treatment bortezomib.

Conclusions

The results reported in this doctoral thesis reflect that patients at premalignant stages of the disease, monoclonal gammopathy of uncertain significance and smouldering myeloma, represent reduced mitochondrial activity that appears to increase along the disease progression, and more dramatically as patients relapse and become resistant to treatments. On the other hand, tigecycline used alone or in combination with bortezomib emerges as a novel therapeutic alternative aimed at oxidative phosphorylation dependency in this disease.

Overall, these findings demonstrate how mitochondrial metabolic reprogramming emerges in MM transformation and disease progression, and is enhanced by PI treatment, and the efficacy of therapies targeting these novel vulnerabilities.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL MIELOMA MÚLTIPLE

2.1.1. Antecedentes

El mieloma múltiple (MM), mielomatosis, mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación de células plasmáticas (CP) malignas terminalmente diferenciadas en médula ósea (MO); y por la aparición de proteína monoclonal (proteína M o paraproteína) en suero y/o en orina (1). La proliferación clonal de las células plasmáticas es una característica común de un grupo de enfermedades llamadas gammapatías monoclonales o discrasias de células plasmáticas (2). A diferencia de otras neoplasias hematológicas, generalmente el MM está precedido por una condición pre-maligna y asintomática que progresa con la edad llamada gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI). A veces, entre esta condición y el MM se identifica un estadio intermedio llamado mieloma smoldering o mieloma quiescente (SM) (3).

La proliferación de CP en médula ósea provoca una menor presencia de otros tipos celulares al desplazar a las células productoras de células sanguíneas normales, causando recuentos bajos de células sanguíneas, produciendo anemias, trombocitopenias y leucopenias. Además, otros tipos celulares se ven afectados, como son los osteoclastos y osteoblastos, de forma que se bloquea la actividad de osteoblastos y se estimula la de los osteoclastos provocando la destrucción del tejido óseo y consiguiente debilitamiento óseo a nivel clínico (4).

Por otro lado, las células plasmáticas producen una proteína anormal (anticuerpo) también llamada inmunoglobulina (Ig) monoclonal, proteína monoclonal (proteína M), pico M o paraproteína (generalmente IgG o IgA), que puede estar constituida por solo cadenas ligeras (kappa o lambda) o raramente por cadenas pesadas. El exceso de esta proteína se secreta en la sangre y/o en orina. Generalmente, el aumento de proteínas en sangre (hiperproteinemia) suele estar relacionado con el aumento de las inmunoglobulinas, que al ser gammaglobulinas se considera como hipergammaglobulinemia. Sin embargo, en ocasiones, si la paraproteína es de cadena ligera se producirá hipogammaglobulinemia, y esta sólo va a ser detectada en la orina y no en el suero (5).

Fue en la década de 1840 cuando se empezó a describir por primera vez el mieloma múltiple. Según recoge Kyle en su revisión de 2011, fue el cirujano Samuel Solly quién reportó el primer caso documentado de una paciente con fatiga y dolor severo de espalda. Posteriormente, el mejor caso conocido es el de Thomas Alexander McBean quien presentaba debilitamiento óseo y excretaba altas cantidades de proteína. Gracias a este caso fue Henry Bence Jones quien ayudo a describir la proteinuria encontrada, por lo que a día de hoy se conoce como proteinuria Bence-Jones (6).

A pesar de estos primeros casos bien documentados, es cierto que existen hallazgos que atestiguan la presentación de mieloma desde hace miles de años, ejemplos de ello se encuentran desde el antiguo Egipto (3200 A.C.)(7) a Alemania (1400-1800 D.C.)(8), y proponiéndose el origen del mieloma en el mesozoico, sin embargo, ha de tenerse cautela a la hora de evaluar especímenes antiguos (9).

En el caso de la medicina veterinaria también se ha podido describir la presentación de mieloma múltiple tanto en especies domésticas como no domésticas. En especies salvajes mantenidas en cautividad como tigres, leones o jaguares se ha reportado hipergammaglobulinemia y proteinuria Bence-Jones (10). Respecto a los animales domésticos, se ha descrito que el mieloma múltiple representa cerca del 1% de todos los tumores en el perro, mientras que en el gato es menor del 0.0012% (11). En el caballo hay varios casos que lo describen, sin embargo, a día de hoy su prevalencia se desconoce (12).

2.1.2. Epidemiología

Es uno de los tumores hematológicos más comunes junto con el linfoma y las leucemias, representando el 1.8% de todos los nuevos casos de cáncer en Estados Unidos (13). A nivel global se observa una mayor incidencia en todos los países más desarrollados como Estados Unidos, Europa Occidental y Australia (4). Además, un estudio entre 1990 y 2016 ha demostrado un incremento de los casos de MM en un 126% (1). Estos datos sugieren que el crecimiento de la incidencia se debe tanto a la

disponibilidad de mejores técnicas diagnósticas como un mayor conocimiento clínico de la enfermedad.

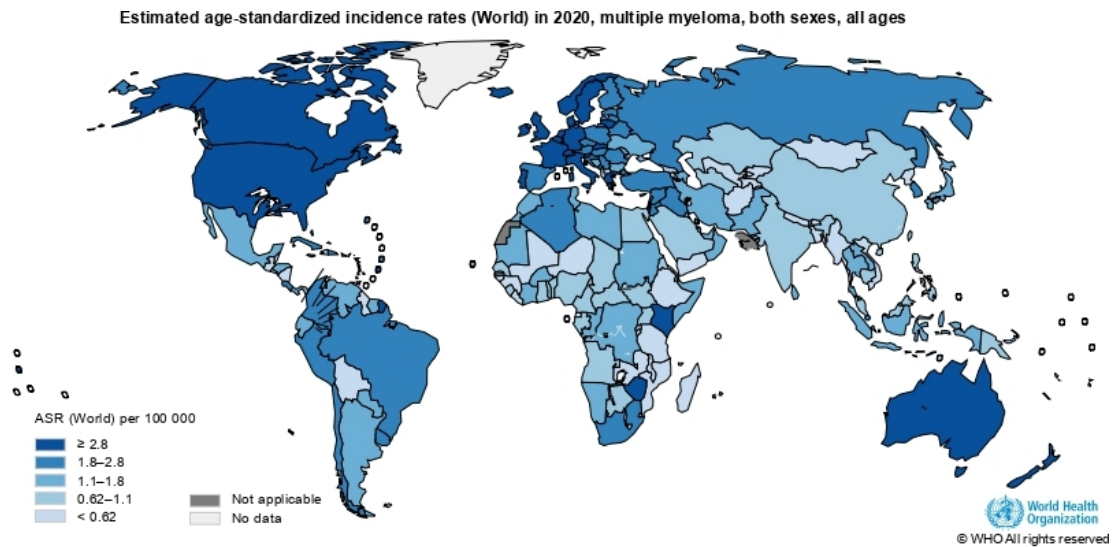


Figura 1. Incidencia global de Mieloma múltiple en 2020. La incidencia de mieloma múltiple varía entre países, siendo más elevada en los países más desarrollados como en Norteamérica y Europa Occidental. Reproducido con permiso de Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [04/02/2020].

Además, se produce fundamentalmente en personas mayores, con una media de edad al diagnóstico de 69 años (14), siendo en los hombres más prevalente que en las mujeres, 8.8 frente a 5.7 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente.

2.1.3. Desarrollo del MM

El mieloma se caracteriza por la expansión clonal de células plasmáticas malignas. Se ha sugerido que la enfermedad surge de células B de centros post-germinales debido a que las secuencias de inmunoglobulinas se encuentran hipermutadas en las células plasmáticas y permanecen constantes a lo largo de todo el curso clínico de la enfermedad (15). Sin embargo, con la aparición de la secuenciación masiva, en los últimos años se ha visto que realmente no existe un clon predominante en el desarrollo de la enfermedad, sino que se produce una evolución clonal de las CP (4).

Para entender el desarrollo del MM es necesario ahondar en el conocimiento sobre el desarrollo de las células B y la biología de la célula plasmática en mamíferos. Numerosos estudios han sugerido que varias poblaciones de células B son clones relacionados con la malignización de la célula plasmática (16). Se conoce que el desarrollo temprano de las células B a partir de las células madre hematopoyéticas ocurre en el hígado fetal en la época prenatal, para posteriormente trasladarse a la médula ósea para el resto de la vida adulta (17). Las células madre hematopoyéticas se diferencian entre otros tipos celulares en células B maduras a través de estadios pre-pro-B, pro-B, pre-B, B inmaduras y células B transitorias. Lo primero que ocurre durante el desarrollo de las células B es el reordenamiento génico de las cadenas pesadas de la Ig. Después de producirse en la médula ósea, las células B inmaduras migran al bazo, donde seguirán con el proceso de diferenciación hacia los estadios de célula B de transición (18); de forma que tras varias rondas de diferenciación tanto en órganos linfoides secundarios como en médula ósea se convertirán en células plasmáticas (4).

Las células B son el centro del sistema inmunitario adaptativo humoral y son responsables de producir Ig específicas de antígenos. La función de las células B en la producción de anticuerpos fue reportada en 1956 por Bruce Glick y Timothy Chang como resultado de la supresión de la producción de anticuerpos al bursectomizar pollos. De esta forma se concluyó que en la bolsa de Fabricio de las aves existen células B (bursa) encargadas de la producción de anticuerpos (19).

Ante un estímulo antigénico se produce la proliferación de células B maduras en la zona marginal del bazo para inicialmente diferenciarse en células plasmáticas de vida corta (short-lived PCs) que secretan IgM de baja afinidad. Posteriormente células T de ayuda (en inglés, Thelper) promueven la proliferación de células B, su maduración y recombinación en el centro germinal, para finalmente producir células plasmáticas secretoras de anticuerpos de alta afinidad. Las células plasmáticas migran a médula ósea donde sobreviven durante largos periodos de tiempo (20). Se ha sugerido que la presentación de eventos genéticos primarios como translocaciones, que involucran oncogenes específicos, confieren a la célula plasmática una ventaja proliferativa que puede desembocar en el desarrollo de estadios patológicos como son GMSI, SM y MM (4).

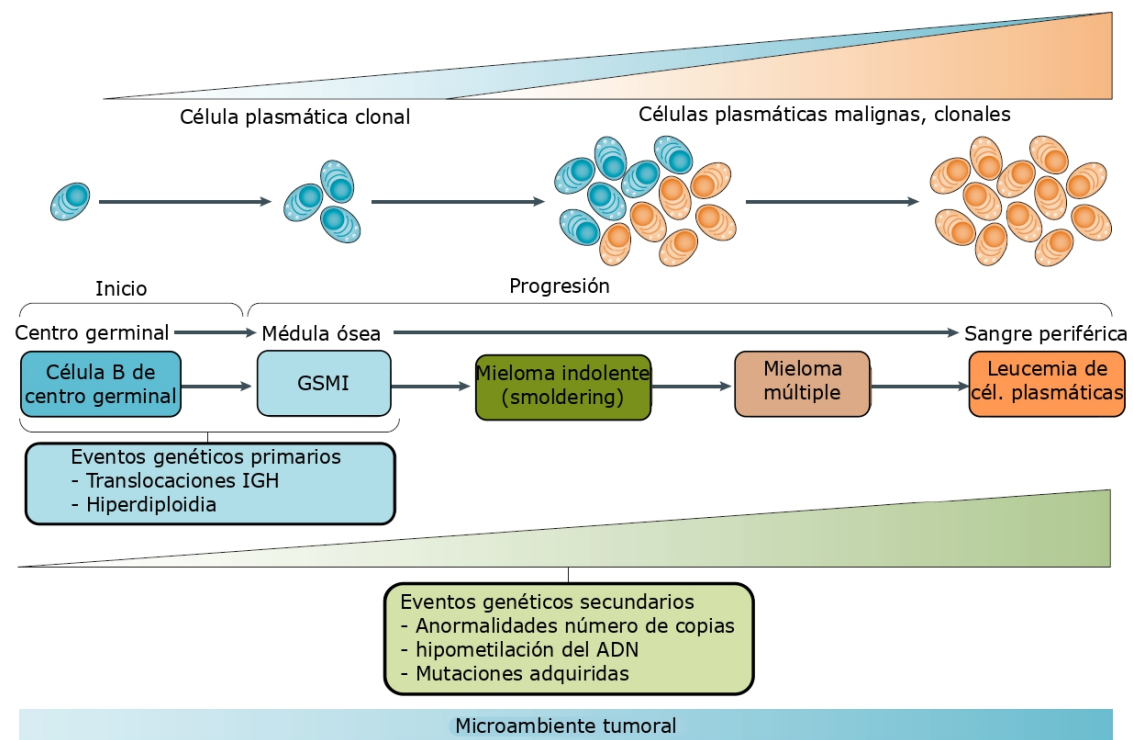


Figura 2. El desarrollo de las gammopatías monoclonales. El desarrollo de mieloma múltiple es un proceso con múltiples pasos, empezando por estadios precursores de la enfermedad como la GMSI y el SM. A pesar de que GMSI, SM y el MM a nivel clínico estén bien definidos, se encuentran numerosas similitudes biológicas entre estos estadios de la enfermedad. El MM puede progresar a enfermedades independientes de la médula ósea, como el mieloma extramedular o la leucemia de células plasmáticas. Translocaciones cromosómicas que afectan a los genes de la inmunoglobulina de cadena pesada (IGH) y aneuploidia (con hiperdiploidia como la entidad más frecuente) son eventos genéticos primarios que se incluyen en el desarrollo de GMSI, SM y MM. Extraído y adaptado de Kumar y colaboradores (4).

El riesgo de la transición de GMSI a mieloma activo es muy bajo; solamente ocurre en un 1% de casos al año. Incluso si las células del mieloma están en un nivel más alto (10-30% de la médula total), el crecimiento de estas células puede ser muy lento y representar un mieloma indolente o asintomático. Si bien es cierto que la progresión de SM de alto riesgo representa una tasa del 10% al año en los cinco primeros años. La evolución puede ser muy lenta a lo largo de los años y no requerir tratamiento activo. Incluso pacientes con GMSI pueden progresar a otras condiciones patológicas relacionadas como pueden ser la amiloidosis, la macroglobulinemia de Waldenström o desórdenes linfoproliferativos (4). Es muy importante establecer un diagnóstico correcto que diferencie GMSI y mieloma indolente del mieloma activo o sintomático, que si requiere tratamiento (14, 21, 22).

2.1.4. Clínica

Uno de los grandes retos sigue siendo el diagnóstico oportuno e integral para conseguir identificar los estadios previos de la enfermedad y valorar así las posibilidades de tratamiento en sujetos que presenten alto riesgo de desarrollo de mieloma. Históricamente, el tratamiento del mieloma se ha establecido acorde al desarrollo de las llamadas características CRAB, del inglés calcium, renal, anemia y bone, es decir, presentación de hipercalcemia, fallo renal, anemia y afectación ósea (22). Además, se incluyen varios criterios, clínicos y analíticos, como parte de la exploración inicial que llevan al diagnóstico de MM, como se observa en la tabla 1.

CRITERIOS DE SOSPECHA	
Clínica	Analítica
Dolor óseo	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen de sedimentación globular (VSG) muy elevado • Anemia normocítica con reticulocitos bajos • Hipercalcemia y/o hiperuricemia • Hiperproteinemia y/o hipogammaglobulinemia y/o hipoalbuminemia • Proteína monoclonal en suero y/u orina
Debilidad y astenia	
Patología renal: sed, poliuria, proteinuria, edemas,...	
Infecciones bacterianas: fundamentalmente pulmonares o urinarias	
Alteraciones neurológicas: compresión medular o de raíces nerviosas.	
Alteraciones metabólicas: hipercalcemia, hiperuricemia,...	
Síndrome de hiperviscosidad: cansancio, cefalea, vértigo, somnolencia, diplopía y otras alteraciones de la visión, fenómenos de Raynaud, episodios de insuficiencia cardíaca congestiva, fenómenos hemorrágicos.	
Alteraciones hemorrágicas mucocutáneas	
Síntomas de insuficiencia cardíaca congestiva	

Tabla 1. Criterios de sospecha para establecer el diagnóstico de mieloma múltiple. Extraído de Resumen Oncoguía Mieloma Múltiple 2017 del Grupo Cooperativo para el Estudio de Gammapatías Monoclonales de Castilla y León.

En pacientes asintomáticos, generalmente se diagnostica la patología a través de hallazgos de laboratorio por anomalías en valores de calcio, glóbulos rojos y

proteínas. A nivel de signos clínicos, los pacientes pueden presentar sintomatología inespecífica como náuseas, vómitos, malestar, debilidad, infecciones recurrentes o pérdida de peso. Además, se pueden detectar síntomas de enfermedad ósea, neuropatía periférica o hiperviscosidad. El mieloma múltiple, como su propio nombre indica, hace referencia a la afectación de múltiples localizaciones del cuerpo. Sin embargo, existen zonas que generalmente no se ven afectadas, como son las manos, los pies y las regiones más bajas de brazos y piernas. Los criterios actualizados por el grupo internacional de trabajo en mieloma (International Myeloma Working Group, IMWG) permiten la identificación de pacientes con alto riesgo de progresar a enfermedad sintomática, pudiéndose beneficiar de las terapias evitando el desarrollo de daño en órganos. Es por ello que los criterios CRAB son menos importantes de cara a definir la enfermedad por sí solos, por lo que es necesario relacionarlos con la alteración de células plasmáticas subyacente. En concreto, la detección de hipercalcemia en ausencia de enfermedad ósea debe de investigarse para descartar otras posibles causas independientes del mieloma. Los actuales criterios de clasificación de las distintas entidades del mieloma quedan recogidos en la siguiente tabla (22).

Estadio	Criterio diagnóstico
GMSI	Se requieren los tres siguientes supuestos: <ul style="list-style-type: none"> • Componente monoclonal (CM) en suero <3 g/dL • Células plasmáticas (CP) en médula ósea (MO) <10% • No evidencia de daño orgánico relacionado con el MM
Mieloma múltiple quiescente (<i>smoldering</i>)	Se deben cumplir cualquiera de estos dos criterios: <ul style="list-style-type: none"> • CM (IgG o IgA) ≥ 3 g/dL o ≥ 500 mg en 24h y/o • CP en MO entre 10-60% • Ausencia de signos de CRAB o de amiloidosis
Mieloma múltiple	CP clonales en MO $\geq 10\%$ o biopsia confirmatoria de plasmocitoma óseo o extramedular y cualquiera de los siguientes eventos: <ul style="list-style-type: none"> • Daño orgánico atribuible al MM (CRAB) <ul style="list-style-type: none"> ○ Hipercalcemia: ≥ 0.25 mmol/L (≥ 1 mg/dL) del límite superior de la normalidad o ≥ 2.75 mmol/L (≥ 11 mg/dL). ○ Insuficiencia renal: aclaramiento de creatinina <40 mL/min o creatinina sérica ≥ 177 μmol/L (≥ 2 mg/dL). ○ Anemia: descenso de Hb >20 g/L por debajo del límite inferior de la normalidad o Hb <100 g/L. ○ Lesiones óseas: uno o más lesiones osteolíticas por Rx convencional, TAC o TAC-PET. • Uno o más de estos marcadores (incluso en ausencia de CRAB): <ul style="list-style-type: none"> ○ CP clonales en MO $\geq 60\%$ ○ FLC (<i>free light chain</i>) ratio cadena alterada / cadena no-alterada ≥ 100 (además la FLC de la cadena alterada debe ser ≥ 100 mg/L) ○ Estudio RM con >1 lesión focal

Tabla 2. Criterios diagnósticos de los distintos estadios de MM según el grupo internacional de trabajo en MM (International Myeloma Working Group, IMWG) en 2014.

Estos criterios permiten distinguir entre los estadios pre-malignos, GMSI y SM, del MM, basándose principalmente, en la concentración del componente monoclonal, el porcentaje de células plasmáticas en MO y la presencia o ausencia de daño orgánico (23).

Para detectar la presencia del componente monoclonal se debe de utilizar una combinación de pruebas entre las que se incluyen la electroforesis de proteínas séricas, inmunofijación sérica y detección de cadenas libres en suero (5).

Generalmente se comienza con la determinación del componente monoclonal. En el caso de la electroforesis de las proteínas séricas, además de confirmar la monoclonalidad, también se cuantifica la proteína M, lo que permite tanto el diagnóstico como el control del mieloma en los pacientes. Las inmunoglobulinas secretadas son, glicoproteínas con función de anticuerpo. Habitualmente, se denominan también gammaglobulinas ya que en la electroforesis del suero migra hacia la región gamma (γ), aunque también se puede encontrar en las regiones alfa-2 (α_2) y beta (β), como se refiere en la siguiente figura 3. Aproximadamente en el 5% de los casos se detectan dos paraproteínas, produciéndose una gammapatía biclonal (5). Generalmente las proteínas totales se encuentran aumentadas por la excesiva producción de inmunoglobulina monoclonal, sin embargo, también suele encontrarse hipoalbuminemia de forma que las proteínas totales quedan equilibradas.

La electroforesis sérica identifica la proteína M en alrededor del 80 al 90% de los pacientes. El 10-20% restante suelen ser pacientes que sólo presentan cadenas ligeras monoclonales, libres (proteína de Bence Jones) o IgD. En ellos, casi siempre se detecta proteína M por electroforesis de proteínas en orina. Por tanto, en el caso de los mielomas Bence-Jones generalmente la banda monoclonal no aparece en suero, con lo que sus proteinogramas suelen ser normales o presentar hipogammaglobulinemia, es por ello que resulta fundamental realizar en paralelo el estudio de la presencia de proteínas en orina (6).

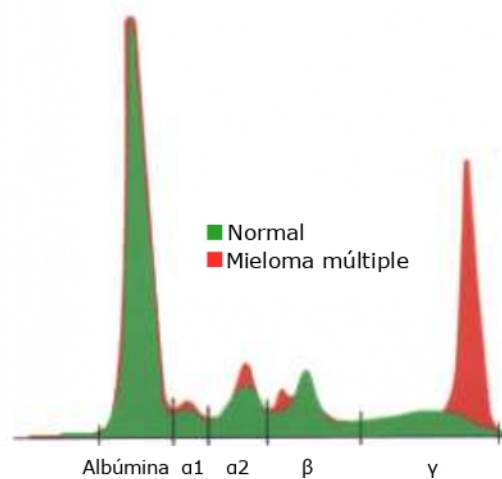


Figura 3. Proteinograma o electroforesis de las proteínas del suero. Patients with multiple myeloma show a “spike” in the α_2 , β or γ regions of the serum protein electrophoresis. Extraído de George y Sadovsky 1999 (24).

Una vez detectado el pico monoclonal mediante la electroforesis, debe realizarse la inmunofijación o inmunolectroforesis (en sangre y en orina), con la que se identificará el tipo de inmunoglobulina predominante (tanto el tipo de cadena pesada como el tipo de cadena ligera).

La inmunofijación se realiza, además de para confirmar la presencia de proteína M, para distinguir entre el tipo de cadenas ligeras y cadenas pesadas presentes. Esta técnica es esencial para diferenciar gammopatías monoclonales de policlonales, ya que las monoclonales son neoplásicas o potencialmente neoplásicas, mientras que las policlonales (con aumento de ambos tipos de cadenas ligeras) resultan de procesos inflamatorios o reactivos, como enfermedad hepática crónica o infecciones crónicas (25).

La determinación de cadenas ligeras en suero provee valiosa información en los casos de GMSI y SM, que de otra forma pasarían desapercibidos si no presentaran ningún otro hallazgo clínico, puesto que generalmente los estudios de electroforesis y de inmunofijación suelen ser negativos. La sensibilidad de estos estudios ha aumentado de cara a identificar alteraciones de cadenas ligeras, ya que estas son eliminadas rápidamente por el riñón (5).

2.1.4.1. Alteraciones morfológicas de las células plasmáticas

Dentro de la médula ósea, las células plasmáticas se disponen de tres maneras diferentes, en agrupaciones intersticiales, en nódulos focales o aparecen difusas. Las células pueden parecer maduras o inmaduras, pleomórficas o como plasmablastos. Acorde a esta variabilidad se han establecido ciertos términos descriptivos, que en ningún caso pueden ser definitivos en el diagnóstico (5, 14).

Células Mott o morulares: células plasmáticas que presentan un número variable de cuerpos de Russell (hasta 100) en su citoplasma. Tienen un tamaño de 1 a 5 μm de diámetro. Son ligeramente basófilas pero a veces pueden ser incoloras, grises, rosadas e incluso eosinofílicas (26) (Figura 4).

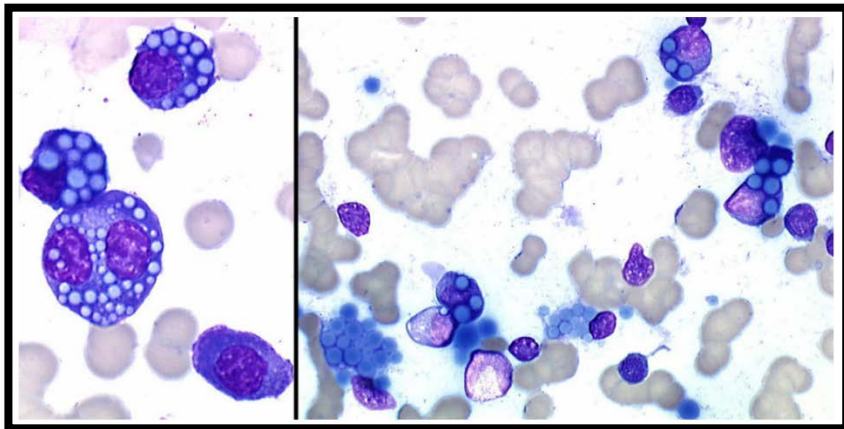


Figura 4. Células Mott en MM. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

Células flameadas o tesaurocitos: células plasmáticas que adquieren un color rojizo o magenta en su citoplasma, con un tono carmín en la periferia al ser teñidas con los reactivos May Grünwald-Giemsa. Este color en el citoplasma está relacionado con la dilatación de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, debido a la acumulación de inmunoglobulinas con alto contenido en carbohidratos (27) (Figura 5).

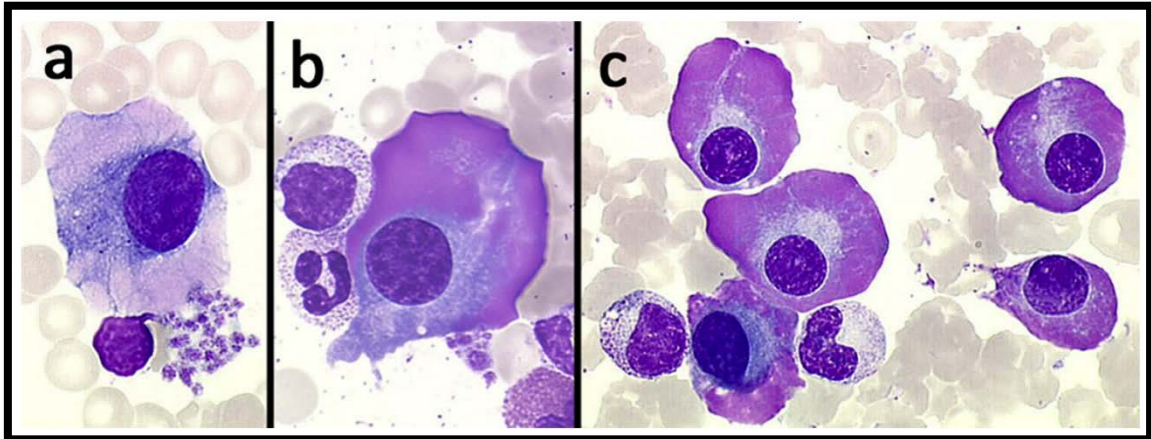


Figura 5. Células flameadas en pacientes con a) plasmocitosis reactiva b) GSMI y c) MM. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

Cuerpos de Dutcher: son acumulaciones intracitoplasmáticas de inmunoglobulinas que aparecen como inclusiones invaginadas hacia o sobre el núcleo. Ssu tamaño es variable, pudiendo llegar a alcanzar todo el núcleo y confundirse con un nucléolo (28) (Figura 6).

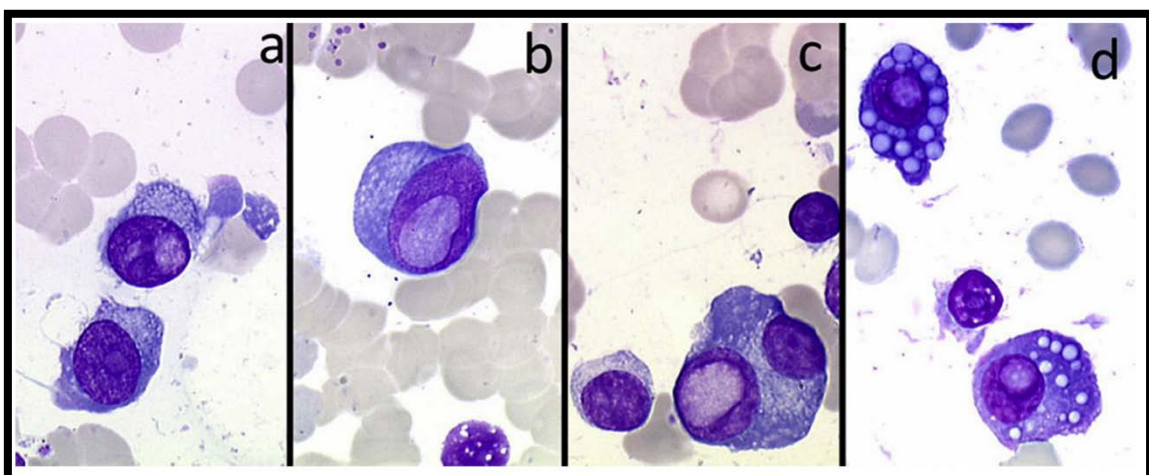


Figura 6. Cuerpos de Dutcher en pacientes con MM. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

Inclusiones cristalinas: son varillas azurófilas con una ultraestructura cristalina, algunas similares a bastones de Auer. Suelen ser alargadas y finas, ubicándose de forma dispersa en el citoplasma o agrupadas en haces. Estas inclusiones son hallazgos morfológicos muy raros y su etiología aún es confusa (26) (Figura 7).

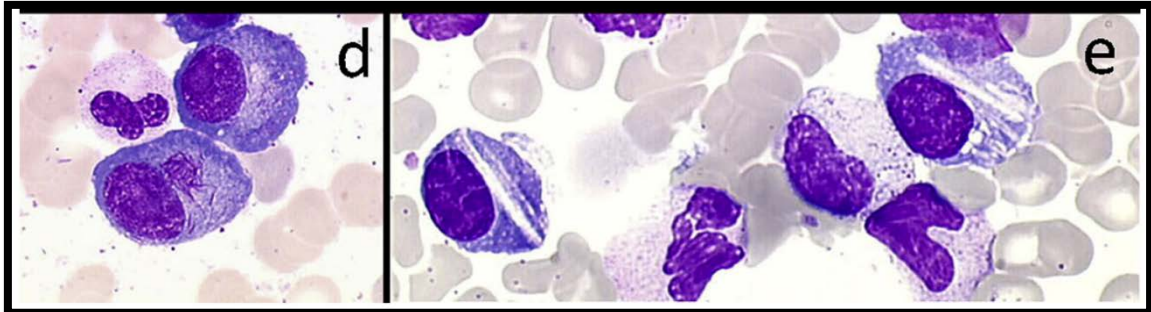


Figura 7. Bastones de Auer en pacientes con MM. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

Estas cuatro alteraciones morfológicas han sido descritas en el citoplasma de las células plasmáticas. En cuanto al núcleo, también se han reportado alteraciones morfológicas:

Contorno nuclear y cromatina irregular, los núcleos aparecen con muescas, lo cual se ha relacionado con casos de hipodiploidia. Los análisis morfométricos de células plasmáticas en el mieloma han demostrado que estas células se relacionan con estadios avanzados de la enfermedad, asociándose a un peor pronóstico (29) (Figura 8 y 9).

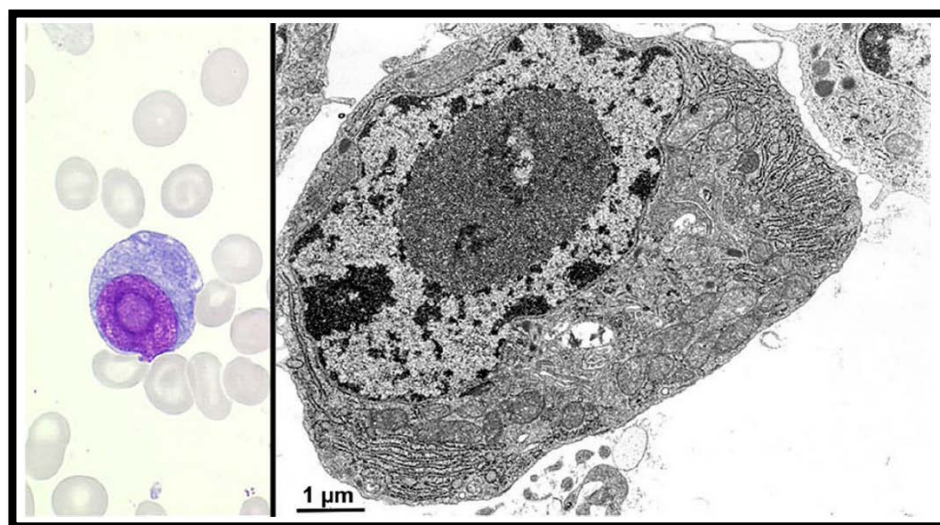


Figura 8. Célula plasmática inmadura con nucléolo prominente y cromatina finamente dispersada. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

Con más de un núcleo, binucleadas y multinucleadas. Generalmente presentan un núcleo, y sólo en contadas ocasiones se han detectado células plasmáticas con más de uno, llegando a detectarse hasta cuarenta núcleos en un caso reportado de mieloma no secretor. Sin embargo, esta presentación no es habitual y no se asocia directamente al desarrollo de mieloma ya que también han sido reportadas en médulas óseas normales (30) (Figura 9).

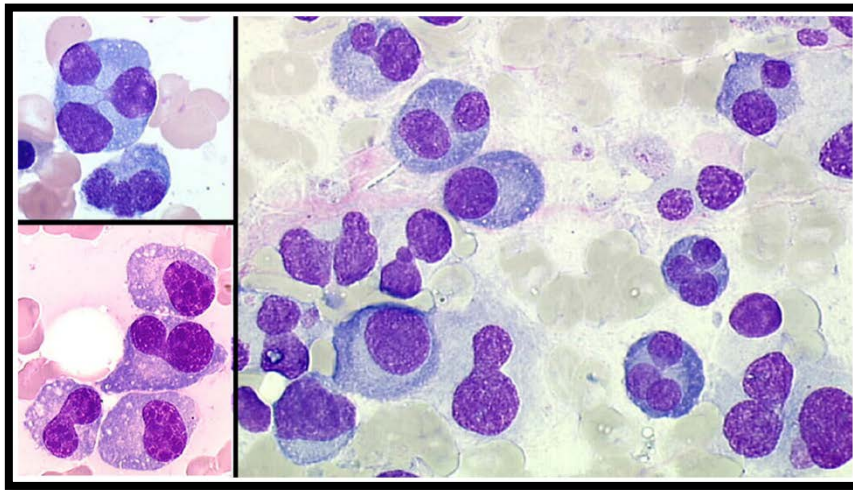


Figura 9. Células plasmáticas con uno o más núcleos y contorno irregular. Extraído de Ribourtout 2015 (27).

2.1.4.2. Inmunofenotipo

El diagnóstico de desórdenes en las células plasmáticas requiere la confirmación de la naturaleza clonal de las mismas. Para ello el patrón de antígenos de superficie de la célula plasmática ayuda a clasificar los desórdenes y para valorar las características clínicas. La determinación del inmunofenotipo por citometría de flujo es la técnica idónea (5, 26).

Las células plasmáticas, tanto normales como neoplásicas, se caracterizan fundamentalmente por la alta expresión conjunta de CD38 y CD138 (31). La expresión de CD38 en concreto es bastante elevada en las células plasmáticas localizadas en médula ósea, sin embargo, hay que tener en cuenta que otras poblaciones celulares linfoides y mieloides, sobre todo células T activadas, NKs (en inglés, *natural killers*), y monocitos también lo expresan (32, 33). Su razonable especificidad sugiere la importancia de su uso rutinario para la identificación, de todas formas hay que tener en cuenta que tanto por la

expresión por otras poblaciones celulares como por la variación en la densidad de la expresión que puede verse disminuida es importante analizarlo en conjunto con CD138 (34). El caso del receptor CD138, es que es más específico, pero menos sensible, ya que su expresión es más heterogénea. Además, la heterogeneidad de ambos receptores varía a su vez en función del diagnóstico, del estadio de la enfermedad, de los tratamientos y de diversas características biológicas. Por ejemplo, en el caso de los tratamientos y/o su posible efectividad, en el caso de CD38, es conocido que su alta expresión se correlaciona con una alta probabilidad de lograr una respuesta parcial en comparación con los que muestran valores basales bajos de CD38 (35). Así mismo, en el caso de CD138, su baja expresión a nivel basal se correlaciona con una peor supervivencia global (36). A causa de esta heterogeneidad, son varios los estudios que demuestran que el uso del inmunofenotipado por citometría tiene un alto valor pronóstico al correlacionarlo con anomalías genéticas a través de estudios de citogenética o de fluorescencia de hibridación in situ (o FISH en inglés), por lo que es importante incorporar otros marcadores en citometría para hacer así el estudio más completo. Fundamentalmente, se emplean marcadores considerados de expresión aberrante en la célula B, incluida la plasmática, como CD20, CD27, CD33, CD56 y CD117; así como CD45 que suele presentar una expresión similar de positivas y negativas en estadios previos (GMSI, SM), pero en pacientes de nuevo diagnóstico y en recaída domina CD45+ (26, 34, 37).

- *Desregulación del sistema inmune en el mieloma múltiple*

En los últimos años, mediante el estudio del inmunofenotipo se ha visto ampliado a ciertas moléculas que interactúan con los distintos tipos celulares inmunitarios como son las células NKs o células T. Es importante el estudio de la activación/inhibición de ciertos receptores o ligandos que directamente se encuentran implicados en la desregulación inmune del MM, promoviendo la proliferación de las células tumorales (38). Uno de los ligandos más relevantes es el ligando de muerte celular programada 1 (en inglés Programmed cell death ligand 1, PD-L1) ya que el eje que conforma con su receptor PD-1 en la superficie de células NKs, B y Ts al verse bloqueado por estrategias terapéuticas ha mostrado un sorprendente impacto clínico en tumores sólidos. Es por ello que PD-L1 y PD-L2, otro ligando de PD-1, estén bajo estudio en la patogénesis del MM

(38). Además, otros ligandos se están estudiando para conocer su impacto en el desarrollo del MM, en su resistencia a los tratamientos y en la evasión del sistema inmune, tales como los ligandos de NKG2D, receptor de células NKs y Ts, cuya unión con los ligandos MICA/B, ULBP1, 2, 3, 4, 5 y 6 juega un importante papel en la muerte celular de las células de MM (39, 40). Otros ligandos bajo estudio son los llamados de apoptosis, entre los que están el ligando de FAS (FAS-L) y los receptores de muerte 4 y 5 de los ligandos inductores de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (en inglés, tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand death receptor 4 and 5, TRAIL-DR4 and TRAIL-DR5). En el caso de FAS-L su sobreexpresión se corresponde con una mayor agresividad de la enfermedad y un alto grado de malignidad, de forma que se ha propuesto su bloqueo como una herramienta terapéutica (41, 42). En el caso de TRAIL-DR4 y 5 se ha visto que se encuentran inhibidos por el microambiente de la médula ósea evitando así la inducción de muerte por apoptosis (43). También se ha resaltado la importancia de los llamados ligandos virales CD155 y CD112 ya que interaccionan con el receptor CD226, presente en células NKs y Ts (44). En MM y en otras neoplasias se ha descrito recientemente que estas uniones suponen un mecanismo crítico de defensa inmune, que evita la muerte de las células tumorales (45, 46). Además, otra de las moléculas importantes que se expresan en las células de MM, como es el complejo mayor de histocompatibilidad E (HLA-E), se ha visto que provoca una señal inhibitoria de las células NKs; y su alta expresión se ha correlacionado con recaídas tempranas de los pacientes (47).

2.1.5. Factores de riesgo

La enorme variabilidad en la evolución y desarrollo del MM hace que la identificación de factores de riesgo sea de gran importancia tanto para la estratificación de grupos con riesgo de progresión como para prevenir sus posibles efectos. A pesar de tener una etiopatogenia desconocida, se han identificado diversos factores de riesgo, a nivel génico, epigenético y biológico.

En pacientes con mieloma se detectan en un 90% de las células plasmáticas anomalías citogenéticas. Además, la sucesión de alteraciones genéticas se ha visto que desemboca en la progresión de pacientes con GMSI a mieloma. En general, se ha

visto que los eventos iniciales se agrupan en la mitad de los pacientes presentando translocaciones de la Ig de cadena pesada y la otra mitad con hiperdiploidia, más específicamente aneuploidia en cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21. A su vez estos eventos primarios se diluyen con una compleja variedad de alteraciones genéticas entre las que se incluyen la amplificación del cromosoma 1q, deleción del cromosoma 13, deleción del cromosoma 17p, desregulación de proteínas MYC y CYCLIN D, así como mutaciones en oncogenes específicos de enfermedades como son KRAS, NRAS, FAM46C, DIS3, BRAF, TRAF3, y TP53. Todas estas alteraciones genéticas junto a la presión selectiva que ejerce el microambiente de la médula ósea y los tratamientos empleados promueven el sobrecrecimiento de subclones que albergan mutaciones específicas, confiriendo ventaja a nivel de supervivencia (3, 48).

Por otro lado, las alteraciones epigenéticas también están implicadas en la patogénesis y progresión del MM. Los principales mecanismos descritos engloban la metilación del ADN (ácido desoxirribonucleico), la acetilación de histonas y los microARNs. El más estudiado hasta ahora es la metilación del ADN ya que se han detectado varios patrones de metilación que identifican loci hipermetilados con subtipos agresivos de la enfermedad. Los menos conocidos son los epi-microARNs que son microARNs que se dirigen a zonas reguladoras epigenéticas de ADN-metiltransferasas e histonas-deacetilasas (14, 49). Es importante conocer todos estos mecanismos pues la alta frecuencia de cambios epigenéticos provoca determinados patrones de expresión génica y subpoblaciones celulares heterogéneas, de forma que pequeñas poblaciones celulares sobreviven a los tratamientos, siendo más tolerantes y por tanto desarrollando resistencia a los fármacos. Por ejemplo, recientemente la tolerancia generada a los inhibidores del proteasoma (PIs) se ha asociado a cambios epigenéticos, pudiendo ser eliminada con terapias combinadas con inhibidores de la histona deacetilasa e intermitentes gracias a la plasticidad de los cambios epigenéticos (50).

Con el avance de la tecnología se está logrando caracterizar todos esos cambios que se producen a nivel genómico y epigenómico a lo largo de la proliferación de las células plasmáticas, lo que permitirá desde personalizar más los tratamientos a encontrar posibles nuevos biomarcadores de la enfermedad.

2.1.6. Tratamientos

El MM es una enfermedad heterogénea, cuya agresividad y resistencia a los tratamientos es el resultado de diversos errores genéticos, así como de alteraciones celulares al seleccionarse ciertos clones. De esta forma, hay pacientes que pueden sobrevivir hasta una década tras su diagnóstico mientras que otros sufren rápidamente progresiones al resistir a los tratamientos y fallecen (51).

En los últimos 20 años, la aprobación de numerosos agentes para tratar el MM junto con una utilización más eficaz de los tratamientos existentes ha supuesto un impacto significativo en la manera en que se trata el mieloma al prolongar la media de supervivencia de los pacientes de 3 a 8-10 años. En la actualidad, los tratamientos para el mieloma pueden ser muy eficaces para parar el avance de la enfermedad, controlar los síntomas y mejorar la calidad de vida. No obstante, incluso después de haberse recibido el tratamiento acertado, es imprescindible un seguimiento médico del paciente (1).

El tratamiento del MM normalmente incluye diferentes combinaciones de fármacos con distintos mecanismos de acción, desde los más conocidos, como son corticosteroides, agentes alquilantes, inhibidores del proteasoma (PIs), fármacos inmunomoduladores (en inglés, immunomodulatory drugs, IMiDs), a los más nuevos, como son inhibidores de histona deacetilasa (panobinostat) o anticuerpos monoclonales (daratumumab, elotuzumab) (52).

Los agentes alquilantes fueron los primeros fármacos en emplearse en el MM, y a día de hoy siguen formando parte de las combinaciones de tratamientos. El mecanismo de acción se basa en la alquilación (adición de grupos metilo) del ADN, impidiendo su duplicación, lo que provoca la pérdida de funcionalidad y la consecuente inducción de la apoptosis celular (53). Los más utilizados vienen recogidos en la tabla 3. Sin embargo, hay pacientes en los que estos fármacos generan resistencias tanto tras su primera administración como tras una exposición continua. Se ha sugerido que es debido a la capacidad del sistema de reparación del ADN de revertir la acción alquilante de estas drogas (54). El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos con melfalán a altas dosis sigue siendo un tratamiento clave en sujetos menores de 70 años

Los corticosteroides son desde hace años fármacos fundamentales en el tratamiento del MM, tanto al diagnóstico como en recaídas. Son hormonas de estrés que

mantienen la homeostasis y el control de una amplia variedad de procesos fisiológicos. Basados en su fuerte acción antiinflamatoria e inmunosupresiva, los glucocorticoides son fármacos ampliamente usados en el tratamiento de condiciones inflamatorias como rechazo de trasplante de órganos, enfermedades autoinmunes y asma, así como terapia anticancerígena de neoplasias linfoides (55) (ver tabla 3). Su mecanismo de acción en el MM está basado fundamentalmente en la trans-represión del factor nuclear $\kappa\beta$, lo que induce la apoptosis de las células de MM (56). Aunque muestran una gran actividad empleados en monoterapia, su uso se limita por las toxicidades generadas por sus altas dosis de administración que impactan directamente en la calidad de vida de los pacientes. Es importante su uso en combinación con otros fármacos, como agentes inmunomoduladores para manejar mejor los efectos secundarios (57).

Los agentes inmunomoduladores son denominados así por su fuerte capacidad para estimular la respuesta inmune. El primero en emplearse fue la Talidomida, un derivado del ácido glutámico que había sido empleado como tratamiento para las náuseas de las embarazadas a mediados de los años 50. Tras retirarlo del mercado por sus efectos teratogénicos, ha sido objeto de estudio de investigación en varios campos, desde el tratamiento de pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana a pacientes con enfermedades de piel autoinmunes (58). Fue ya en 1999, año en el que apareció el primer estudio sobre la eficacia de este nuevo fármaco en el tratamiento del MM (59). Después aparecieron la Lenalidomida y la Pomalidomida, demostrando una potencia superior a la Talidomida y con mejores efectos anti-MM, especialmente en el caso de MM refractarios (52). El mecanismo de acción se produce fundamentalmente por la disminución de la producción de citoquinas y de factores de crecimiento al unirse a la proteína CRBN, lo que conduce a un efecto antiangiogénico, antiproliferativo, antiinflamatorio, proapoptótico y de parada del ciclo celular en la célula del MM (60). Estos fármacos son caros y presentan efectos secundarios graves, por lo que su uso en combinación es recomendado para potenciar su eficacia y reducir los efectos colaterales. Tal es el caso de la combinación con dexametasona, fármaco sinérgico y que ayuda a mejorar la tasa de respuesta y la supervivencia libre de progresión (53).

Los inhibidores del proteasoma representan uno de los mayores avances en el tratamiento del MM en los últimos años con el descubrimiento de la actividad catalítica de los proteasomas. En MM la elevada presencia de Ig, provoca una alta actividad de generación/degradación proteica por lo que la función del proteasoma se encuentra

aumentada. La síntesis del Bortezomib ha demostrado desde su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) en 2003 una eficacia clínica sorprendente en el MM. La actividad anti-MM producida por la inhibición del proteasoma es la consecuencia de numerosos efectos a nivel biológico empleado tanto como tratamiento de primera línea como de posteriores y en pacientes que son refractarios a todos los tratamientos (53, 61). El Carfilzomib fue aprobado en julio de 2012 y en la actualidad se emplea fuera de primera línea, principalmente en pacientes refractarios (62). A pesar del éxito de estos fármacos, existe un 20% de pacientes que en primera línea se muestra totalmente resistentes a su efecto antineoplásico y este porcentaje aumenta en líneas posteriores. Con el fin de evitar el desarrollo de posibles resistencias se promueve su uso en combinación con fármacos como dexametasona (63, 64), e incluso se ha propuesto revertir su sensibilidad tras un tiempo sin tratamiento (50).

Por último, los tratamientos más nuevos como son el caso de los inhibidores de la histona deacetilasa requieren todavía mayor investigación por las toxicidades que generan, pero han demostrado un gran interés por su acción a nivel epigenético. Otro grupo de fármacos novedosos y que actualmente ha adquirido un papel destacado en el tratamiento del MM son los anticuerpos monoclonales que han despertado altas expectativas debido a una mejor tolerancia y menor toxicidad (1).

Clase de fármaco	Ejemplo	Uso clínico
Agentes alquilantes	Prototipo: melfalán Otros: ciclofosfamida, bendamustina	En combinación con dexametasona
Corticosteroides	Prototipo: dexametasona Otros: prednisona, metilprednisona	En combinación para la inducción y otros regímenes.
Inmunomoduladores	Prototipo: talidomida Otros: lenalidomida, pomalidomida	En combinación para inducción, consolidación y recaída.
Inhibidores del proteasoma	Prototipo: bortezomib Otro: carfilzomib	En combinación para inducción, consolidación y recaída. No usado en monoterapia
Inhibidores de la histona deacetilasa	Prototipo: panobinostat	En combinación con bortezomib para recaída.
Anticuerpos monoclonales (anti-CD38)	Prototipo: daratumumab Otro: isatuximab	En combinación con bortezomib y dexametasona para recaída

Tabla 3. Tratamientos en MM. Extraída y adaptada de Michels 2017 (65).

2.1.7. Modelos experimentales murinos

Los modelos animales son herramientas indispensables para el estudio de los mecanismos fisiológicos y patológicos presentes en el ser humano. En el caso del MM, los modelos murinos utilizados son herramientas clave para la comprensión de la patogénesis, los mecanismos de resistencia y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (ver tabla 4). Sin embargo, a pesar de la variedad de modelos existentes no existe ninguno que modelice la enfermedad tanto de forma que adquieran el espectro de cambios genéticos que se acumulan a nivel individual a lo largo de la enfermedad como la heterogeneidad misma encontrada en los pacientes. Es por ello que la elección del modelo varía ampliamente, partiendo de requisitos a nivel de sistema inmune, pasando por el uso de líneas celulares o células primarias, hasta el desarrollo de la enfermedad ósea y/o habilidad para modificar el microambiente de la médula ósea (66).

Los modelos hasta ahora utilizados fundamentalmente se dividen en singénicos y xenogénicos. En el caso de los modelos singénicos son útiles porque el microambiente concuerda perfectamente con el del tumor investigado y se diferencian dos tipos de modelos, los 5T descubiertos por Radl a finales de los 70 (5T Radl) y los diseñados genéticamente (en inglés, genetically engineered models, GEEM). Los 5T Radl son ratones endogámicos C57BL/KalwRij inmunocompetentes que desarrollan una variedad de desórdenes proliferativos de células B, incluido el MM. En concreto se trasplantan células de médula ósea de animales con MM, resultando un modelo reproducible con características de la enfermedad del MM que incluyen crecimiento tumoral en médula ósea, aumento de paraproteínas, disfunción renal y desarrollo de enfermedad lítica ósea. Sin embargo, la utilidad de este modelo queda limitada por la proporción de células que injertan por animal. Los más usados y más caracterizados son los modelos 5T2MM, 5T33MM y 5TGM1. Por el contrario, los diseñados genéticamente o transgénicos representan al completo el proceso del desarrollo de la enfermedad desde inestabilidades genómicas iniciales a cargas tumorales clínicamente relevantes. Este hecho implica un periodo largo de observación, al ser una enfermedad de individuos mayores, y por tanto la naturaleza de estos modelos presenta una alta tasa de variación de crecimiento tumoral en comparación con otros modelos, lo que implica una mayor demanda estadística.

Además, estos modelos no están tan bien caracterizados como los 5T y son más difíciles de manipular, de forma que reproduzcan fielmente la enfermedad del MM. Los modelos más empleados son Vk*MYC, E μ -xbp-1s y L-GP130 (66-68).

Los modelos xenogénicos o de xenoinjerto son aquellos en los que se hace un injerto de líneas celulares o de células primarias humanas en ratones inmunocomprometidos o humanizados. Se emplean tanto para generar enfermedad sistémica a través de un injerto intravenoso como enfermedad local a través de un injerto subcutáneo o intratibial. Estos modelos permiten la oportunidad de evaluar el nicho de las células de MM en médula ósea y testear la eficacia de terapias *in vivo* (67). En el caso de los ratones inmunocomprometidos están los SCID, los NOD/SCID y los NSG (NOD SCID gamma). Estas cepas son deficientes en linfocitos B y T funcionales, y además los NSG son deficientes también en células NK. En el caso de los NSG que tienen ausencia de interleucina 2 (Il-2), una mayor inmunosupresión ha mostrado una mejora significativa en las posibilidades de injerto comparado con los SCID y NOD/SCID. De hecho, la inyección intravenosa de líneas celulares como JLN3, U266 u OPM2 ha mostrado las clásicas características de MM, que incluyen paraplejía, paraproteína en suero, lesiones osteolíticas y pérdida del hueso trabecular. Se ha visto además que en los NSG la mayoría de las líneas celulares administradas de forma intravenosa resultan en injerto en MO, siendo muy representativas de la enfermedad humana. Dada la reproducibilidad de estos modelos y el desarrollo de enfermedad ósea, esta línea es regularmente usada en la actualidad para el testeo de nuevos agentes terapéuticos (66, 68). Sin embargo, estos modelos al ser inmunodeficientes son incapaces de recapitular las complejas interacciones entre el tumor y el microambiente. Es por ello que en los últimos años se están desarrollando los modelos humanizados. Dentro de este grupo se han desarrollado tres tipos de modelos SCID-hu, SCID-rab y SCID-synth hu. En el caso de SCID-hu y SCID-rab son ratones SCID implantados con chips de hueso fetal humano o de conejo con líneas de mieloma que se injertan directamente en hueso. La principal ventaja es la alta tasa de injerto. Sin embargo, la principal limitación de este modelo es el uso de hueso fetal tanto humano como de conejo, lo cual por un lado no encaja con la edad de desarrollo del MM y además es difícil de adquirir debido a consideraciones éticas. El modelo SCID-synth-hu supera esas limitaciones ya que permite el crecimiento de las células primarias de MM en un implante biosintético 3D cubierto por estroma de MO. A pesar de ser el

único modelo de investigación traslacional, todavía alberga retos en cuanto a su estructura polimérica (66-68).

Los modelos más ampliamente empleados para el estudio del MM son los inmunodeficientes NOD/SCID gamma (NSG), si bien es cierto que en función de los objetivos que se persigan pueden ser más interesante el uso de unos u otros.

	Strengths	Challenges
Syngeneic models	Competent immune system of the host Realistic tumor microenvironment	Limited number of models available
5T33 [61]	Suitable for fast drug screening	Does not reflect patient heterogeneity
GEMM [63]	Defined mutations mimic those in human MM Follow-up of early stages in tumor development	Development is costly and time-consuming Tumor development is slow and variable
Xenogenic models in immunodeficient mice	Highly reproducible cell line based models Reflect patient heterogeneity by using patient derived material Allows screening approaches for biomarker development	Mice are immunocompromised Major parts of the tumor microenvironment are missing
NOD/SCID [71]	Gold-standard, with available reliable protocols + data	Low take rates for patient derived material
NSG [40]	Improved engraftment capacities compared to NOD/SCID	Lacks most of the components of the immune system.
Xenogenic models in humanized mice	Appropriately mimics human tumor microenvironment Reflect patient heterogeneity by using patient derived material	Expensive Technically challenging
SCID hu [77]	Reflect patient disease with respect to bone lesions	Restricted availability of human bone chips
SCID rab [88]	Improved availability of implantation matrix	Nonmyelomatous & nonhuman microenvironment
SCID synth hu [89]	Overcomes restricted availability of human bone chips	Heterogeneity of human stromal cells

GEMM: Genetically engineered mouse model; MM: Multiple myeloma; NOD/SCID: NOD.Cg-Prkdcscid; NSG: NOD/SCID IL-2Rγ(null); SCID hu: Prkdcscid bearing human bone implants; SCID rab: Prkdcscid bearing rabbit bone implants; SCID synth hu: Prkdcscid bearing synthetic scaffolds filled with human stromal cells.

Tabla 4. Modelos in vivo de MM humano. Extraído de Schüler 2013 (68).

2.2. METABOLISMO Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN TUMORES HEMATOLÓGICOS

2.2.1. Generalidades del metabolismo en cáncer

El conocimiento de que el metabolismo se encuentra alterado en células cancerígenas para mantener la acumulación de biomasa más que para una eficiente producción energética fue desarrollado a raíz de las observaciones hechas por Louis Pasteur y Otto Warburg. En la década de 1880, Pasteur en sus estudios sobre el proceso de fermentación en levaduras, postuló que el oxígeno suprimía la glicolisis en presencia de oxígeno (69). Y Warburg hace 100 años demostró que los tejidos tumorales humanos y animales presentan una elevada glicolisis aun en presencia de oxígeno, de forma que

gran parte de la glucosa que consumen, se convierte a través de la fermentación láctica en lactato, incluso cuando hay suficiente oxígeno para oxidar la glucosa mediante el ciclo de Krebs en la mitocondria (70).

En los últimos años, los cambios metabólicos del cáncer se han asociado con 6 características distintivas: 1) absorción alterada de glucosa y aminoácidos, 2) uso de formas oportunistas para la adquisición de nutrientes, 3) uso de la glicolisis/ciclo de Krebs para la síntesis de compuestos intermediarios y la producción de NADPH, 4) aumento de la demanda de nitrógeno, 5) alteración de metabolitos conducida por la regulación de ciertos genes y 6) interacciones metabólicas con el microambiente; de hecho, en algunos cánceres se dan las 6 características, mientras que en otros solo algunas (71, 72). Las células malignas adquieren estas adaptaciones metabólicas como respuesta a una variedad de señales celulares intrínsecas y extrínsecas. Algunas de estas adaptaciones inician el proceso de transformación, otras promueven el crecimiento de las células malignas y otras las vuelven susceptibles a inhibidores de vías clave. Además, se refleja una alta heterogeneidad tanto entre distintos tumores como dentro del mismo tumor a lo largo del tiempo. Lo que resulta en que estas características metabólicas son selectivas de subtipos, más que uniformes entre todos los cánceres. Este hecho es consistente con la eficacia variable de las terapias (73).

Otra de las grandes premisas del metabolismo en tumores se basa en el trabajo realizado en los años 90, cuando se postuló que los cambios metabólicos son dirigidos por cambios en oncogenes y supresores tumorales, como con los factores inducibles de hipoxia (en inglés, Hypoxia Inducible Factors, HIFs) que alteran vías metabólicas. Oncogenes humanos como MYC, PI3K y RAS dirigen la proliferación celular neoplásica estimulando el metabolismo celular a través de alteraciones en la transcripción, traducción y post-traducción de enzimas metabólicas (69). La habilidad de estos y otros genes de regular el metabolismo de forma autónoma representa el concepto de reprogramación metabólica, de forma que las mutaciones responsables del inicio del cáncer, permiten a las células de tumores emergentes adquirir propiedades metabólicas que sostengan la supervivencia celular, la evasión del sistema inmune y el crecimiento hiperplásico (73). Por ejemplo, en el caso de las alteraciones que afectan al oncogén MYC, como son translocaciones o la sobreexpresión, son conocidas por ser características en la patogénesis de neoplasias de células B. Se ha descrito como las células requieren elevados niveles de MYC para mantener su alta tasa proliferativa, de

forma que modulan la función de este oncogén para adaptarse a la disponibilidad de nutrientes y evitar un colapso metabólico (70, 71, 74)

2.2.2. La mitocondria en cáncer

Históricamente, el metabolismo mitocondrial se ha considerado erróneamente sin importancia respecto a las demandas metabólicas de las células que proliferan rápidamente; en consecuencia, se propuso la disfunción mitocondrial como una de las características de las células cancerígenas. Este concepto se revisó en la década de los 50, cuando se demostró que tanto en tejidos sanos como en células tumorales de hígado o mama, el ácido graso palmitato se oxidaba de forma efectiva(75). Estudios recientes han provisto la evidencia genética de que el metabolismo mitocondrial es esencial en la tumorigénesis (74).

Por otro lado, al asumir el paradigma de que las células cancerígenas presentaban una glicolisis aumentada, la fosforilación oxidativa (OXFOS) se encontraba regulada negativamente en todos los cánceres. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que OXFOS puede encontrarse estimulado en ciertos tipos de cánceres, incluidas leucemias, linfomas, adenocarcinoma pancreático ductal y cáncer de endometrio (76). El papel de la mitocondria en el cáncer también está representado directa o indirectamente por el bloqueo de la apoptosis, la invasión/metástasis y el estrés oxidativo. La mitocondria es una fuente endógena de especies reactivas de oxígeno (en inglés, reactive oxygen species, ROS), que permite su salida a través de la cadena de transporte de electrones durante el proceso de OXFOS. El sistema de OXFOS consiste en 5 complejos multiproteicos (del I al V), dónde existen dos puntos principales de generación de ROS, uno en la membrana mitocondrial interna (Complejo I, NADH deshidrogenasa) y otro en la interfaz entre los complejos II y III. La generación de ROS supone una espada de doble filo en la tumorigénesis (77).

A nivel estructural, las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos que se originaron de bacterias simbiotas, de forma que al co-evolucionar con su hospedador la mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas por el núcleo. Sin embargo, su origen externo de hace 1.5-2 millones de años hace que tengan su propio

sistema genético englobado en el denominado ADN mitocondrial (ADNmt) (72, 78). El genoma mitocondrial humano es circular y está formado por 16.6 kb que codifican en concreto 13 genes clave de la cadena de transporte de electrones (79). El número de copias de ADNmt está estrictamente regulado en la diferenciación, de forma que aquellas células con altas demandas de ATP (adenosín trifosfato) presentan un elevado número de copias de ADNmt. Por tanto el número de copias es una buena representación de la actividad mitocondrial, fundamentalmente porque la masa mitocondrial o la actividad de enzimas respiratorias se relaciona con la parte del genoma que se necesita para producirlas (80). A nivel de desarrollo de tumores, se ha reportado que varios cánceres presentan un aumento del contenido mitocondrial respecto a tejidos sanos, entre los que se incluyen la leucemia linfoblástica aguda (LLA), el linfoma no-Hodgkin, el endometrial, el colorectal, el de ovario, el de próstata, el de cuello y cabeza, el adenocarcinoma de pulmón, el carcinoma esofágico de células escamosas y cánceres de tiroides (79, 81).

La enzima citocromo c oxidasa (COX) también se considera un buen indicador subrogado de la función mitocondrial. En concreto, COX está formada por 3 subunidades codificadas por el ADNmt y 10 por el ADN nuclear (ADNn) y constituye el complejo IV de la cadena de transporte de electrones. Son varios los estudios enfocados en las funciones biológicas de COX en el desarrollo de tumores, como es el caso del cáncer colorrectal en el que se ha descrito una elevación de COX (82).

En el caso de los tumores hematológicos, se ha descrito una dinámica metabólica alterada en la MO, basada en la transferencia de mitocondrias entre células hematopoyéticas y progenitoras, y las de soporte estromal durante la proliferación y diferenciación como respuesta a la presencia del lactato extracelular, debido a la elevada utilización extracelular de glucosa y glutamina. Se ha propuesto que la transferencia de mitocondrias se produce para mantener el estrés oxidativo asociado al mantenimiento de la proteostasis en el MM y la leucemia mieloide aguda (LMA) (83). Además, se ha propuesto que la elevada presencia del lactato extracelular promueve un microambiente permisivo a nivel inmunológico, de forma que atenúa la activación de células T y dendríticas y la migración de monocitos (71).

El microambiente tumoral ejerce presiones en las células cancerígenas, como privación de nutrientes y oxígeno, acidificación del espacio extracelular e interacciones aberrantes célula-célula y célula-estroma. La progresión tumoral requiere que las células cancerígenas toleren estas presiones y desarrollen mecanismos para continuar su

proliferación (73). Por tanto, el impacto funcional del metabolismo tumoral aberrante no sólo se limita a las propias células malignas, sino que también impacta en el microambiente y la regulación inmune (84). En concreto, en el linfoma se ha reportado la contribución del microambiente tumoral en la progresión de la enfermedad siendo clave para la inmunoterapia y los inhibidores de punto de control (en inglés, checkpoint inhibitors). De forma que se ha propuesto el microambiente tumoral como una diana del metabolismo tumoral (70). Ejemplos como este han hecho que en los últimos años la comprensión del papel de la mitocondria en cáncer esté proporcionando nuevos enfoques de terapia dirigida.

En concreto, en los últimos cinco años se ha propuesto el uso de inhibidores de OXFOS tanto para tratar cánceres en los que este se encuentra aumentado como para aliviar la hipoxia tumoral y así mejorar el resultado de ciertos tratamientos (76). Tal es el caso de cáncer de mama y el linfoma Hodgkin en los que OXFOS está sobrerregulado, de forma que la actividad de los complejos I, II y IV se encuentra aumentada respecto a las células adyacentes estromales. En ellos se ha observado que la actividad de los complejos puede subvertirse con el tratamiento con metformina o azida sódica, inhibidores de los complejos I y IV (69, 76).

Nuevas oportunidades clínicas han surgido también del estudio del papel de la reprogramación metabólica en los casos de resistencia a tratamientos. La adquisición de resistencia a terapias es un factor importante en la mortalidad asociada al cáncer y las alteraciones metabólicas tienen el potencial de contribuir a esas resistencias (85, 86). La inhibición de BCL-2 reduce OXFOS y en el caso del LMA, donde éste se encuentra aumentado, se ha descrito que la inhibición del oncogén BCL-2 erradica de forma selectiva aquellas células madre de LMA resistentes a la quimioterapia (87)

Otra estrategia dirigida a la función mitocondrial, como es la biogénesis mitocondrial, ha mostrado también resultados prometedores. En concreto la tigeciclina, una gliciliciclina aprobada por la FDA para tratar infecciones microbianas ha mostrado en estudios recientes en tumores hematológicos y sólidos que induce la parada del ciclo celular, apoptosis, autofagia y estrés oxidativo (88). De hecho Skrtic y colaboradores en 2011 encontraron que era tóxica frente a células de leucemia *in vitro* e *in vivo* (89). Estudios posteriores han demostrado su capacidad de inhibir la fosforilación oxidativa, la proliferación celular, migración, invasión y angiogénesis. Además, su combinación con agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina, la vincristina, el paclitaxel, el

cisplatino y el imatinib han mostrado ser estrategias prometedoras para el tratamiento del cáncer (90) (Figura 10).

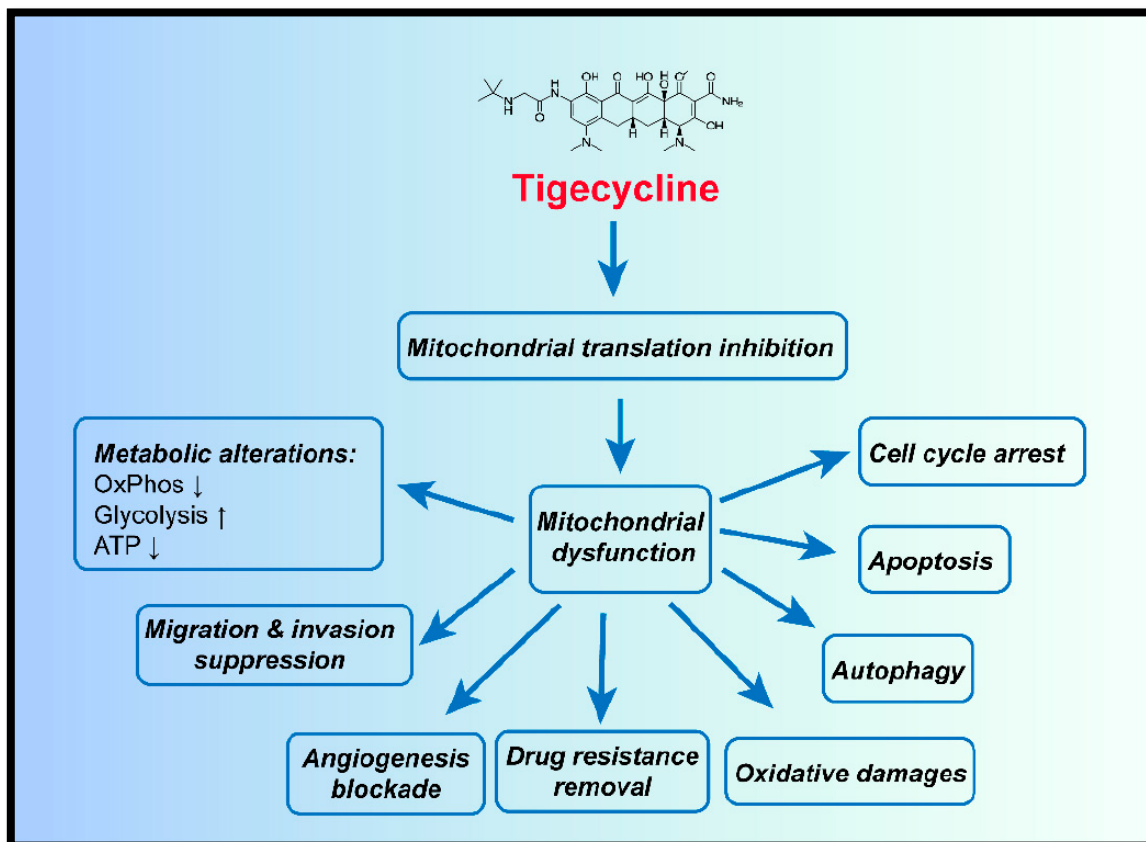


Figura 10. Hipótesis de fenotipos causales inducidos por el tratamiento de tigeciclina en células cancerígenas. Extraído de Dong 2019 (90).

2.2.3. Patogénesis del metabolismo en MM

En los últimos 20 años se han dedicado grandes esfuerzos en dilucidar los cambios metabólicos que se producen en el desarrollo y la proliferación maligna de las células plasmáticas. Si bien, todavía quedan numerosos mecanismos moleculares relacionados con el metabolismo sin comprender.

Es ampliamente conocido que las células plasmáticas juegan un papel clave en la inmunidad humoral. La inmunidad humoral está basada en una primera línea de acción en la que se forma la respuesta inmune primaria y con ella la secreción de células de vida corta (short-lived). Por otro lado se generan las de larga vida (long-lived) que van a producir anticuerpos con mayor afinidad para acabar migrando a médula ósea, desde

dónde producen protección de por vida debida a la secreción de anticuerpos (91). Se ha sugerido que el MM deriva de la transformación maligna de las células que están en la médula ósea contribuyendo de por vida a la memoria inmunológica. Entre ambos tipos celulares existen diferencias a nivel metabólico, siendo las de larga vida las que presentan un claro aumento en la obtención de glucosa y aminoácidos. Varios estudios confirman la dependencia de las células de MM en la glucólisis. Schibler y colaboradores demostraron que las células de MM muestran una homeostasis redox aberrante (92). De hecho se ha visto que la comprensión de las alteraciones metabólicas tiene importantes implicaciones en el cuidado de los pacientes con MM (93). Se conoce que la reprogramación metabólica es uno de los mecanismos en la patogénesis del MM, ya que los metabolitos interfieren con factores de transcripción involucrados en la regulación de la proliferación y la apoptosis (94). En concreto se han reportado en el MM alteraciones en la vía de la glucosa, de la glutamina, en el metabolismo de la serina, en la ruta de las pentosas fosfato y en el ciclo del folato (95) (Figura 11).

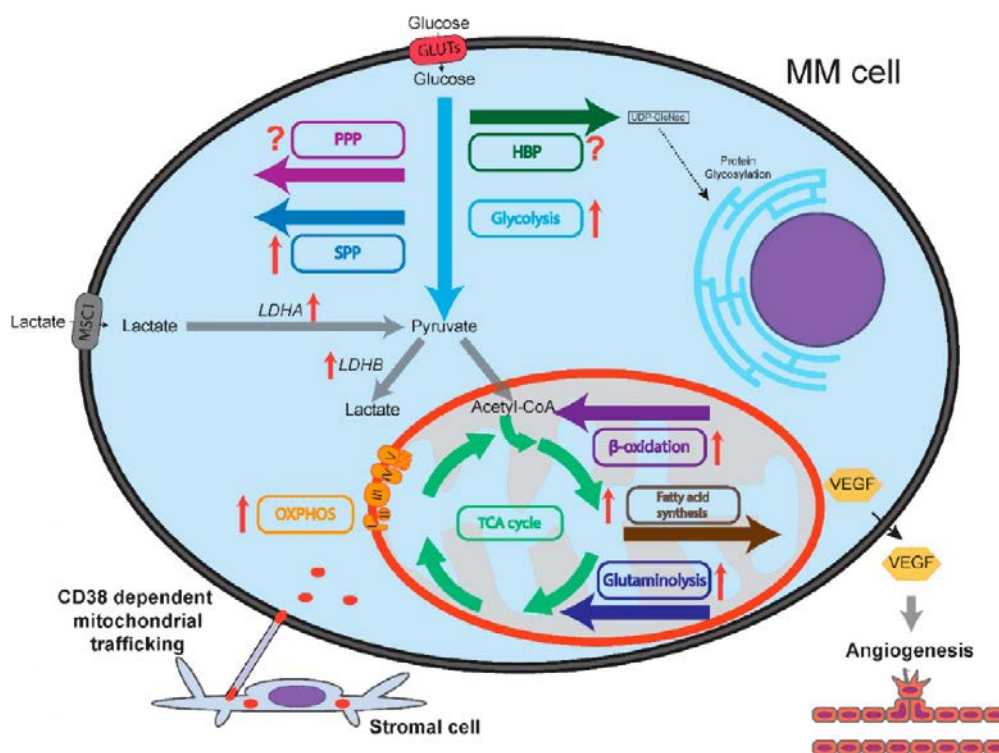


Figura 11. Representación esquemática del metabolismo celular del MM en comparación con una célula plasmática sana. El flujo de metabolitos se representa con las flechas de color. Glicólisis, OXFOS, vía de la síntesis de la serina (en inglés, serine synthesis pathway, SSP), glutaminólisis, síntesis de ácidos grasos y oxidación de ácidos grasos (β-oxidación) se encuentran sobrerreguladas en células de MM comparado con células plasmáticas normales,

tal y como se indica con flechas rojas. Lactato deshidrogenasa A (LDHA) y B (LDHB) están sobrerreguladas en células de MM. No está claro si la vía de las pentosas fosfato (en inglés, pentose phosphate pathway, PPP) y la vía de la síntesis de la hexosamina (en inglés, hexosamine synthesis pathway, HSP) están sobre/infrareguladas en las células de MM comparado con células plasmáticas normales, como se indica con signos de interrogación. Las células de MM expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (en inglés, vascular endothelial growth factor, VEGF) que incrementa la oxigenación de MO induciendo la angiogénesis. El aumento de oxigenación de MO puede estimular OXFOS en las células de MM. Los nanotubos dependientes de CD38 transportan mitocondrias de las células estromales a las células de MM. Extraído de Bloedjes 2021(91).

A pesar de que se reconoce que el MM presenta una gran dependencia de la glucólisis, recientemente se ha reportado que también se sustenta por un aumento de OXFOS. Incluso se ha observado que la sobreexpresión de varios genes implicados en OXFOS se asocia con un mal pronóstico (96). Un claro ejemplo de la dependencia de OXFOS es la alta sensibilidad por el inhibidor de la glucólisis, dicloroacetato (97). Además, se conoce que la enzima hexoquinasa II (HKII) se encuentra altamente expresada en pacientes con MM, aumentando su expresión según progresa la enfermedad, lo que deriva en un mal pronóstico (98). En cuanto al lactato, es un producto final de la glicólisis que es reintroducido para el funcionamiento de OXFOS (99). Además, la enzima LDHA, que convierte lactato en piruvato se encuentra elevada en pacientes con MM (100). Al igual que en otros cánceres, el ADNmt es un factor esencial en la tumorigénesis del MM, lo que refleja los cambios en el microambiente así como los requerimientos de ATP por la célula derivados del aumento de OXFOS (101).

Es conocido que el MM tiene una alta dependencia en el microambiente de la médula ósea ya que presenta un papel clave promoviendo la proliferación tumoral, la supervivencia y la migración de las células cancerígenas. De hecho, se ha demostrado la transferencia de orgánulos como la mitocondria de las células estromales y endoteliales a las células de MM, permitiendo la restauración de la función respiratoria y modulando la resistencia a fármacos (83, 102, 103).

En algunos pacientes de MM se ha observado un aumento de la biogénesis mitocondrial a través del perfil MitoBio, que representa vías de señalización mitocondrial entre las que se engloban el lumen mitocondrial, la organización y biogénesis, las membranas interna y externa mitocondriales, la cadena respiratoria y OXFOS, entre otros. De forma que el aumento de esta “firma” molecular está relacionado con recaídas tempranas de la enfermedad, así como con muertes prematuras (104). Además, y al igual

que en otros cánceres como se ha descrito previamente, se ha relacionado que la alteración del metabolismo celular reduce el efecto terapéutico de los fármacos usados de manera cotidiana como son bortezomib y melfalán, debido al desarrollo de resistencias (94).

En los casos de resistencia a inhibidores del proteasoma, al tener aumentados los niveles de ATP en relación con el aumento de actividad del ciclo de Krebs y por tanto la promoción de OXFOS, se ha sugerido que pueden ser particularmente sensibles a fármacos dirigidos a la función mitocondrial o actividad metabólica (105, 106).

Además de los fármacos usados de manera cotidiana, aquellos dirigidos al alterado metabolismo de la glucosa como el inhibidor de GLUT4, ritonavir, han mostrado cómo las células de MM sobreviven a la privación de glucosa, pudiendo deberse a la participación de OXFOS. Es por ello que se ha probado de forma efectiva la estrategia de combinación con un inhibidor de OXFOS como metformina para así evitar la aparición de resistencia (107).

2.2.4. MYC: Marcador biológico en MM

El oncogén MYC se encuentra en numerosos cánceres humanos y contribuye al crecimiento tumoral, la proliferación, replicación de ADN, transcripción, biosíntesis proteica y metabolismo alterado, escapando de los mecanismos antitumorales como son apoptosis, parada del ciclo celular y senescencia. La proteína MYC está sobrerregulada a nivel transcripcional en MM, más concretamente en las últimas etapas de la progresión del MM correlacionándose con una pobre supervivencia (94). Por tanto, la desregulación del gen MYC está relacionada con la patogénesis del MM. En concreto, MYC (oncogén homólogo v-myc de la mielocitomatosis viral) es un oncogén con varias funciones importantes a nivel celular y nuclear, y cuya activación regula numerosos genes involucrados en la transcripción y en la traducción mitocondrial, en la importación de proteínas y en el ensamblaje de los complejos mitocondriales (100, 108).

MYC se ha descrito como un proto-oncogén implicado en numerosos cánceres, incluyendo leucemias y linfomas (87, 109, 110). En MM se conoce su expresión aberrante debido a recurrentes alteraciones cromosómicas (91) y estudios previos han demostrado cómo su expresión está involucrada en la progresión del MM desde los primeros estadios

de discrasias de células plasmáticas, incluyendo GMSI y SM al desarrollo del MM (111). Numerosos autores han reportado que la falta de regulación de MYC está relacionada con una reducida supervivencia libre de progresión en MM (112). Además, se ha descrito que la transcripción directa de MYC promueve cambios en las dinámicas mitocondriales que influyen en la resistencia a fármacos (113).

Como se ha referido anteriormente, la sobreexpresión de MYC presenta unos efectos exagerados en la biogénesis mitocondrial, en el metabolismo oxidativo, así como en la sensibilidad a inhibidores de OXFOS (114). Además, se conoce que MYC estimula la biogénesis mitocondrial en pacientes con MM en comparación con células plasmáticas sanas (104). Por ello, el control de la expresión de MYC se ha propuesto como un logro significativo en la lucha contra el MM (111).

Sin embargo, a nivel farmacológico MYC no es una molécula que pueda ser susceptible de tratamientos. En este contexto, se ha propuesto que las interacciones sintéticas letales puedan ser exploradas como una alternativa a la que dirigir los tratamientos de MYC. El principio de letalidad sintética se basa en la propia letalidad resultante de la interacción simultánea de factores que no serían letales en forma aislada, por ejemplo basadas en relaciones directas de unas moléculas con otras que de normal son beneficiosas pero si se produce algún cambio en esta interacción puede resultar letal.

En base a esta estrategia, Hsieh y colaboradores proponen que la privación de nutrientes puede llevar a la muerte celular, pues las células que sobreexpresan MYC son adictas a la glucosa y a la glutamina (115). Estudios previos han descrito la dependencia de las células de MM a la glutamina para su supervivencia y que a su vez influye en la expresión del propio MYC (93). Por tanto, MYC es un regulador maestro tanto de neoplasias b como del mieloma múltiple, así como de la biogénesis mitocondrial, y fuertemente implicado en la respuesta al tratamiento y pronóstico de la patología, lo que sugiere su potencial explotación terapéutica.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El mieloma múltiple es un tipo de cáncer hematológico actualmente incurable con una elevada incidencia y mortalidad ya que la mitad de los pacientes fallecen 5 años tras su diagnóstico. La incidencia global anual es de 5 habitantes por cada 100.000 y afecta fundamentalmente a personas mayores de 65 años. Es una enfermedad muy heterogénea por lo que a pesar de los recientes avances clínicos como el desarrollo de nuevas terapias el manejo de la enfermedad sigue suponiendo un desafío y la prevalencia continúa aumentando debido al envejecimiento de la población. En la última década la supervivencia se ha incrementado, sin embargo el paciente de mieloma acaba progresando y los pacientes recaen, en parte debido al desarrollo de resistencias a los fármacos empleados.

El metabolismo de las células de mieloma múltiple se encuentra alterado y contribuye a la transformación maligna. Hasta ahora, la implicación de la actividad mitocondrial en la patogénesis del mieloma múltiple no ha sido esclarecida. Esta dependencia en la mitocondria y su implicación en la reprogramación metabólica han sido puestas de manifiesto mediante estudios que las relacionan con la progresión maligna de la enfermedad y el desarrollo de resistencias a los tratamientos habituales. Estos argumentos sugieren que el mieloma es altamente dependiente de alteraciones del metabolismo, y la explotación terapéutica de los mismos, supone estrategias prometedoras en el desarrollo de nuevos tratamientos de la enfermedad.

Por otro lado, la participación de oncogenes asociados al cáncer como *MYC* también contribuye a la transformación maligna de las células. De hecho, *MYC* participa activamente en la regulación de vías metabólicas por lo que la alteración de esta molécula estaría jugando un papel significativo en la reprogramación metabólica del mieloma múltiple. Concretamente, *MYC* está involucrado en la biogénesis mitocondrial, sin embargo, aún se desconocen las consecuencias de la implicación de la mitocondria en la enfermedad. Por todo ello es necesario llevar a cabo estudios que permitan esclarecer los mecanismos por los cuales el metabolismo mitocondrial podría estar implicado en el desarrollo y progresión del mieloma múltiple.

3.1. HIPÓTESIS

La hipótesis de partida de este estudio se basa en que las células plasmáticas sufren alteraciones de la actividad mitocondrial asociados a la progresión del mieloma múltiple, llegando incluso a estar implicados en el desarrollo de resistencias a los fármacos habituales. Por otro lado, la explotación terapéutica mediante inhibidores de la mitocondria, como tigeciclina, junto con las primeras líneas de tratamiento de la enfermedad, como bortezomib, supondrían una potencial nueva diana terapéutica frente a la patología del mieloma múltiple. Por lo tanto, el tratamiento con tigeciclina constituiría una buena opción terapéutica para evitar la proliferación maligna de las células plasmáticas y su posible resistencia a los fármacos habituales.

3.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterizar fenotípicamente la actividad mitocondrial en líneas celulares y en células primarias de pacientes de mieloma múltiple en distintos estadios de la enfermedad, y su implicación en la progresión de la misma.
2. Establecer un modelo celular y desarrollar un modelo murino de trabajo para representar la enfermedad del mieloma múltiple con alterada actividad mitocondrial.
3. Estudiar el impacto de la explotación terapéutica del metabolismo mitocondrial a través del inhibidor de su actividad, tigeciclina en un modelo celular *in vitro*, en células de pacientes *ex vivo* y en un modelo de ratón *in vivo*, en monoterapia y/o en combinación con bortezomib

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Líneas celulares

Para los ensayos de inhibición de fármacos, de interferencia, de inmunohistoquímica, de histoenzimática, western blot (WB), la tasa de consumo de oxígeno (seahorse) y de citometría se utilizaron las líneas celulares JJN3, L363, OPM2, U266, RPMI8226 y NCI-H929. Las líneas celulares OPM2, U266, RPMI8226 y NCI-H929 proceden de células de pacientes con Mieloma Múltiple (MM) y las líneas JJN3 y L363 proceden de células de pacientes con leucemia de células plasmáticas. Cuatro de ellas (JJN3, L363, OPM2 y U266) se obtuvieron del repositorio celular “German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH” (DSMZ, Braunschweig, Alemania), la línea RPMI-8226 fue amablemente cedida por Christopher Driessen (Kantonsspital, St. Gallen, Suiza) y la línea NCI-H929 por Joaquín Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, Madrid, España).

4.1.2. Plásmidos.

Para obtener el lentivector con el que conseguir la generación de las células JJN3-ffLuc-GFP y llevar a cabo estudios de bioluminiscencia en ratones vivos, se produjo la transfección de las células empaquetadoras 293T con los siguientes plásmidos comerciales (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Estados Unidos) (116):

- PRL-ffLuc-GFP (plásmido de transferencia)
- pMD.Lg/PRRE (plásmidos de expresión Gag y Pol)
- pRSV.REV (plásmidos de expresión REV)
- pMD2.VSV.g (plásmido de expresión VSV)

Para conseguir la bioluminiscencia se usaron dos proteínas bioluminiscentes, ffLuc o luciferasa de luciérnaga (en inglés firefly luciferase) y GFP o proteína fluorescente verde (en inglés Green fluorescent protein).

4.1.3. Sondas Taqman y oligonucleótidos.

Para la cuantificación de los niveles de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de *TUFM*, *TFAM*, *MYC*, *NRF1*, y *HNRNPK* mediante PCR cuantitativa se emplearon los siguientes ensayos Taqman, obtenidos de Applied Biosystems:

- Taqman Hs00607042_gH: para la cuantificación del ARNm de *TUFM* humano.
- Taqman Hs01073349_g1: para la cuantificación del ARNm de *TFAM* humano.
- Taqman Hs00153408_m1: para la cuantificación del ARNm de *MYC* humano.
- Taqman Hs00602161_m1: para la cuantificación del ARNm de *NRF1* humano.
- Taqman Hs03989611_gH: para la cuantificación del ARNm de *HNRNPK* humano.
- Taqman Hs00939627_m1: para la cuantificación del ARNm de β glucuronidasa (*GUSB*) humano, utilizado como control interno.

Para el estudio del número de copias mitocondriales (NC) los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron adquiridos en Thermo-fisher (Waltham, MA). En la tabla 5 se especifica el nombre y la secuencia en dirección 5' - 3'. Como referencia interna se usó el gen nuclear RNAsa P (Control Reagents, Applied Biosystems P/N 4316844).

Oligonucleótidos para la amplificación y detección del gen mitocondrial, 12S ribosomal	
Nombre	Secuencia
12S Forward (mtF805)	5' CCACGGGAAACAGCAGTGAT 3'
12s Reverse (mtR927)	5' CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA 3'
Sonda Taqman 12S ribosomal	6FAM 5' TGCCAGCCACCGCG 3' MGB

Tabla 5.- Descripción de los oligonucleótidos (n=3) utilizados para el estudio del número de copias mitocondriales.

Para la cuantificación del número de copias virales producidas en la transfección los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (tabla 6) fueron sintetizados por el Grupo Taper (Alcobendas, España).

Oligonucleótidos para la amplificación y detección del gen de la albúmina y la secuencia de la señal de empaquetamiento	
Nombre	Secuencia
Albúmina Humana Forward (Alb.F)	5' GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT3'
Albúmina Humana Reverse (Alb.R)	5' ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC 3'
Psi forward (Psi.F):	5' CAGGACTCGGCTTGCTGAAG 3'
Psi reverse (Psi.R)	5' TCCCCGCTTAATACTGACG 3'

Tabla 6.- Descripción de los oligonucleótidos (n=4) utilizados para la titulación de partículas virales generadas en la transfección.

4.1.4. Anticuerpos.

Los diferentes anticuerpos frente a antígenos humanos utilizados en este estudio están recogidos en las tablas 7, 8, 9 y 10.

Anticuerpos primarios usados para WB			
Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-OXPPOS	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam, ab110411
Anti- HnRNP K	Monoclonal de ratón	1:1000	SantaCruz; D6, sc-28380
Anti-c-Myc	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam, AB32072
Anti-βactina	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling, #4967

Tabla 7.- Descripción de los anticuerpos primarios usados para estudios de Western Blot (n=5).

Anticuerpos secundarios usados para WB			
Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-IgG ratón HRP	Policlonal de cabra	1:10000	Dako, P0447
Anti-IgG conejo HRP	Policlonal de cabra	1:2000	Dako, P0448

Tabla 8.- Descripción de los anticuerpos secundarios usados para estudios de Western Blot (n=2).

Anticuerpo usado para inmunohistoquímica			
Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
Anti-mitocondria [MTCO2]	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam, ab3298

Tabla 9.- Descripción del anticuerpo usado para ensayos de inmunohistoquímica (n=1).

Anticuerpos usados para citometría			
Nombre	Origen	Dilución	Procedencia
CD38-FITC	Monoclonal de ratón	1:100	BD, #340909
CD38-PE	Monoclonal de ratón	1:100	Immunostep; D6, 38PE1-100T
PD-L1-PE	Monoclonal de ratón	1:100	BD, #557924
MICA/B-PE	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, # 320906
ULBP 1- PE	Monoclonal de ratón	1:100	R&D, #FAB1380P
ULBP 2/5/6- PE	Monoclonal de ratón	1:100	R&D, #FAB1298P
ULBP 3- PE	Monoclonal de ratón	1:100	R&D, #FAB1517P
CD155-PE	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, #337610
CD112-PE	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, #337410
CD138-PECy7	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, #352318
PD-L2-APC	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, #345508
FAS L-APC	Monoclonal de ratón	1:100	BD, #564262
TRAIL R1, DR4-APC	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, #307208
TRAIL R2, DR5-APC	Monoclonal de ratón	1:100	Biolegend, # 307408
HLA-E-APC	Monoclonal de ratón	1:100	eBiosciences, 17-9953-42
CD56-APC	Monoclonal de ratón	1:100	BD, #555518

Tabla 10.- Descripción de los anticuerpos usados para estudios de citometría (n=16).

4.1.5. Sondas moleculares.

Las sondas empleadas en el estudio se especifican en la tabla 11.

Sondas usadas para citometría			
Nombre	Diana	Concentración de trabajo	Procedencia
MitoTracker Green	Mitocondria	150 nM	Invitrogen, M7514
MitoTracker Red	Mitocondria	150 nM	Invitrogen, M22425

Tabla 11.- Descripción de las sondas moleculares usados para estudios de citometría (n=2).

4.1.6. Enzima citocromo c oxidasa.

Para llevar a cabo el estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa se empleó polvo liofilizado de la enzima para llevar a cabo la reacción histoenzimática (Bio-Optica, #30-30115LY, Milán, Italia).

4.1.7. Fármacos.

Para llevar a cabo este trabajo, a continuación (Tabla 12) se indican las dosis empleadas de cada fármaco y el estudio para el que fueron utilizadas.

Fármaco (procedencia)	Clase	Dilución	Dosis	Línea Celular (LC)	Estudios
Bortezomib (Selleckchem, #S1013)	Inhibidor del proteasoma (PI)	1/5	250 – 0.08 nM	JJN3 S y R, RPMI8226, L363 y NCI-H929	Ensayos dosis-respuesta
		NA	4, 6, 8, 9, 10, 11, 16 nM	JJN3 S	Generación resistentes
		1/5	10 – 2 nM ^{ab}	JJN3 S	Estudio sinergias
		NA	2 ^{cg}	JJN3 S	HE-COX, Citometría mitotracker red, WB y seahorse.

		1/5	10 – 0.4 nM ^d	JJN3 S y R	Ensayos sensibilización
Tigeciclina (Selleckchem, #S1403)	Antibiótico bacteriostático	1/3	100 – 1.2 μM	JJN3 S y R, RPMI8226, L363 y NCI-H929	Ensayos dosis-respuesta
		1/3	100 – 1.2 μM ^a	JJN3 S	Estudio sinergias
		NA	3.7 μM ^c	JJN3 S	HE-COX, Citometría mitotracker red y WB
		NA	3.7 μM ^c	RPMI8226	HE-COX, Citometría mitotracker red y WB
		NA	33 y 3.7 μM	RPMI8226	Citometría con efectoras (mitotracker red y CD38)
		NA	33 μM	JJN3 S y RPMI8226	Citometría ligados
		1/3	11 – 3.7 μM ^c	JJN3 S	Seahorse
		1/3	33 – 3.7 μM ^d	JJN3 S	Ensayos sensibilización
		Carfilzomib (Selleckchem, #S2853)	Inhibidor del proteasoma (PI)	1/2	50 – 0.3 nM
1/2	3.1 - 1.5 nM			JJN3 S	HE-COX
1/2	3.1 - 0.7 nM			JJN3 S	Citometría mitotracker red
Daratumumab (Excedentes hospital Darzalex, Janssen)	Anticuerpo monoclonal	1/2	100 – 1 μg/ml	RPMI8226	Ensayos dosis-respuesta
		1/2	50 – 25 μg/ml	RPMI8226	Citometría (mitotracker red y CD38) y WB

		NA	25 µg/ml	RPMI8226	HE-COX
JQ1 (Selleckchem, #S7110)	Inhibidor de bromodominio BRD4	1/2	5000 – 39 nM	JJN3 S y R	Ensayos dosis- respuesta
		1/2	5000 – 39 nM ^b	JJN3 S y R	Estudio sinergias
		1/2	156 - 39 nM ^e	JJN3 S y R	Ensayos sensibilización
		1/2	312 – 78 nM ^f	JJN3 S y R	Ensayos sensibilización
		NA	78 nM ^g	JJN3 S y R	HE-COX, WB y Citometría mitotracker red

Tabla 12 Descripción de las dosis estudiadas de cada fármaco, para que ensayos se utilizaron y en qué líneas celulares se estudió. JJN3 S, sensible a bortezomib; JJN3 R, resistente a bortezomib.

a, c Bortezomib y tigeciclina se han usado a las dosis indicadas tanto en monoterapia como en combinación.

b, g Bortezomib y JQ1 se han usado a las dosis indicadas tanto en monoterapia como en combinación.

d sensibilización 48h con tigeciclina y a continuación 48h bortezomib

e sensibilización 48h con bortezomib y a continuación 48h JQ1

f sensibilización 48h con tigeciclina y a continuación 48h JQ1

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtención y procesamiento de células primarias.

Se recogieron 110 muestras de pacientes en distintos estadios del MM (nuevos diagnósticos y recaídas) y en estadios pre-malignos (ver Anexo 1) y 3 muestras de donantes sanos acorde a la Declaración de Helsinki y con la aprobación del Comité ético del Hospital 12 de Octubre (Madrid, España) (CEIM 20/326). Además, los pacientes firmaron un consentimiento informado, previo a la extracción de la muestra, para ser cedidas para uso en investigación. Todas las muestras se obtuvieron por punción de médula ósea. Los cilindros y aspirados fueron procesados para su posterior análisis. En el caso de los cilindros, estos fueron fijados, decalcificados y posteriormente incluidos en parafina para proceder al corte de las secciones de 0,3 μm y su consiguiente tinción. Los aspirados fueron directamente procesados mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque, a 400 x g durante 30 minutos con una aceleración de 9 y una deceleración de 4 (17-1440-03, GE Healthcare Life Sciences, Suecia) para posteriormente purificar las células plasmáticas de forma manual mediante separación magnética con microbolas CD138+ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) según indicaciones del fabricante y así poder usar la muestra en fresco para citometría y el estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa mediante ensayo histoenzimático o congelarla para su ulterior extracción de DNA, RNA y proteínas.

4.2.2. Cultivo de líneas celulares, generación de resistentes y generación JJN3-ffLuc-GFP.

Todas las líneas empleadas fueron expandidas tras su recepción para su posterior congelación en nitrógeno líquido creando así una reserva para su uso. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C, bajo una atmósfera de 5 % de CO₂ y se pasaron cada 2-3 días. Además, se cultivaron en medio RPMI-1640 (BE12-167F Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (SH30080.02, Hyclone, South Logan, USA) y 1X penicilina/estreptomicina

(15140122, Gibco, Grand Island, NY). Además de las seis líneas, se generaron dos nuevas utilizando el fondo genético de la línea JJN3.

Por un lado, se generó la línea JJN3 resistente a bortezomib (JJN3 R), a partir de su línea parental. Se realizó un escalado progresivo de la dosis partiendo de una concentración inicial de 4 nM hasta una dosis final de 16 nM, tras confirmar que se mantenía la viabilidad con la dosis previa, durante un periodo de cuatro meses (ver Tabla 13). Por otro lado, para su futuro seguimiento en un modelo murino, las células JJN3 fueron transducidas con el lentivector pRLL-luc/GFP, con el fin de que las células expresen la luciferasa de luciérnaga y la GFP en una proteína de fusión dirigida por el promotor del citomegalovirus (CMV). Previamente, los vectores lentivirales obtenidos en la transfección se titularon mediante diluciones seriadas para analizar el número de copias del vector por PCR cuantitativa (qPCR) (ver apartado 4.1.3 de los oligonucleótidos utilizados). Una vez conocida la titulación viral se procedió con la transducción. Para ello se incubaron 1×10^6 células JJN3/ml con el lentivector en medio de cultivo RPMI más un 10% SFB. A continuación se sometieron a un ciclo de centrifugación a $1500 \times g$ durante 2 horas y se completó la incubación hasta las 24 horas posteriores. Finalmente, se recogieron las células y se analizó la eficacia de la transducción mediante expresión de GFP por citometría de flujo en un citómetro BD FACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Para conseguir el enriquecimiento en células ffLuc-GFP, estas se expandieron en cultivo y se procedió a su separación por expresión de GFP en un dispositivo separador de citometría de flujo FACS BD INFLUX (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

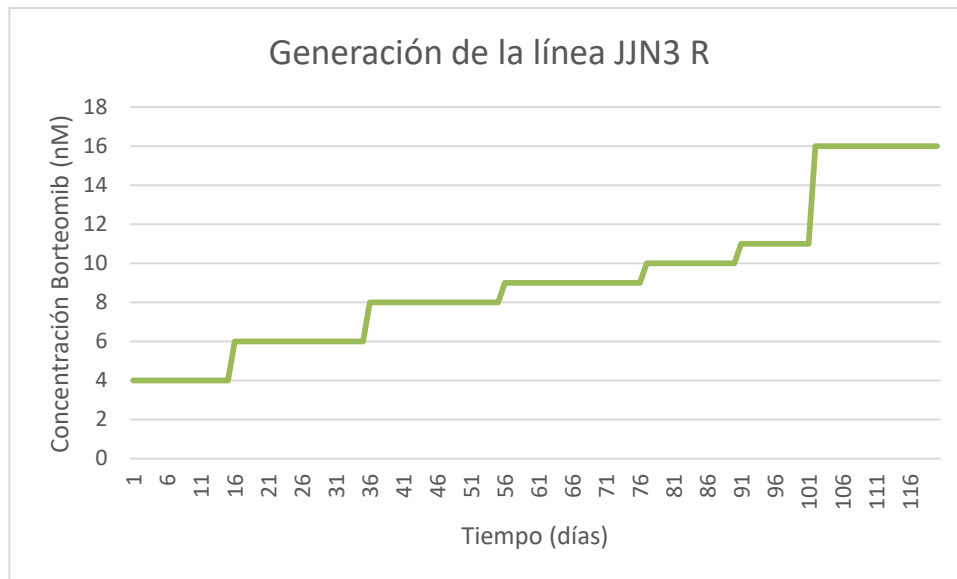


Tabla 13 Esquema de la generación de la línea celular JJN3 resistente a bortezomib (JJN3 R).

4.2.3. Análisis de la expresión de genes mitocondriales: repositorio COMMPASS y CanEvolve.

A través del repositorio virtual COMMPASS generado por la Multiple Myeloma Research Foundation Personalized Medicine Initiatives (<https://research.themmr.org> and www.themmr.org) se analizaron los datos de RNAseq (secuenciación de ARN) de un total de 770 muestras de pacientes con MM al diagnóstico para ver la expresión de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial, factor de elongación Tu de la traducción mitocondrial (*TUFM*), subunidad II de la enzima citocromo c oxidasa (*COXII*), *MYC*, ribonucleoproteína K nuclear heterogénea (*HNRNPK*) y factor respiratorio nuclear 1 (*NRF1*) y su posible relación con la supervivencia libre de progresión de los pacientes.

También se estudió la base de datos CanEvolve, en concreto el estudio GSE6477, para evaluar la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *HNRNPK* y *NRF1* en pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico, MM en recaída y donantes sanos. En esta misma página, en la base de datos de firmas moleculares de las vías de la cadena respiratoria mitocondrial, con 31 genes asociados y de la actividad de la citocromo c oxidasa, con 13 genes asociados, se analizó la expresión diferencial de los genes implicados en estas vías.

4.2.4. Extracción de ADN y ARN.

El ADN y ARN de las células purificadas CD138+ fue extraído mediante el kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (80204, Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de los ADN y ARNs obtenidos se evaluó por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA). La concentración se calculó teniendo en cuenta el valor de absorbancia a una longitud de onda de 260nm y su pureza se obtuvo de la relación de absorbancias A260/280, debiendo presentar un valor alrededor de 2, indicativo de óptima pureza.

4.2.5. PCR a tiempo real (RT-PCR), PCR de transcripción reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Las muestras de ADN total, previamente cuantificadas espectrofotométricamente, se emplearon para el estudio del número de copias mitocondriales. Para la amplificación del ADNmt se usaron la sonda TaqMan ribosomal 12S y los oligonucleótidos 12S forward mtF805-New y 12S reverse mtR927, ver en apartado 4.1.3. Para la amplificación del ADNn se empleó el kit comercial TaqMan RNaseP Control Reaction Kit (4316844, Applied Biosystems™), ver en apartado 4.1.3. Además, se empleó la master mix FG TaqMan Universal PCR Master Mix (4305719, Applied Biosystems). Finalmente, se realizó una curva patrón construida a partir de dos plásmidos, uno con un inserto mitocondrial (122 pb, nt805-nt927) y otra con un inserto nuclear (87 pb de la RNAsa P). Para su clonaje se usó el kit TOPO® TA Cloning® Kit (450030, Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad de los insertos se confirmó mediante secuenciación directa. A partir de los clones seleccionados, previa amplificación, se extrajo su ADN y se cuantificó. Estos fragmentos de ADN se emplearon como calibrador, permitiendo el cálculo del NC de ADNmt y ADNn dividiendo su concentración entre el peso molecular de cada molécula del plásmido. A partir de la mezcla de estos plásmidos (calibrador, N) se generó una curva de calibración con 7 puntos (tabla 14).

Calibrador	μL de calibrador (N)	μL de HCl 10mM pH 8.5	12S (ADNmt)	RNAsaP (ADNn)
N	30 μL N	-	90×10^6	900000
N 1/3	10 μL N	20	30×10^6	300000
N 1/9	10 μL N/3	20	10×10^6	100000
N 1/27	10 μL N/9	20	3333333	33333
N 1/81	10 μL N/27	20	1111111	11111
N 1/243	10 μL N/81	20	370370	3704
N 1/486	10 μL N/243	20	185185	1852

Tabla 14 Condiciones de preparación de la curva de calibración para la estimación del número de copias de ADNmt.

La RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador (Roche Life Science) siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla 15. La relación de copias 12S/RNAsaP se calculó analizando la cantidad relativa de ADNmt respecto el gen de referencia a partir de sus respectivos Cts (ADNmt/ADNn).

Reactivos	Volumen (μL)
Master Mix 2X	10
Primer 12S F 5 μM	0.5
Primer 12S R 5 μM	0.5
Sonda 12S 5 μM	0.5
Kit RNAsaP 20X	1
Agua	2.5
Muestra ADN	5

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	1	2 min	50 °C
1	2	10 min	95 °C
45	3	15 s	95 °C
	4	60 s	60 °C

Tabla 15 Mezcla de reacción para la cuantificación del número de copias de ADNmt (izquierda). Programa del termociclador para llevar a cabo la RT-PCR (derecha).

La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription factor (4368814, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante, condiciones detalladas en la Tabla 16.

Reactivos	Volumen/Reacción (20 µl finales)
10x RT buffer	2
25x dNTP Mix (100mM)	0.8
10x RT random primers	2
Multiscrib reverse transcriptase	1
Rnase Inhibitor	1
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Muestra ARN	10

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	25	10 min
2	37	120 min
3	85	5 min
4	4	∞

Tabla 16 Izquierda, mezcla de reacción para la generación de ADNc. Derecha, condiciones de la retrotranscripción.

El ADNc obtenido fue empleado directamente en una PCR cuantitativa. La cuantificación de los niveles de expresión de los genes *TUFM*, *TFAM*, *MYC*, *NRF1*, *HNRNPK* se realizó usando sondas Taqman específicas para cada uno de ellos y el gen β -glucuronidasa se usó como control endógeno, ver apartado 4.1.3. Todos los ensayos de PCR cuantitativa, cuyas condiciones se detallan en las tablas 17, se realizaron por triplicado con el equipo 7500HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se analizaron usando el programa SDS 2.2.

Reactivos	Volumen para una reacción (10 µl finales)
20X TaqMan Gene Expression Assay	0.5
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	5
Muestra ADNc	2
Agua libre RNAsa	2.5

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
40	1	2 min	50 °C
	2	10 min	95 °C
	3	15 s	95 °C
	4	1 min	60 °C

Tabla 17 Arriba, mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión de ARN mensajero. Abajo las condiciones de la qRT-PCR.

4.2.6. Extracción de proteínas.

Para la obtención de los extractos totales de proteínas, las células empleadas se recogieron tras los experimentos de viabilidad con los fármacos descritos en la Tabla 12 y fueron lavadas con PBS 1x (BE17-516F, Lonza). A continuación, se resuspendieron 1x10⁶ células en 200 µl de buffer RIPA (Tris HCl 50mM pH 8, NaCl 150 mM, tritón 1%, deoxicolato 0,5%, SDS 0,1%, inhibidores de proteasas, inhibidores de fosfatasa, DNAsa 1 100U/ml, agua destilada). Durante media hora en frío fueron agitadas en vórtex cada 5 minutos para lograr una mejor lisis. Posteriormente se centrifugaron a 14.000xg durante 5 minutos a 4 °C para separar los restos celulares del sobrenadante con las proteínas. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método Bradford (5000006, BioRad, Hercules, CA, USA).

4.2.7. Separación de proteínas por electroforesis (Western Blot).

Los extractos de proteína de las muestras (46,7 µg de proteína total por condición estudiada) se separaron mediante electroforesis unidimensional de geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% en un equipo Mini-PROTEAN (1658030, BioRad). El voltaje para la electroforesis se mantuvo a 100 V durante aproximadamente 2 horas o hasta que las bandas de las proteínas más pequeñas (10kDa) alcanzaran el frente. A continuación, se procedió a su transferencia a membranas de difluoruro de polivinilo

PVDF (1620177, Bio-Rad), previamente activadas con metanol durante dos minutos. Las condiciones impuestas para la transferencia fueron 400mA constantes durante 1 hora y 30 minutos a 4 °C. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo TBS 1X (Tris Buffer Salino), 0,1% Tween 20, 3% BSA y agitación suave. Posteriormente, se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente en solución de incubación (TBS 1X, 0,1% Tween 20, 0,3% BSA) bajo las condiciones establecidas para cada anticuerpo (detalladas en el apartado 4.1.6). Las membranas se lavaron cinco veces durante 30 minutos con la solución de incubación y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente en solución de incubación. A continuación, se realizaron cinco lavados de las membranas durante media hora con TBS 1X, 0,1% Tween 20. Para el revelado se procedió a la detección quimioluminiscente de las bandas con el kit Clarity Western ECL substrate; (1705061, Bio-Rad). Las densitometrías se llevaron a cabo con el Software Image Lab versión 5.2.1. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA) normalizando, para cada muestra, determinando la ratio de la señal obtenida para cada proteína estudiada frente a la señal correspondiente de la β actina. Finalmente, todas las muestras se expresaron como valor relativo frente a la condición control.

4.2.8. Determinación de los niveles de COXII por Inmunohistoquímica.

Las secciones obtenidas al cortar el bloque de parafina con la muestra del cilindro fueron desparafinadas con xilol, rehidratadas con concentraciones decrecientes de alcohol y teñidas con el anticuerpo COXII bajo las condiciones establecidas en el apartado 4.1.6. Se realizó una contra-tinción con hematoxilina de Carazzi (255298.1610, PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania) y se montaron con DPX (06522, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Las imágenes se clasificaron en una escala de intensidad de 0 a 3, siendo 3 la mayor intensidad de tinción. Todas las muestras se evaluaron bajo condición de doble ciego. Para su visualización se empleó el microscopio óptico Olympus AX70 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japón) y para la captura de las imágenes se usó el software Olympus CellSens Imaging versión 1.16 (Olympus).

4.2.9. Medición de la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria (citocromo c oxidasa): histoenzimática de COX (HE-COX).

Las muestras frescas purificadas CD138+ o las células de LC recogidas tras los experimentos de viabilidad con fármacos descritos en la Tabla 12, se centrifugaron en un citospin ($700 \times g$, 5 min., Shandon Single Cyto Slides™; ThermoFisher) para quedar adheridas al portaobjetos. Para determinar la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa mediante inmunocitoquímica se adaptó el protocolo del fabricante (puesto a punto en células musculares (117)) a las muestras de médula ósea. Para ello, se requirió la hidratación del polvo liofilizado (reactivo A) con una solución de restauración (reactivo B) provistas en el kit, agitándose hasta su completa disolución, según indicaciones del fabricante. Una vez rehidratada la tinción se procedió a incubar las muestras a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos. Se prosiguió con un lavado de 5 minutos y fueron teñidas con hematoxilina (Panreac) durante 2 minutos. Se lavaron de nuevo durante 5 minutos y se procedió a su deshidratación mediante inmersión en concentraciones crecientes de alcohol, xilol y su posterior secado para ser montadas con DPX. Para su estudio se empleó el mismo microscopio óptico Olympus AX70 bajo condiciones de doble ciego y para la captura de las imágenes se usó el software Cellsens. La cuantificación se realizó en base a una clasificación por la intensidad de tinción en una escala de 0 a 4, siendo 4 la mayor intensidad de tinción registrada en la muestra.

4.2.10. Citometría de flujo.

Las muestras procedentes de los aspirados medulares y las condiciones de las líneas celulares recogidas tras los experimentos de viabilidad con fármacos descritos en la Tabla 12 fueron analizadas por citometría de flujo. Se llevaron a cabo cuatro tipos de estudios. 1) Caracterización de la expresión de CD38. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con CD38-PE (ficoeritrina). 2) Estudio de las variaciones poblacionales en el porcentaje total de células plasmáticas CD38+/CD138+ tras 48 horas de tratamiento con las distintas condiciones bajo estudio (control, bortezomib 2 nM, tigeclina 3.7 μ M y la combinación de bortezomib y tigeclina). Las

células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con CD38-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y CD138-PECy7 (ficoeritrina-cianina). 3) Evaluación del contenido mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial con las sondas MitoTracker Green y Red (ThermoFisher) respectivamente. Tanto las líneas celulares como las muestras de pacientes se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con 150 nM de MitoTracker Green o con 150 nM de MitoTracker Red. 4) Análisis de la expresión de doce ligandos en 5 grupos según su relación, siendo un grupo formado por cuatro de los ligandos del receptor activador NKG2D (MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3), otro formado por tres de los ligandos de apoptosis (FAS, TRAIL-DR4, TRAIL-DR5), otro formado por dos de los ligandos virales (CD155, CD112), otro formado por dos de los ligandos de muerte programada (PD-L1 y PD-L2) y un último grupo con HLA-E (ligando del receptor inhibitor NKG2A). Las células se incubaron en PBS con 3% de SFB y 3 mM EDTA durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Seguidamente se centrifugaron y se resuspendieron en PBS, para poder ser analizadas por el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). La recogida de datos se hizo a través del programa FACS Diva en el que se registraron 1×10^6 de eventos por condición. En todos los estudios, para la detección de la apoptosis, las células fueron teñidas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Los resultados se analizaron con el programa FlowJo10 versión 10 (FlowJo LLC, Ashland, USA).

4.2.11. Medición de la tasa de consumo de oxígeno mediante Seahorse.

Para medir la tasa de consumo de oxígeno se empleó un analizador de flujo Seahorse XF96 con el Kit Mito Stress Test (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Como describe Abdul-Aziz, A. M. et al (118). Se dispusieron en una placa P96, 30.000 células por pocillo en 30 μ l de medio de cultivo y se dejaron los pocillos de las esquinas como control blanco (solo con medio). Previo al experimento se reemplazó el medio por 175 μ l de medio específico para ensayo Seahorse (10 mM, 400 μ l glutamina, 400 μ l piruvato, 160 μ l glucosa) incubándose durante una hora a 37°C sin CO₂. A continuación, se incubó con los siguientes inhibidores a las siguientes concentraciones: 1 μ M oligomicina, 0.5 and 0.75 μ M Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y 1 μ M rotenona y antimicina A. Se estableció un patrón de lecturas cada 8 minutos

durante 2 horas. Tras los tres primeros puntos temporales se inyectaron los siguientes fármacos: 0.05% dimetilsulfóxido (DMSO) como control, 2 nM bortezomib, 3.7 μ M tigeciclina, 11 μ M tigeciclina, 2 nM bortezomib + 3.7 μ M tigeciclina, y 2 nM bortezomib + 3.7 μ M tigeciclina, ver tabla 12. Para su representación se calculó la ratio de las tasas de consumo de oxígeno de las medidas de cada punto temporal normalizándolo respecto al del control.

4.2.12. Ensayos citotoxicidad (dosis-respuesta).

Para la realización de las curvas de dosis respuesta a la acción de los fármacos, tigeciclina, bortezomib, carfilzomib, JQ1 y daratumumab; o de sus combinaciones (Tabla 12) se procedió a sembrar 50.000 células por pocillo en placas p96 con las diluciones pertinentes de cada fármaco. Tras 48 h de incubación, las células fueron centrifugadas e incubadas con calceína AM (56496, Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 μ M en medio RPMI8226 sin suplementar durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación, se centrifugaron a 400 x g y se resuspendieron en 100 μ l de medio sin suero para su lectura en el lector de placas EnSpire Multimode Reader (PerkinElmer, Waltham, MA). Los datos de absorbancia fueron recogidos a una longitud de onda de excitación de 496 nm y de emisión de 516 nm. El análisis de los resultados se llevó a cabo acorde a la siguiente fórmula, siendo “x” el valor de la absorbancia en cada punto, “medio” el valor obtenido de los pocillos que sólo contenían medio y DMSO el valor de los pocillos con las células sin tratar:

$$\frac{x - \text{medio}}{\text{DMSO} - \text{medio}} * 100 = \% \text{ de supervivencia}$$

También se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad con daratumumab en presencia de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Estos experimentos se realizaron en 4 horas.

Otro conjunto de experimentos para analizar la citotoxicidad, fueron los estudios de sensibilización a fármacos. En estos ensayos las células se incubaron con bortezomib o tigeciclina durante 48h y, a continuación, se incubaron con un segundo fármaco

(bortezomib o JQ1) por otras 48h. Las condiciones de los diferentes ensayos están recogidas en la tabla 12.

4.2.13. Estudio de las sinergias entre fármacos.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de los fármacos en combinación (ver tabla 12) fueron sometidos a un análisis de sinergia para comprobar su potencial sinérgico o antagónico. Para ello, los datos fueron incluidos en el programa CompuSyn (ComboSyn Inc., Biosoft; Cambridge, UK). Los valores obtenidos representan el llamado “índice de combinación” (CI, combinatory index) que define los efectos de sinergia, adición y antagonismo como <1.0 , 1.0 y >1.0 , respectivamente, acorde al teorema de Chou-Talalay (119). A nivel gráfico, se representa el efecto (100% - % supervivencia) de cada dosis estudiada de cada fármaco, siendo en el eje de ordenadas los datos correspondientes al fármaco A y en el de abscisas los datos del fármaco B. Los puntos en cada eje que se corresponden con la dosis isoelectiva se unen por una recta que representa la línea de adición o de no interacción. De esta forma, los puntos, resultantes de las combinaciones de los fármacos, que queden representados por debajo de la línea de aditividad tendrán un índice de combinación < 1 , indicando la sinergia de la combinación.

4.2.14. Generación de un modelo animal de MM humano.

Los animales usados en este trabajo se estabularon en el Animalario del CNIO con código de registro ES28O790OOO1B6. El estudio fue supervisado y evaluado por un Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal, así como por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación y se realizó acorde al protocolo aprobado PROEX 023/17. Todos los medios materiales y de diagnóstico (como el sistema IVIS, del inglés *in vivo imaging system*) utilizados son de uso exclusivo en animales de experimentación y se encuentran dentro de las instalaciones del CNIO.

4.2.14.1. Ratones NSG

Para la generación del modelo animal se utilizaron 40 ratones hembras NOD Scid gamma (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) de entre 6 y 8 semanas de edad. Se mantuvieron en cubetas con 5 animales, en racks ventilados bajo un ambiente controlado libre de patógenos, a una temperatura constante y con ciclos de 12h de luz 12h de oscuridad. Se les administró comida y bebida *ad libitum*. Estos ratones son completamente inmunodeficientes debido a las dos mutaciones que llevan, la inmunodeficiencia severa combinada (scid) y la falta de alelos para el receptor de IL2 (IL2rgnull). Antes de proceder con el experimento se pesaron, se marcaron las orejas y se cogió una muestra de sangre, recogida en tubos con EDTA (Vacutainer, BD). Todos los materiales fueron desinfectados entre ratón y ratón.

4.2.14.2. Técnica de injerto del mieloma múltiple

Se generó un modelo de enfermedad sistémica por xenoinjerto a través de una inyección intravenosa vía vena caudal. Previamente, se llevó a cabo una prueba piloto con 3 animales para comprobar si el injerto del mieloma se producía correctamente sin necesidad de someter a los ratones a irradiación. Para la realización del injerto se dispuso a los animales bajo campana de seguridad biológica y se inmovilizaron en un cepo para proceder a la inoculación de 1×10^6 de células JJN3-ffLuc-GFP (resuspendidas en 100 μ l de PBS) o el mismo volumen de solución salina al 0.9%, como control, por la vena caudal de la cola. Se emplearon agujas hipodérmicas 25G (Braun). Seguidamente se ejerció presión en el punto de inoculación por unos segundos y se les fue devolviendo a su cubeta. Los animales fueron monitorizados una vez a la semana mediante control del peso, extracción de sangre y por imagen *in vivo* (medición de la bioluminiscencia).

4.2.14.3. Bioluminiscencia para el seguimiento del modelo animal

El sistema IVIS Imaging system 200 (Xenogen) se empleó para capturar imágenes de bioluminiscencia de los animales vivos. El equipo cuenta con una cámara oscura con un sistema integrado de anestesia para mantener a cinco animales en paralelo anestesiados para la captura de imágenes. Se administró por vía intraperitoneal (IP) una dosis de 150 mg/kg por ratón de D-Luciferina (88291, Thermofisher) y a continuación se sedaron con 2-3% isofluorano. Se dispusieron en la cámara para proceder a la captura de imágenes. Los animales se empezaron a monitorizar pasados 7 días del injerto, y posteriormente una vez a la semana para evaluar la distribución de las células. Para este procedimiento, siguiendo el fundamento de las 3Rs, en base a los principios de reducción, refinamiento y reemplazo, solo se emplearon 5 animales de cada grupo.

4.2.14.4. Esquema de tratamientos

Los animales fueron clasificados aleatoriamente en cuatro grupos de 10 animales cada uno para evaluar las condiciones de tratamiento aplicadas. De esta forma, a los 4 días de realizar el injerto, se comenzó con el tratamiento:

- Control: inoculación IP de vehículo, solución salina 0.9%, 5 días a la semana durante 4 semanas.
- Tratamiento 1: inoculación IP de bortezomib a 0.2 mg/kg, 5 días a la semana durante 4 semanas.
- Tratamiento 2: inoculación IP de tigeciclina a dosis crecientes empezando por 50 mg/kg 5 días a la semana durante las 2 primeras semanas, continuando por 75 mg/kg la tercera semana y por 100 mg/kg la cuarta semana.
- Tratamiento 3: inoculación IP de la combinación bortezomib y tigeciclina, siendo bortezomib a 0.2 mg/kg, 5 días a la semana durante 4 semanas, y tigeciclina a dosis crecientes empezando por 50 mg/kg 5 días a la semana durante las 2 primeras semanas, continuando por 75 mg/kg la tercera semana y por 100 mg/kg la cuarta semana.

4.2.15. Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó al menos por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) y SPSS v23.0 (IBM Corporation, New York, USA). Para contrastar la hipótesis de normalidad de la población abajo estudio se realizó el test Kolmogorov-Smirnof. Los datos con distribución normal se analizaron realizando un test t de Student para la comparación de dos grupos entre sí o ANOVA de una vía entre más de dos grupos. En el caso de datos no paramétricos, se usó el test Mann-Whitney o Kruskal-Wallis respectivamente. La supervivencia libre de progresión (SPF) se analizó mediante curvas Kaplan-Meyer. Los p valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos se representan como la media \pm EE (error estándar). Más detalles sobre los análisis estadísticos realizados vienen indicados en la leyenda de cada figura y en la sección de resultados.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA MITOCONDRIAL.

5.1.1. Estudio de genes y firmas moleculares relacionados con la mitocondria. Caracterización fenotípica mitocondrial.

Como primera aproximación a la caracterización fenotípica mitocondrial de las células plasmáticas de pacientes en distintos estadios del MM, procedimos a estudiar algunos de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial. Para ello, nos apoyamos en los resultados previos de Ruiz-Heredia et al., dónde se demostraba el aumento del número de copias de ADNmt según progresa la enfermedad (120). Para comprobar si ese aumento del ADNmt está acompañado del aumento de la expresión de genes relacionados con la mitocondria, se analizaron los datos publicados en dos repositorios digitales y los obtenidos de las muestras de pacientes del Hospital 12 de Octubre.

5.1.1.1. Análisis en repositorios digitales: COMMPASS y canEvolve:

Los resultados obtenidos tras el análisis de supervivencia en la base de datos COMMPASS reflejaron que las cohortes de pacientes establecidas con una elevada expresión de los genes *TUFM*, *COXII*, *MYC*, *NRF1* y *HNRNPK* presentaban diferencias significativas en cuanto a la supervivencia libre de progresión (SLP) respecto a la cohorte de pacientes estratificados como de “baja expresión” ($p < 0.05$) (Figura 12). La cohorte de pacientes con elevada expresión de *TUFM* presentó un hazard ratio (HR) de 1.3. En el caso de *COXII* el HR fue de 1.54; para *MYC* de 1.16; para *NRF1* de 1.23 y para *HNRNPK* de 1.29. Además, en el análisis realizado comparando las cohortes que presentaron una elevada expresión de los genes *TUFM*, *COXII*, *MYC*, *NRF1*, *HNRNPK* simultáneamente frente a aquellos que no la presentaron, reveló diferencias significativas en la SLP (Figura 12).

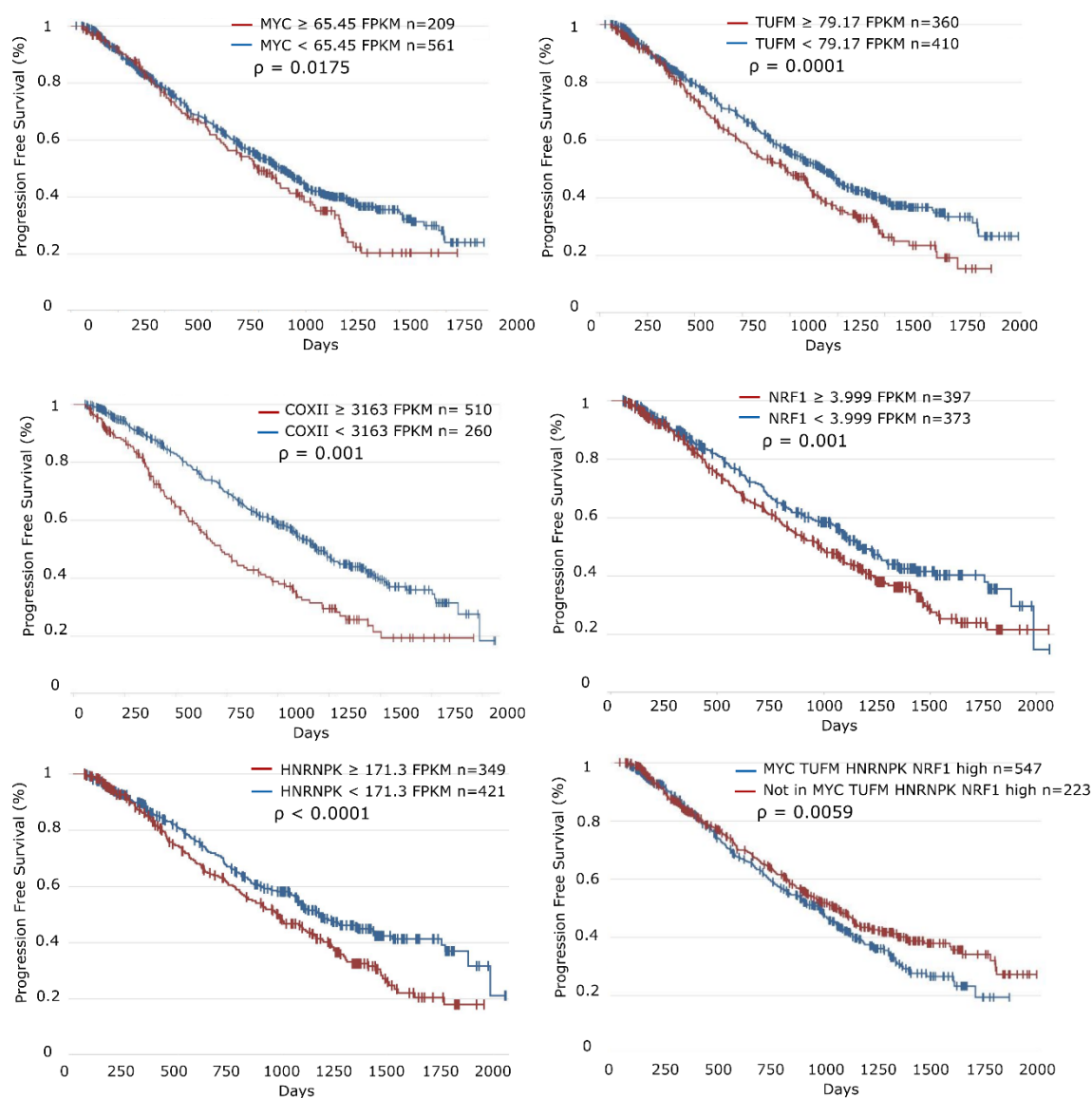


Figura 12.- Correlación de la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *COXII*, *NRF1* y *HNRNPK*, separados y/o agrupados, con la supervivencia libre de progresión en una cohorte de pacientes con MM al diagnóstico ($n=770$).

Esta información se complementó con análisis realizados a partir de datos depositados en el repositorio de “canEvolve”. Cuando se comparó la expresión génica de los pacientes con estadios pre-malignos del MM, es decir, con GMSI o SM frente a la de sujetos sanos, sólo se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *TFAM*, (Figura 13a-b). Sin embargo, al estudiar los pacientes diagnosticados de MM, tanto al diagnóstico como en la recaída, se observó que, en comparación con sujetos

sanos, los pacientes de MM presentaban un aumento en la expresión de los genes *TFAM*, *TUFM*, *MYC*, *HNRNPK* y *NRF1* (Figura 13c-d).

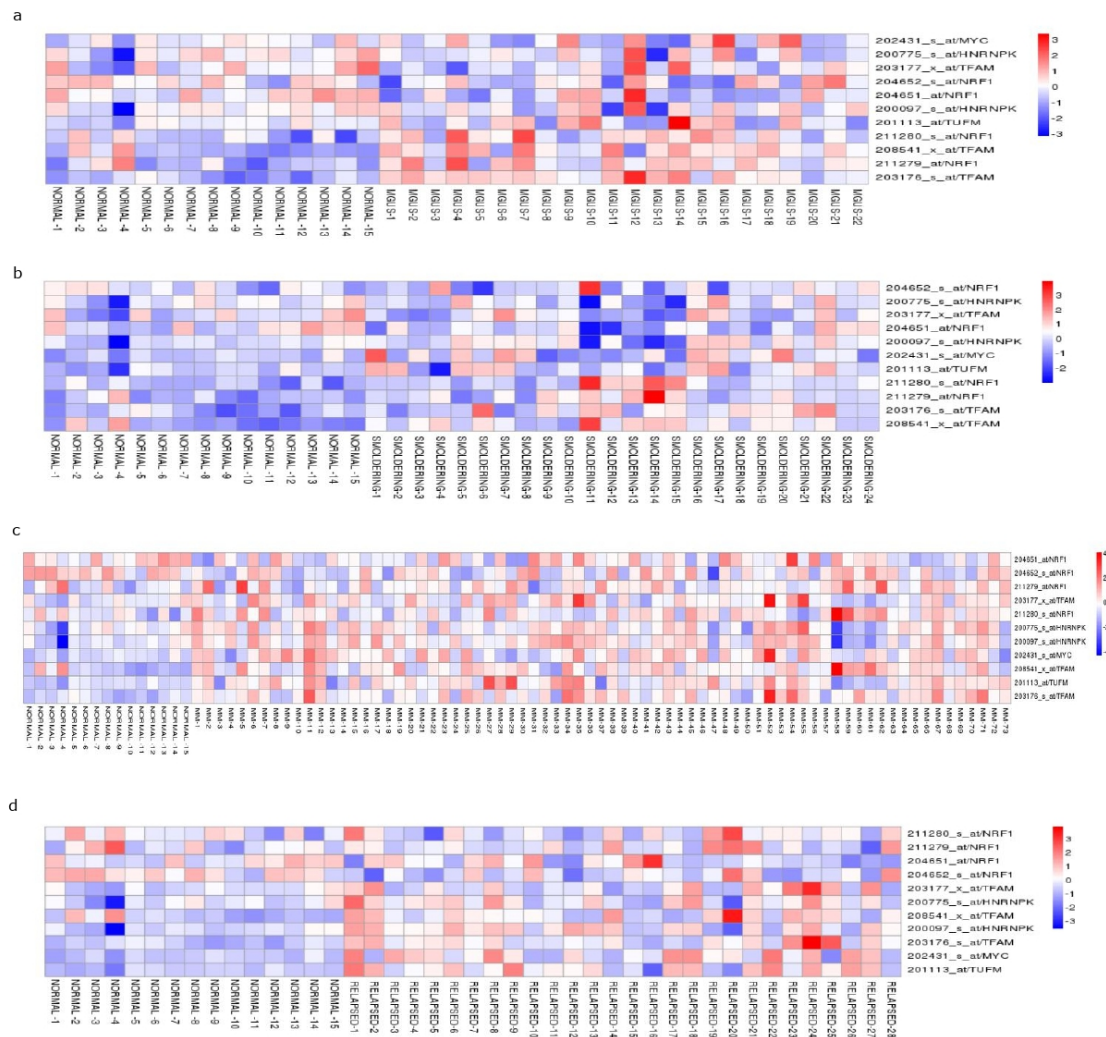


Figura 13.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPK* en cohortes de donantes sanos ($n=15$) y de pacientes con GMSI ($n=22$), SM ($n=24$), MM al diagnóstico ($n=73$) y MM en recaída ($n=28$) de la base de datos canEvolve. a) Normal (control) versus GMSI; b) normal versus smoldering; c) normal versus MM al diagnóstico; d) normal versus MM en recaída;

Con el fin de estudiar si estas alteraciones estaban debidas al progreso clínico de la enfermedad, se realizó una comparación entre los distintos estadios de MM. Al comparar las cohortes de los estadios pre-malignos GMSI y SM, no se detectaron diferencias en la expresión de ninguno de los genes estudiados (Figura 14a). Sin embargo, al comparar la expresión de los pacientes con MM al diagnóstico y en recaída con respecto

a pacientes con GMSI, se apreciaron diferencias en la expresión de los cinco genes bajo estudio (Figura 14b-c).

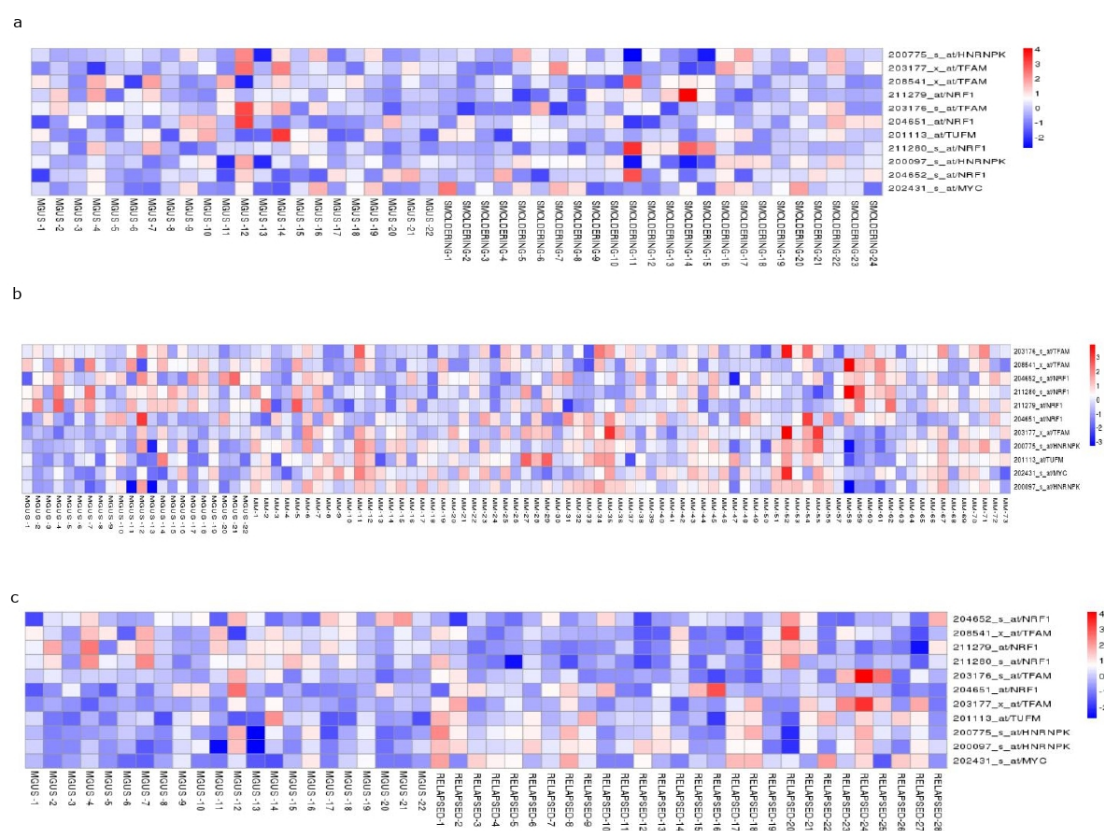


Figura 14.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPk* en cohortes de donantes sanos ($n=15$) y de pacientes con GMSI ($n=22$), SM ($n=24$), MM al diagnóstico ($n=73$) y MM en recaída ($n=28$) de la base de datos canEvolve. a) GMSI versus smoldering; b) GMSI versus MM al diagnóstico; c) GMSI versus MM en recaída

También se evaluó si esas diferencias existían al comparar los pacientes de MM al diagnóstico y en recaída con los pacientes con SM, y se verificó que los genes *TFAM*, *TUFM*, *MYC* y *HNRNPk* mostraban un aumento en los pacientes al diagnóstico y en recaída, mientras que el gen *NRF1* aparecía disminuido (Figura 15a-b).

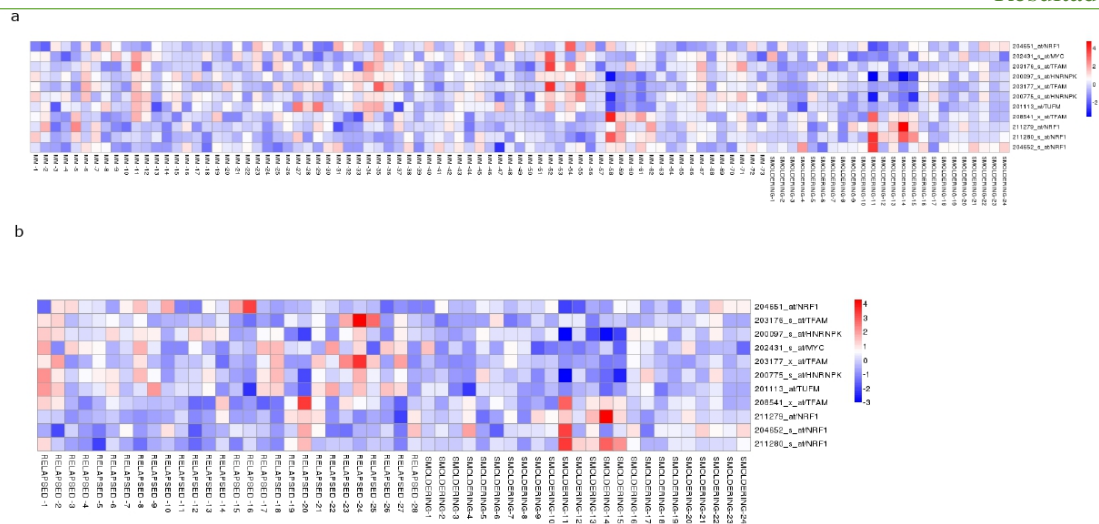


Figura 15.- Mapas de calor con la expresión de los genes MYC, TUFM, TFAM, NRF1 y HNRNPK en cohortes de donantes sanos ($n = 15$) y de pacientes con GMSI ($n = 22$), SM ($n = 24$), MM al diagnóstico ($n = 73$) y MM en recaída ($n = 28$) de la base de datos canEvolve. a) SM versus MM al diagnóstico b) SM versus MM en recaída.

Por otro lado, los resultados de los análisis de expresión de las firmas moleculares (Molecular Signatures Database [MSigDB]) de las vías estudiadas revelaron también un aumento de expresión tanto en los pacientes al diagnóstico como en los de recaída al compararlos con donantes sanos. En la vía de los complejos de la cadena respiratoria (31 genes) se observaron diferencias en los pacientes con MM al diagnóstico y con recaída respecto a los donantes (Figura 16a). Y en la vía de la actividad de la citocromo c oxidasa, también se observó un aumento en los pacientes al diagnóstico y en recaída (Figura 16b).

5.1.1.2. Análisis en pacientes del Hospital 12 de Octubre

Los resultados del análisis de la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *HNRNPK* y *NRF1* por qPCR en los pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico y MM en recaída mostraron las mismas tendencias que las observadas con los análisis de las bases de datos canEvolve y COMMPASS. En el caso de los genes *TUFM* y *TFAM* se observaron diferencias significativas entre los distintos estadios de la enfermedad. Al aplicar el test t de Student se demostró que en el caso del *TUFM*, existían diferencias significativas al comparar pacientes con GMSI con pacientes al diagnóstico ($p = 0.003$). Sin embargo, al comparar la expresión con los pacientes en recaída no se encontraron diferencias significativas (Figura 17a) con respecto a pacientes al diagnóstico. Para el gen *TFAM*, se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen al comparar los pacientes al diagnóstico con los pacientes GMSI ($p = 0.013$), e incluso al comparar los pacientes con SM con los de GMSI ($p = 0.004$). Sin embargo, como sucedía en el caso de *TUFM*, no se encontraron diferencias al compararlos con los pacientes en recaída (Figura 17b). Los análisis del gen *MYC* revelaron un aumento de su expresión según progresaba la enfermedad del MM. Al realizar el análisis test t de Student entre los distintos grupos, se observaron diferencias significativas al comparar pacientes con GMSI con pacientes con SM ($p = 0.04$), con MM al diagnóstico ($p = 0.03$) y con MM en REC ($p = 0.006$) (Figura 17c). Respecto al estudio de los genes *HNRNPK* y *NRF1* se mostró un ligero aumento de la expresión en las recaídas, y también en el diagnóstico para el gen *NRF1*, no obstante, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos (Figura 17d-e).

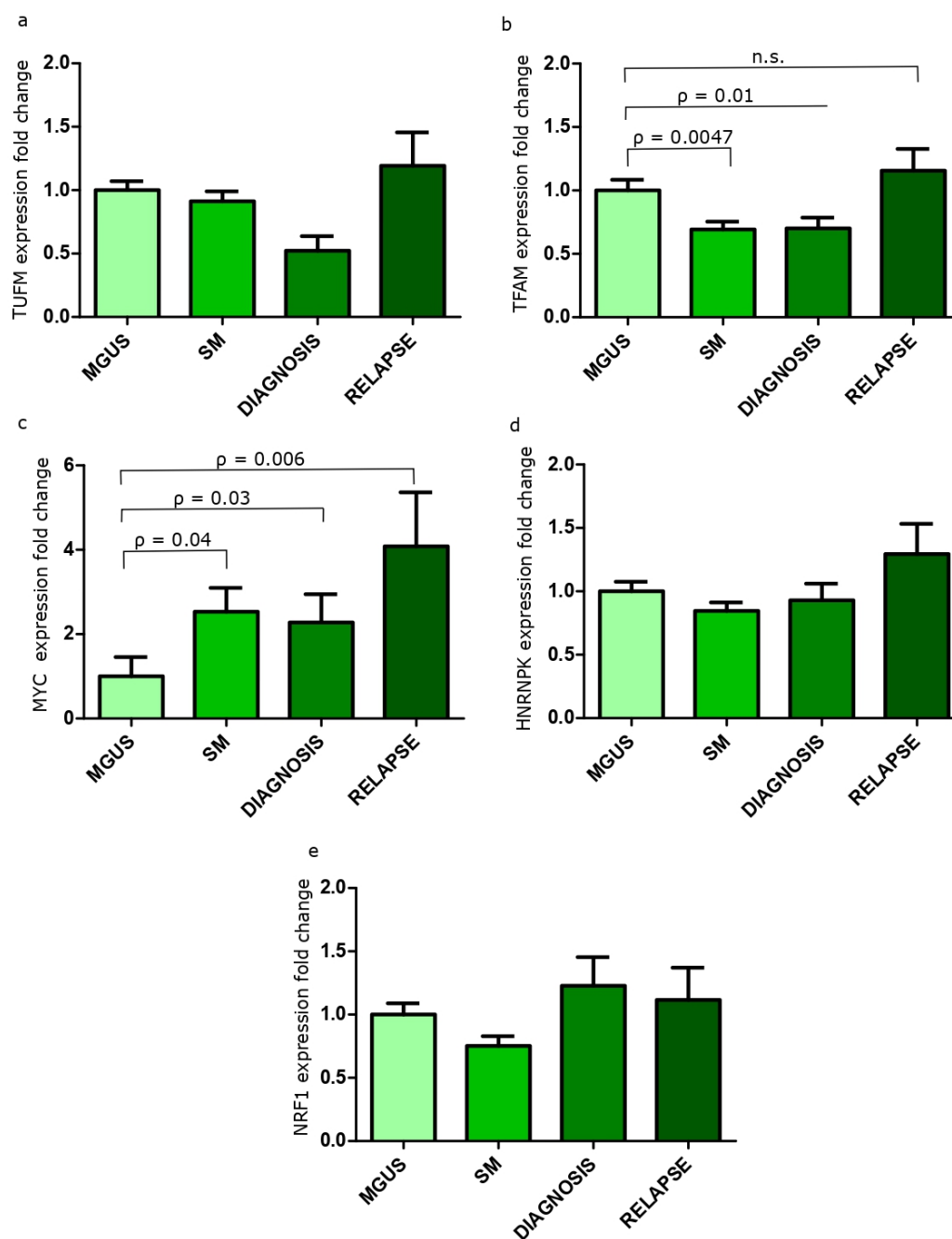


Figura 17.- Expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial por qPCR en cohortes de pacientes con GMSI (n=9), SM (n=9), MM al diagnóstico (n=18) y MM en recaída (n=11). Se representa el análisis estadístico t de Student. a) TUFM, ANOVA $p = n.s.$; b) TFAM, ANOVA $p = 0.01$; c) MYC, ANOVA $p = n.s.$ d) HNRNPK, ANOVA $p = n.s.$ e) NRF1, ANOVA $p = n.s.$ (media \pm EE). N.s., no significativo.

De forma complementaria, y con el apoyo de los datos clínicos correspondientes a los pacientes evaluados, se analizó si la elevada expresión de alguno de los cinco genes

bajo estudio, estaba relacionado con la presentación de recaídas en el transcurso de la enfermedad y con una menor supervivencia. Para el gen *MYC* se observó una menor SLP en pacientes que han presentado recaídas (1 o más) y alta expresión del gen *MYC* (figura 18). Además, el análisis de supervivencia usando el modelo de regresión de Cox, detectó un aumento de riesgo asociado a la recaída en pacientes con alta expresión del gen *MYC* (REC: [HR], 1.23; $p = 0.016$, intervalo de confianza 95%, 1.039 – 1.458).

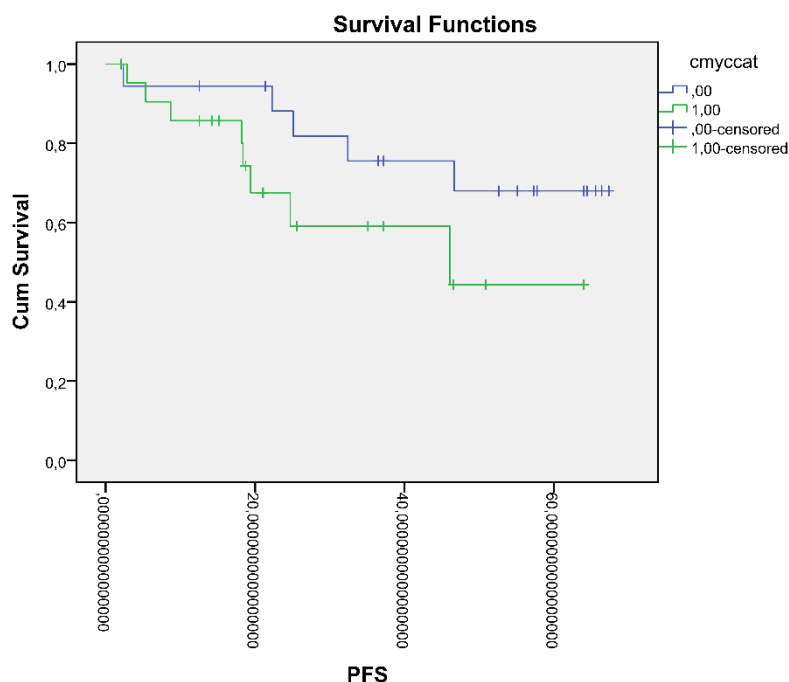


Figura 18.-Curvas Kaplan Meier comparando la SLP para el gen *MYC* en función de los pacientes que presentan recaídas ($N=13$). En verde se representan las pacientes que han recaído con alta expresión de *MYC* ($N=8$), mientras que en azul se indican los pacientes que no han recaído con baja expresión de *MYC* ($N=5$).

5.1.2. Estudio de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (COXII)

Atendiendo a los niveles de expresión de una de las proteínas más abundantes de la mitocondria, la subunidad II del complejo IV de la cadena respiratoria (COXII), mediante técnicas inmunohistoquímicas, a nivel microscópico se observó que la intensidad de la tinción aumenta según progresaba la enfermedad (Figura 19a). La cuantificación de los niveles de expresión en tres grados de tinción, en función de su intensidad, mostró en el análisis de varianza diferencias significativas en la expresión de COXII entre los cuatro grupos de pacientes estudiados, GMSI, SM, MM al diagnóstico y

MM en recaída ($p < 0.0001$). En concreto, se demostró una mayor proporción de células negativas en los pacientes con GMSI y SM en comparación con los pacientes con MM al diagnóstico y en recaída, de forma que se encontraron diferencias significativas al compararlas mediante el test t de Student, siendo $p < 0.05$ al comparar dichos grupos (GMSI -MM $p = 0.01$; GMSI -REC $p = 0.004$; SM-MM $p = 0.01$; SM-REC $p = 0.01$). También se encontró una asociación en el número de las células positivas “++” y la progresión de la enfermedad. Mediante el test t de Student se comprobó que los pacientes al diagnóstico y a la recaída, al compararlos con sujetos con GMSI, presentaban diferencias significativas en el número de células con un elevado grado de tinción (clasificadas como “++”) (Figura 19b).

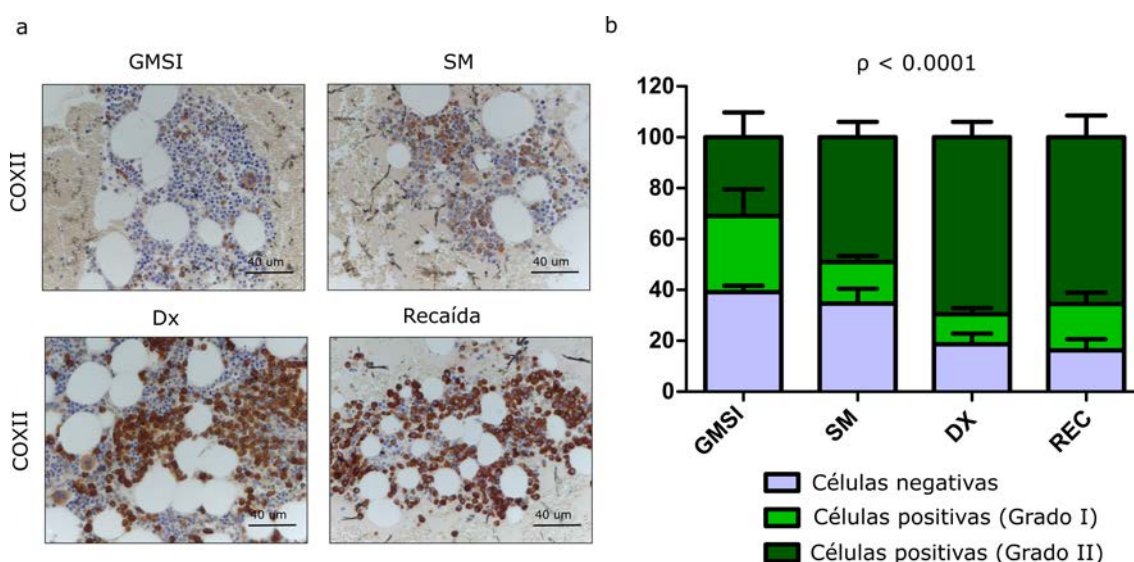


Figura 19.- Inmunohistoquímica de COXII en pacientes de MM. a) Imágenes de las inmunohistoquímicas (objetivo 40X) representativas de cada estadio, GMSI ($n = 4$), SM ($n = 7$), MM al diagnóstico ($n = 13$) y MM en recaída ($n = 11$). b) Gráfico de barras que representa la cuantificación media de cada grado de tinción según el momento de la enfermedad, (media \pm EE).

5.1.3. Estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (COX)

Para poder realizar el estudio de la actividad enzimática mitocondrial en muestras de médula ósea de pacientes, se puso a punto una técnica histoenzimática, generalmente llevada a cabo en tejido muscular, en células purificadas CD138+. Para ello, se cuantificó

la actividad de la COX en función de la intensidad de la tinción obtenida tras la reacción enzimática especificada el apartado 4.2.9. El análisis de la varianza, ANOVA, reveló diferencias significativas entre la actividad enzimática que presentaban los 5 grupos estudiados ($p < 0.0001$). En la figura 6a se pueden observar dichas diferencias en la intensidad en 5 imágenes representativas de cada estadio. Además, los análisis estadísticos realizados con el test t de Student mostraron diferencias significativas entre los donantes control al compararlos con pacientes con SM, MM al diagnóstico y en recaída mostraban diferencias significativas, $p = 0.03$, $p = 0.0001$ y $p = 0.0001$, respectivamente (Figura 20).

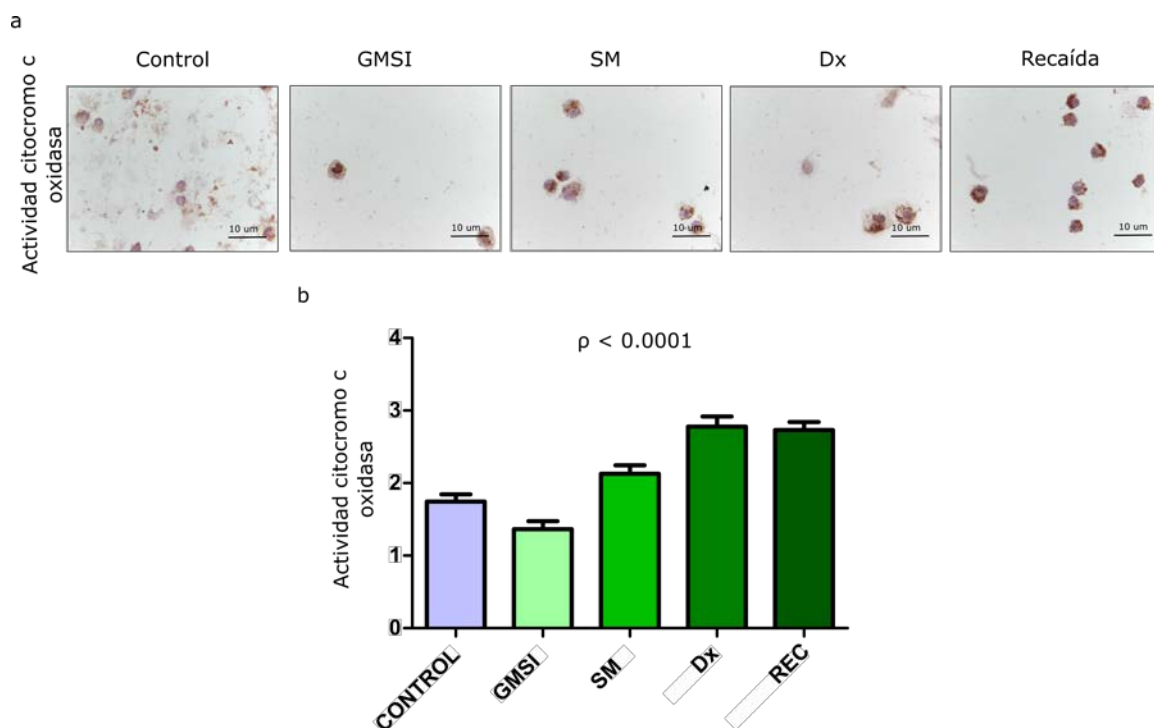


Figura 20.- Histoenzimática de COX en pacientes de MM. a) Imágenes de los ensayos histoenzimáticos (objetivo 100X) representativos de cada estadio, donante ($n = 2$), GMSI ($n = 4$), SM ($n = 5$), MM al diagnóstico ($n = 5$) y MM en recaída ($n = 4$). b) Gráfico de barras que representa la cuantificación media (media \pm EE) de cada grado de tinción según el momento de la enfermedad.

5.1.4. Estudio del potencial de membrana y carga mitocondrial

El estudio de la expresión de las sondas moleculares mitoTracker Green y Red, referentes a la carga mitocondrial y al potencial de membrana mitocondrial

respectivamente, reveló un aumento de expresión de ambos marcajes en pacientes con diagnóstico de MM en comparación con pacientes con GMSI. En concreto, para la carga mitocondrial sí que se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados ($p = 0.05$) (Figura 21).

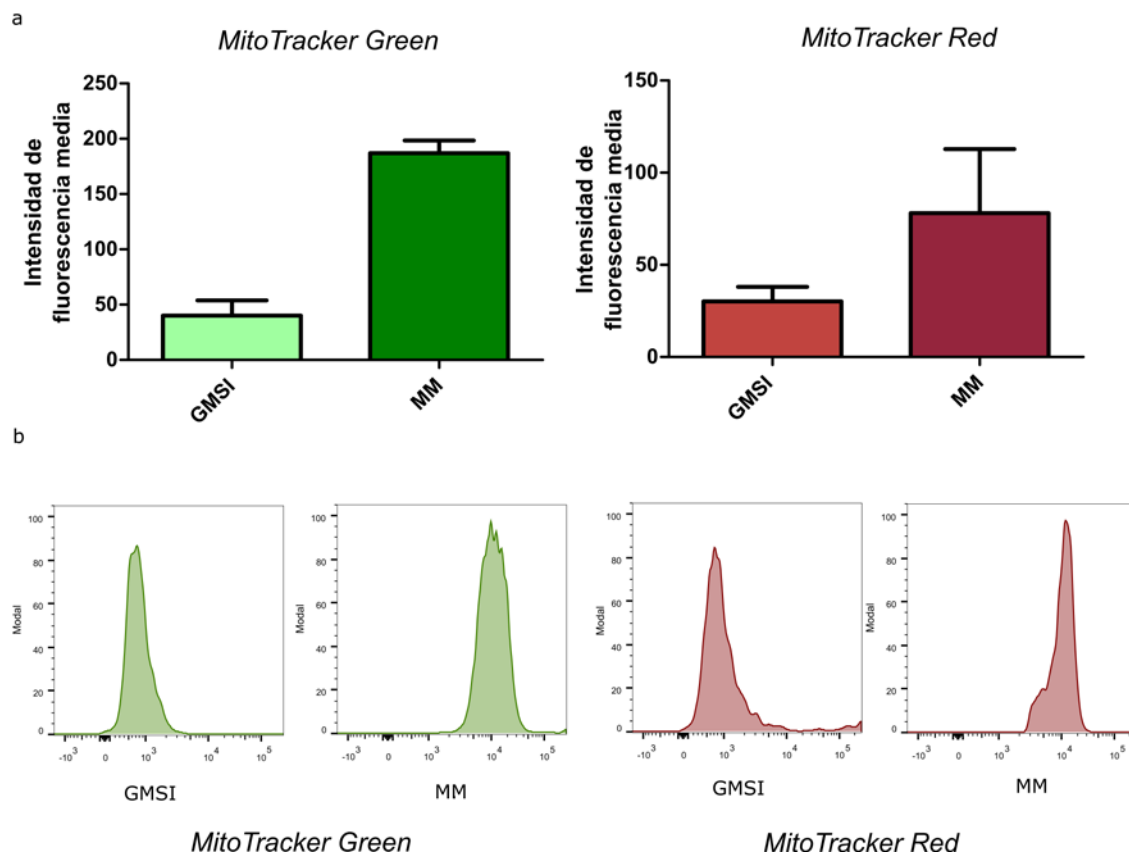


Figura 21.- Citometría de las sondas mitoTracker Green y Red en pacientes de MM. a) Izquierda, gráfico de barras relativo a la carga mitocondrial de pacientes con GMSI ($n=3$, media \pm EE) y en recaída ($n=3$, media \pm EE). Derecha, gráfico de barras relativo al potencial de membrana mitocondrial de pacientes GMSI ($n=3$) y con MM ($n=3$). b) Histogramas representativos de cada una de las condiciones estudiadas, con los cambios de expresión registrados para las sondas mitoTracker Green (izquierda) y el mitoTracker Red (derecha).

5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL COMO DIANA TERAPÉUTICA

5.2.1. Caracterización del modelo celular para su estudio

Para determinar el modelo de estudio *in vitro* más apropiado y testar la eficacia de la inhibición mitocondrial en el MM, se analizaron, en 6 líneas celulares de MM, el número de copias de ADNmt y la actividad de la enzima COX.

5.2.1.1. Estudio del número de copias de ADNmt

Se registró una amplia variedad del número de copias de ADNmt de cada una de las líneas estudiadas. La línea JJN3 en comparación con las otras cinco, es la que mayor número de copias presenta, 2493 ± 645.8 , además se encontraron diferencias significativas con cada una de las 5 líneas restantes al realizar un análisis t de Student. En contraposición, la línea OPM2 es la que menor número de copias registra 622.7 ± 127.6 (Figura 22a).

5.2.1.2. Estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (COX)

Las intensidades de la tinción resultado de la reacción catalizada por la enzima citocromo c oxidasa, se evaluaron en una escala de 0 a 4. La cuantificación en cada una de las líneas celulares estudiadas reveló que la línea JJN3 S fue la que presentó una tinción más intensa (3.6 ± 0.13) en comparación con el resto de líneas, encontrándose diferencias significativas tras analizar con el estadístico t de Student (Figura 22b). Por tanto, la línea JJN3 al responder a los criterios de alta actividad mitocondrial, es decir, elevado número de copias de ADNmt y alta actividad de COX, se consideró como modelo de estudio celular.

5.2.1.3. Estudio de la expresión de genes relacionados con la mitocondria:
MYC, TUFM y TFAM.

Se seleccionaron tres líneas celulares para este estudio, una de alta actividad mitocondrial (JJN3), una de baja actividad (L363) y otra con valores intermedios (NCI-H929), acorde a los resultados obtenidos en los dos apartados previos. La expresión de tres de los genes en los que se ha observado una mayor tendencia en el aumento de expresión según progresa la enfermedad (ver apartado 5.1.1.2) se estudió para ver si las líneas celulares seguían la misma dinámica, acorde a los resultados de número de copias mitocondriales y actividad de la COX. De esta forma, para los genes *MYC*, *TUFM* y *TFAM* se corroboró la misma tendencia, es decir, JJN3 S fue la línea que mayor expresión de los genes presentaba; NCI-H929 es la línea que presentó una expresión más intermedia, a excepción de *MYC*, el cual presenta una expresión parecida a JJN3 S; y L363 fue la que menor expresión presentó para los tres genes estudiados. En el caso del gen *MYC* con el análisis de t de Student comparando las líneas L363 y JJN3 se encontraron diferencias significativas ($p = 0.0074$). En el caso del gen *TUFM*, aun mostrándose una clara tendencia, no se observaron diferencias significativas al comparar la línea JJN3 con la L363 y NCI-H929. Y para el gen *TFAM*, al comparar la línea JJN3 con la L363 y NCI-H929 se detectaron diferencias significativas en ambos casos (Figura 22c).

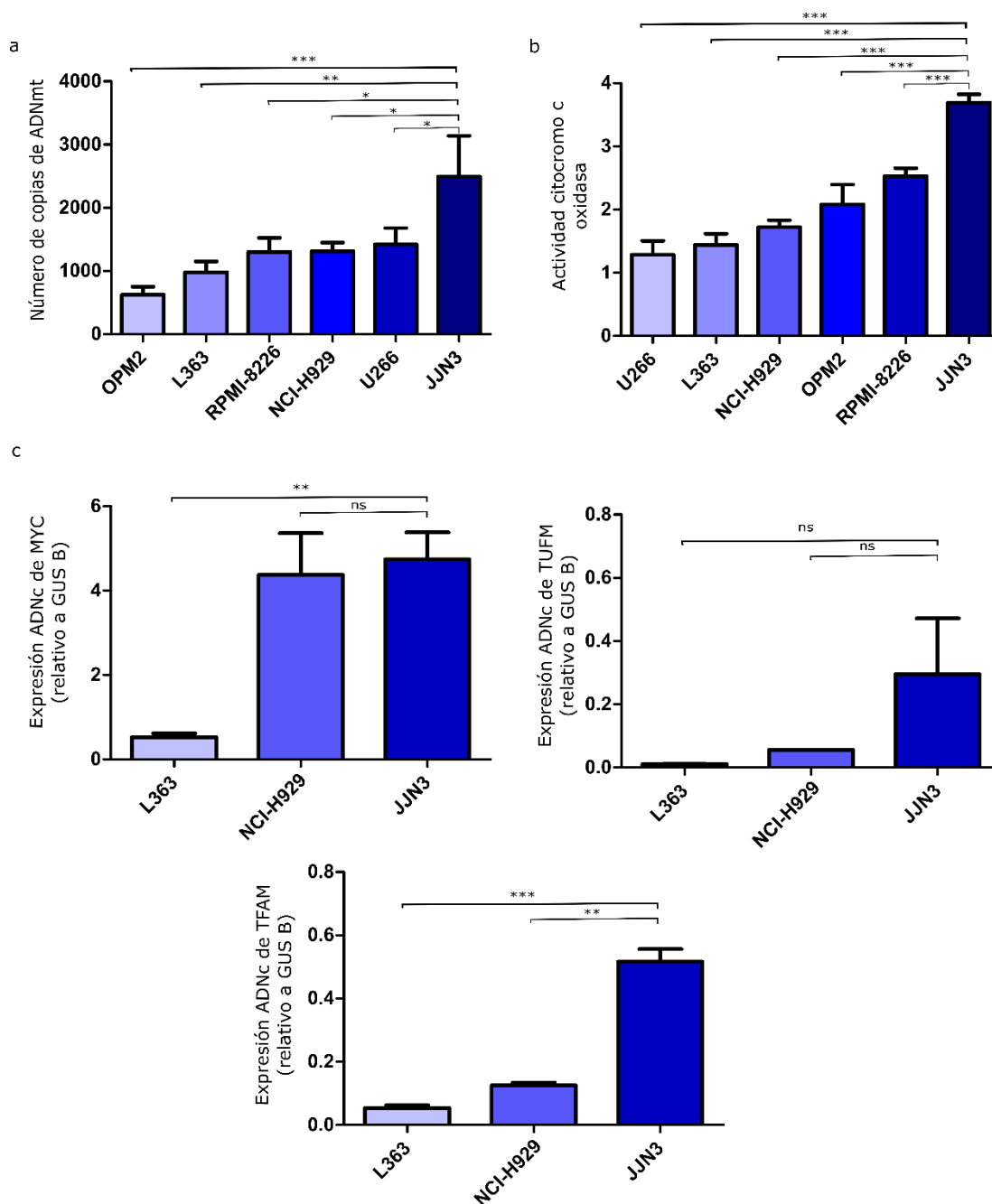


Figura 22.- Caracterización de la actividad mitocondrial en líneas celulares de MM. a) Gráfico de barras que representa el número de copias de ADNmt obtenidas por RT-PCR presentes en las líneas celulares de MM OPM2, L363, RPMI-8226, NCI-H929, U266 y JJJ3 ($n=3$, media \pm EE). b) Gráfico de barras que representa las cuantificaciones medias de intensidad de la actividad COX en las líneas celulares de MM OPM2, L363, RPMI-8226, NCI-H929, U266 y JJJ3 ($n=3$, media \pm EE). c) Gráficos de barras que representan la expresión de los genes MYC, TUFM y TFAM en las líneas JJJ3, NCI-H929 y L363 ($n=3$, media \pm EE).). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, n.s. no significativo.

5.2.2. Evaluación de la inhibición mitocondrial como diana terapéutica: ensayos de viabilidad con el inhibidor tigeclina

Para estudiar si la elevada actividad mitocondrial puede suponer una nueva vulnerabilidad en el tratamiento del MM, se testeó el impacto en la supervivencia de las células mielomatosas con el inhibidor mitocondrial, tigeclina, solo o en combinación con bortezomib. Los ensayos de dosis-respuesta muestran la actividad citotóxica esperada por acción del bortezomib en las líneas JJN3, L363 y NCI-H929 ($IC_{50} = 4.08$ nM, $IC_{50} = 10.8$ nM, $IC_{50} = 15.79$ nM respectivamente) (Figura 23a). Al testar la tigeclina en monoterapia también se observa citotoxicidad en las mismas líneas, IC_{50} en JJN3 = 21.36 μ M, IC_{50} en L363 = 10.36 μ M e IC_{50} en NCI-H929 = 26.37 μ M (Figura 23b).

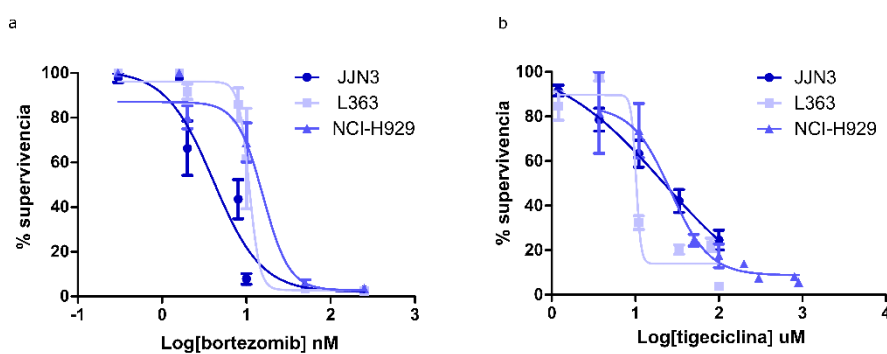


Figura 23. Curvas de dosis respuesta para los fármacos bortezomib y tigeclina en líneas celulares de MM.- a y b) Representación gráfica de los experimentos dosis-respuesta a 48h en las líneas celulares JJN3, L363 y NCI-H929 con a) bortezomib y con b) tigeclina. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.2.1. Estudios de sinergia

Los estudios con bortezomib y tigeclina en combinación se realizaron acorde a las dosis descritas en la tabla 12. El análisis de dosis-respuesta reveló que la citotoxicidad aumentaba con ambos fármacos en combinación, siendo la IC_{50} 2.3 veces menor que la de la tigeclina en monoterapia (Figura 24a). Además, los análisis hechos para cuantificar la sinergia de la combinación demostraron que para las 5 dosis de tigeclina

estudiadas junto con una dosis fija de bortezomib los índices de combinación eran menores de 0.5.

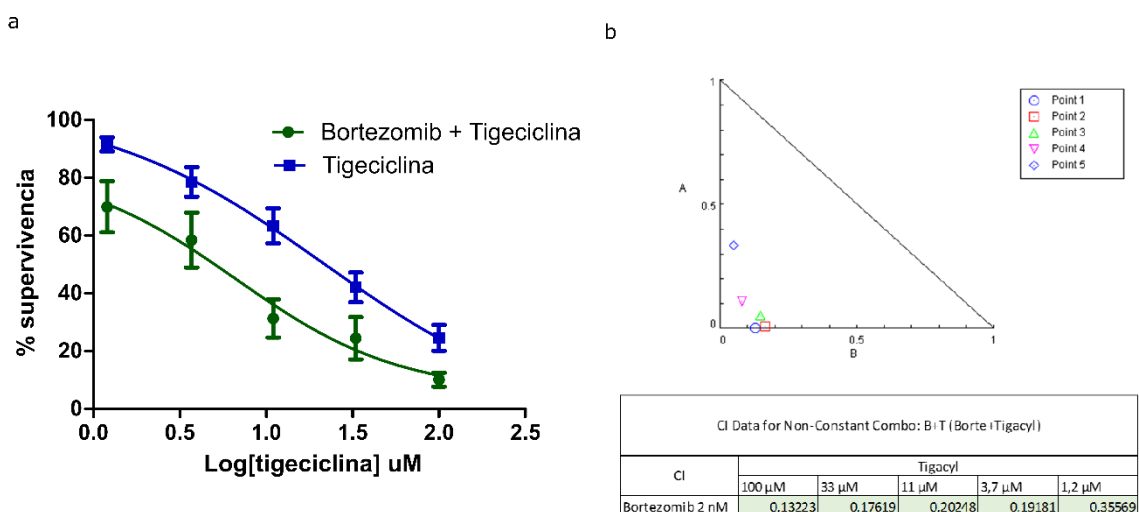


Figura 24.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeciclina en la línea celular JJN3. a) Gráfico dosis-respuesta correspondientes a los tratamientos de 48h con tigeciclina sola ($IC_{50} = 21.3 \mu M$) o en combinación con bortezomib ($IC_{50} = 6.6 \mu M$). Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE. b) Isoblograma representando los índices de combinación resultantes del efecto de la combinación de bortezomib y tigeciclina.

5.2.2.2. Estudios de sensibilización

Este tipo de estudios se empleó para determinar si el efecto de la tigeciclina favorece la eficacia del bortezomib, debilitando la célula mielomatosa al verse reducida la actividad mitocondrial. Para ello se trabajó con una dosis de 2 nM de bortezomib, ya que es aproximada al valor de IC_{50} . Como se puede ver en la figura 25, la citotoxicidad del bortezomib generada por la sensibilización con tigeciclina es mayor en comparación con células que no han sido sensibilizadas previamente. Estudiando más en profundidad posibles diferencias entre los distintos grupos de sensibilización se verificó que a dosis de 2 nM de bortezomib, los grupos con tigeciclina a 33, 11 y 3.7 μM aumentaban significativamente la toxicidad de bortezomib entre 1.5 y 1.7 veces ($p < 0.0001$).

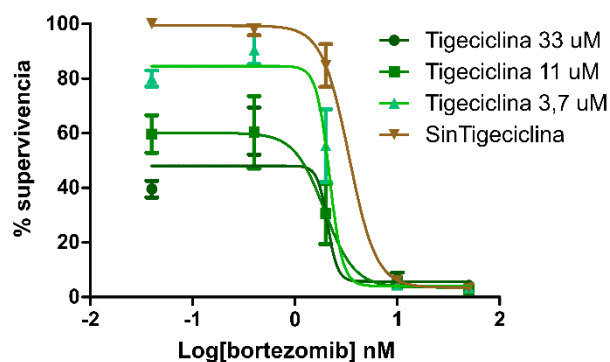


Figura 25.- Estudio de sensibilización de la línea celular JIN3 con tigeciclina en combinación con bortezomib. a) Gráfico dosis-respuesta correspondiente a los tratamientos de 48h con bortezomib, previamente expuestos durante 48h a tres dosis distintas de tigeciclina. IC_{50} Bortezomib con tigeciclina $33 \mu M = 2.1 \text{ nM}$; IC_{50} Bortezomib con tigeciclina $11 \mu M = 1.9 \text{ nM}$; IC_{50} Bortezomib con tigeciclina $3.7 \mu M = 2.2 \text{ nM}$; IC_{50} Bortezomib sin tratamiento de tigeciclina = 3.4 nM . Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.3. Validación del efecto mitocondrial producido por el inhibidor tigeciclina

Con el objetivo de validar el efecto mitocondrial que se produce sobre la célula mielomatososa por la acción de la tigeciclina, se llevaron a cabo cuatro tipos de estudios: uno a nivel proteico y los otros tres a nivel funcional. De esta forma, primero se estudió la expresión de los complejos de la cadena respiratoria por western blot; a continuación, se cuantificó la actividad de la enzima COX mediante ensayo histoenzimático; posteriormente se analizaron por citometría la carga mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial; y finalmente se estudió la tasa de consumo de oxígeno por Seahorse. Referirse a la tabla 12 para las condiciones de los grupos de tratamiento según el tipo de experimento.

5.2.3.1. Estudio de la expresión de proteínas implicadas en la actividad mitocondrial

Para estudiar a nivel proteico cómo se encuentran expresados los complejos de la cadena respiratoria tras las condiciones de tratamiento impuestas (tabla 12), el extracto proteico fue analizado mediante western blot. Además, para complementar el estudio se analizaron otras dos proteínas, c-Myc y HnRNP K, conocidas por estar implicadas en la malignización del MM (121). Los resultados mostraron que, en concreto los complejos I y IV, sufrían una marcada disminución en su expresión en los grupos tratados con tigeciclina o con la combinación, detectándose diferencias significativas en el análisis de la varianza en el caso del complejo IV (Figura 26). En cambio, en los complejos II y V se aprecia un ligero aumento de la expresión, llegando a encontrarse diferencias significativas en el estudio de la varianza entre las condiciones analizadas en la expresión del complejo V. Respecto al complejo III, las diferencias de expresión entre las distintas condiciones no muestran una tendencia clara. En concreto, en los grupos tratados con bortezomib se verifica un ligero aumento de expresión en todos los complejos de la cadena respiratoria. Por otro lado, al observar la expresión de c-Myc y HnRNP K tras el tratamiento de tigeciclina y/o su combinación con bortezomib se aprecia una disminución clara de la expresión de ambas proteínas, que se corrobora con los resultados de las densitometrías de las bandas con las distintas condiciones (Figura 26).

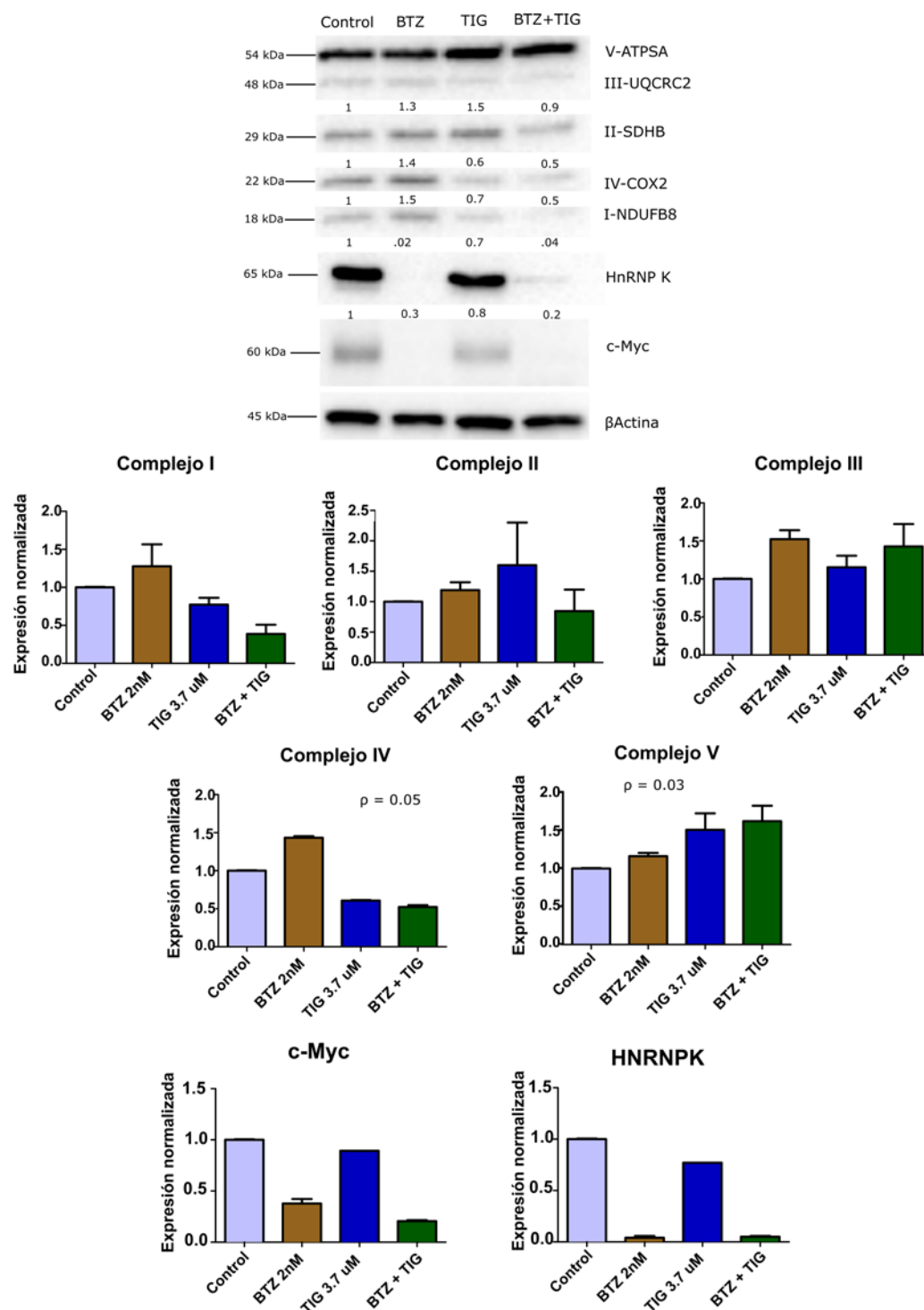


Figura 26.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJJ3 con tigeciclina, bortezomib y su combinación por western blot. Arriba, Western Blot (WB) con anticuerpos anti-OXPPOS, anti- HnRNP K y anti-c-Myc en la línea JJJ3 sin tratar, tratada con bortezomib, tratada con tigeciclina y tratada con la combinación de bortezomib y tigeciclina. La β actina se utilizó como control de carga del experimento ($n=3$). Abajo, densitometrías de la expresión obtenida en los WB de los cinco complejos de la fosforilación oxidativa, de c-Myc y de HnRNP K.

5.2.3.2. Estudio de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (COX)

Para ahondar en el estatus de la mitocondria tras los tratamientos de estudio, se analizó a nivel funcional la actividad de la enzima COX. Los resultados se encuentran en la línea de lo expuesto en el párrafo anterior, ya que la intensidad de la tinción, correspondiente al grado de actividad de la enzima, en las células tratadas con tigeciclina y/o su combinación con bortezomib, se encuentra al menos tres veces disminuida en comparación con el control y con las células tratadas con bortezomib (ver Figura 27). El análisis de la varianza reveló que existían diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento ($p = 0.0001$). El test t de Student mostró también diferencias significativas entre los grupos control y tigeciclina ($p = 0.0001$), control y combinación ($p = 0.0001$), bortezomib y tigeciclina ($p = 0.0001$), bortezomib y combinación ($p = 0.0001$).

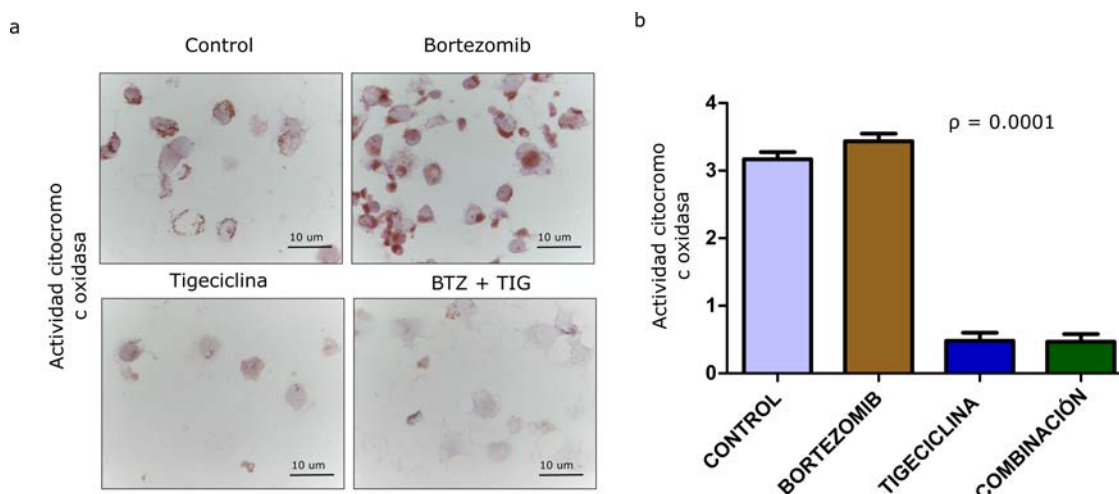


Figura 27.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJJ3 con tigeciclina, bortezomib y su combinación por histoquímica de COX. a) Imágenes de los ensayos histoquímicos (objetivo 100X) representativos de cada condición, control, bortezomib, tigeciclina, combinación. b) Gráfico de barras que representa la cuantificación media de cada grado de tinción según el tratamiento aplicado. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.3.3. Estudio del efecto de la tigeciclina sobre el potencial de membrana y carga mitocondrial

Otra aproximación experimental para estudiar a nivel funcional el efecto de la tigeciclina sobre el estado de la mitocondria fue el análisis de la expresión de las sondas mitocondriales, mitoTracker Green y mitoTracker Red, mediante citometría de flujo. El mitoTracker Green, que permite el estudio de la carga mitocondrial que presentan las células, reveló que en aquellas células tratadas con tigeciclina y/o su combinación con bortezomib presentaban menor carga mitocondrial que las células control y aquellas tratadas con bortezomib (Figura 28a). En el caso del mitoTracker Red se pudo observar que el potencial de membrana mitocondrial se encontraba reducido en los grupos tratados con tigeciclina, y en concreto, aquellos tratados con la combinación sufrieron una mayor reducción en comparación con el control. Sin embargo, las células tratadas con bortezomib sólo, mostraron una ligera disminución de la expresión al compararlas con el control (Figura 28b). Estos datos muestran que la reducción en la actividad mitocondrial se correlaciona con el efecto citotóxico de la tigeciclina, tanto sola como aplicada en combinación con bortezomib, lo que sugiere que la inducción de muerte celular ocurre por la vía de la fosforilación oxidativa (OXFOS).

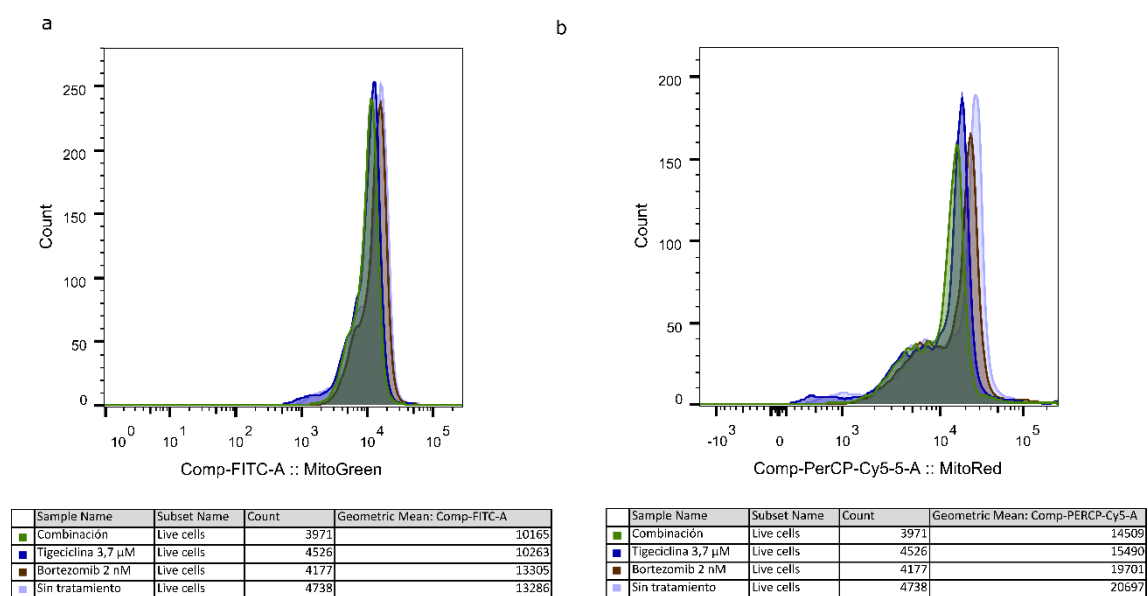


Figura 28.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 con tigeciclina, bortezomib y su combinación por citometría de mitoTracker Green y Red. a y b) Histogramas con cada una de las condiciones estudiadas, se representan los cambios de expresión registrados para las sondas a) mitoTracker Green y b) mitoTracker Red (derecha) en las células JJN3 control, tratadas con bortezomib, tratadas con tigeciclina y tratadas con la combinación (N = 3).

5.2.3.4. Estudio del efecto de la tigeciclina sobre el consumo de oxígeno

Para concluir con la validación del efecto mitocondrial bajo las distintas condiciones de estudio, se analizó la tasa de consumo de oxígeno, con el equipo de medición en vivo Seahorse. Primero se validó el fenotipo energético de la línea celular JJN3, que acorde a la bibliografía y a los datos de actividad mitocondrial estudiados, demostró que son células con un perfil muy energético además de glicolítico (Figura 29a). A continuación, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos. Primero se estudió la respiración basal y máxima de las células tratadas durante 48h con bortezomib, tigeciclina y/o la combinación. Como se puede ver en la figura 29b, se produce una reducción de la respiración basal y la máxima, fundamentalmente en las células tratadas con la combinación en comparación con el control ($p = 0.0001$). Además, se encontraron diferencias significativas en el estudio de la varianza de las 4 condiciones evaluadas ($p = 0.0001$). En segundo lugar, se analizó la variación en la tasa de consumo de oxígeno (en inglés oxygen consumption rate, OCR) en las células tratadas con bortezomib, tigeciclina y la combinación. Tal y como se esperaba, se encontró que la tasa de consumo de oxígeno se veía ligeramente aumentada tras aplicar de forma aguda bortezomib. Sin embargo, al inyectar tigeciclina y/o la combinación, la OCR disminuía (Figura 29c).

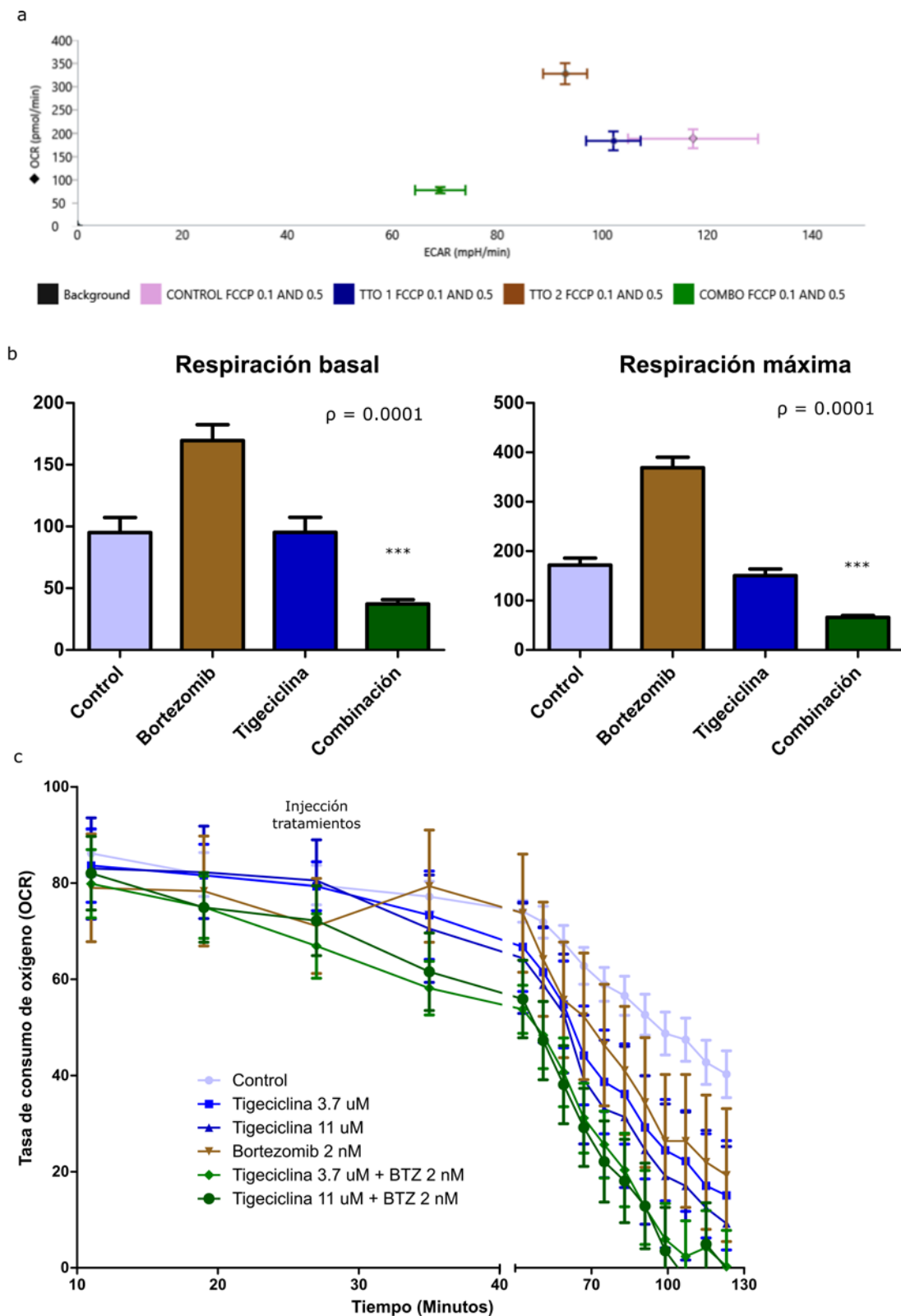


Figura 29.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JLN3 con tigeciclina, bortezomib y su combinación por Seahorse. a) Mapa de energía que representa el estatus energético de cada una de las condiciones estudiadas en la línea JLN3 (control, bortezomib, tigeciclina y la combinación) eje de las X se corresponde con la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y el eje de las Y se corresponde con la tasa de acidificación extracelular (ECAR). b)

Gráficos de barras que representan los niveles de respiración basal (izquierda) en cada una de las condiciones; y a la derecha, se representa la respiración máxima en cada una de las condiciones c) Representación gráfica de los cambios en la tasa de consumo de oxígeno tras una inyección de las distintas condiciones bajo estudio.

5.2.4. Evaluación de la inhibición mitocondrial: caracterización del carfilzomib (inhibidor del proteasoma)

Con el fin de verificar que los cambios a nivel mitocondrial que se producen tras el uso de bortezomib siguen la misma tendencia que otros fármacos de la misma familia como es el carfilzomib; se estudió cómo se ven afectados la actividad de la COX, el nivel de carga mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial. Primero se corroboró la capacidad citotóxica del carfilzomib sobre la línea JJN3, determinándose en el ensayo dosis-respuesta que su IC₅₀ es de 2.2 nM (Figura 30a). A continuación, se estableció 1.5 nM, como la dosis de trabajo para llevar a cabo los estudios funcionales que determinan la actividad mitocondrial. Se decidió trabajar con esta dosis porque es aproximada al valor de IC₅₀ del carfilzomib en esta línea. Por un lado, a través del ensayo histoenzimático de COX, se verificó que al tratar las células con carfilzomib, estas aumentaban la expresión de la enzima de la misma forma que se observó con el bortezomib (Figura 30b). También se estudió mediante citometría de flujo la expresión de las sondas mitoTracker Green y Red. En el caso del mitoTracker Green se detectó un ligero aumento de la carga mitocondrial en las células tratadas con carfilzomib. Sin embargo, a nivel de potencial de membrana no se observaron diferencias entre el control y el grupo de células tratadas con carfilzomib (Figura 30c). Con estos resultados se verificó que la citotoxicidad que se produce a nivel mitocondrial con fármacos inhibidores del proteasoma (bortezomib y carfilzomib) es similar.

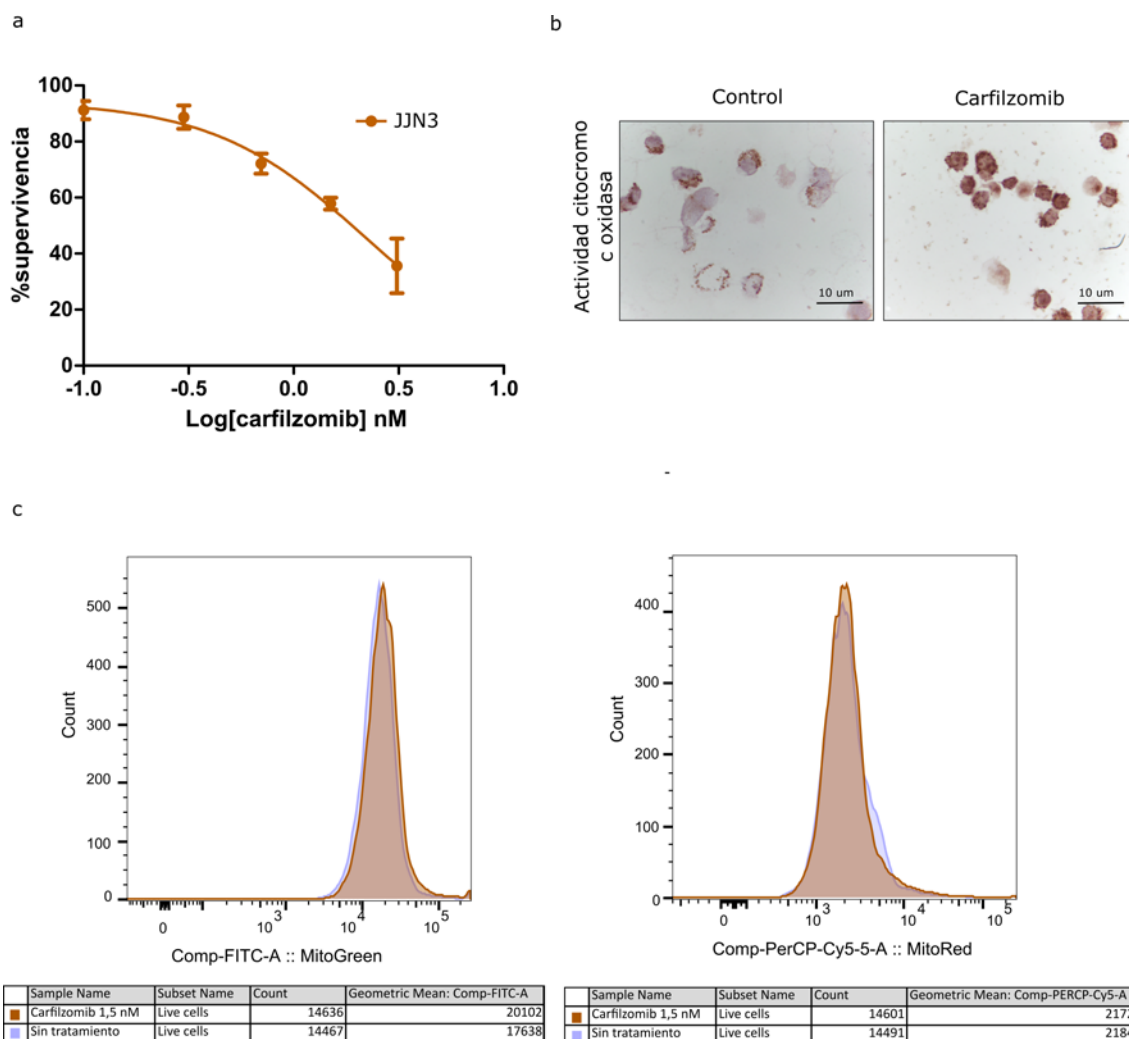


Figura 30.-Evaluación de la inhibición mitocondrial con carfilzomib. a Representación gráfica del experimento dosis-respuesta a 48h en la línea celular JLN3 con carfilzomib. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE. b Imágenes representativas de los ensayos histoenzimáticos (objetivo 100X) de cada condición, control y carfilzomib ($n = 3$). c) Histogramas con cada una de las condiciones estudiadas, se representan los cambios de expresión registrados para las sondas a) mitoTracker Green y b) mitoTracker Red (derecha) en las células JLN3 control y tratadas con carfilzomib, ($n = 3$).

5.2.5. Efecto de la inhibición mitocondrial en la resistencia a bortezomib

Los resultados del apartado 5.1 muestran que las células de mieloma de pacientes en recaída y/o resistentes a bortezomib presentan una mayor actividad mitocondrial que

en los estadios previos de la enfermedad, por lo que pueden verse beneficiadas de la actividad inhibitoria mitocondrial de la tigeciclina. Con el fin de estudiar la citotoxicidad y el efecto que se produce a nivel mitocondrial se generó un modelo de resistencia a bortezomib.

Para la generación de la línea JLN3 resistente a bortezomib se procedió acorde a lo descrito en el apartado 4.2.2. Seguidamente se comprobó mediante ensayo de dosis-respuesta la diferencia a nivel de supervivencia de la línea sensible y la resistente a bortezomib, encontrándose que esta última necesita una dosis 4 veces mayor para conseguir el mismo efecto citotóxico que se produce en la línea sensible (ver figura 31a). A continuación, se analizó si la capacidad citotóxica de la tigeciclina se mantenía en las células resistentes a bortezomib. De esta forma, se realizó un nuevo ensayo de dosis respuesta en el que se vio que las células JLN3 R presentaban una IC₅₀ similar a la que presentaban las JLN3 sensibles (Figura 31b).

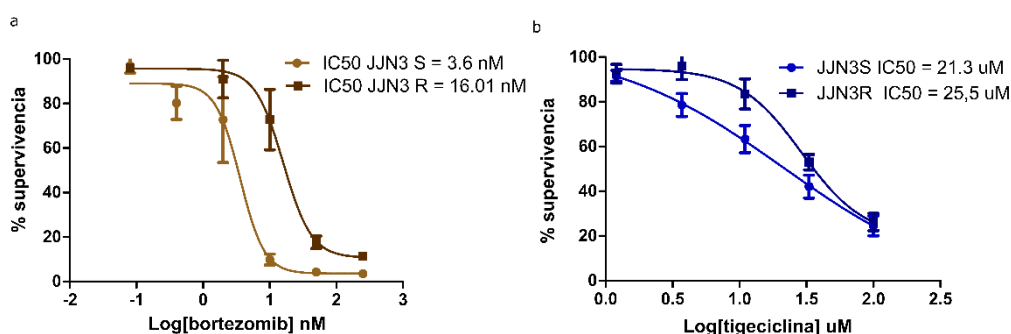


Figura 31.- Evaluación de la inhibición mitocondrial con la línea celular JLN3 R. a y b) Representación gráfica de los experimentos dosis-respuesta a 48h en las líneas celulares JLN3 S y JLN3 R con a) bortezomib y con b) tigeciclina. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.5.1. Efecto de la tigeciclina sobre la expresión de proteínas implicadas en la actividad mitocondrial durante la resistencia al bortezomib

Con estos resultados se procedió a estudiar los cambios en la actividad mitocondrial tras el tratamiento con tigeciclina de la línea celular resistente a bortezomib, de igual manera que se realizó con la línea celular sensible. Es decir, se trataron cultivos

celulares de la línea JJN3 R con 2 nM de bortezomib, 3.7 μ M de tigeciclina y con la combinación de estos dos fármacos a las dosis indicadas (ver tabla 12). En primer lugar, se estudió en los extractos de proteína de cada una de las condiciones la expresión de los complejos de la cadena respiratoria y de las proteínas c-Myc y HnRNP K por western blot. Los tratamientos con tigeciclina y/o la combinación disminuyeron la expresión de los complejos II, III, IV y V de la cadena respiratoria en comparación con la condición control, como se observa en la figura 32a. Respecto a las proteínas c-Myc y HnRNP K, también se observó una disminución en la expresión en el caso de las células tratadas con tigeciclina y/o su combinación con bortezomib en comparación con el grupo control. Las células tratadas solo con bortezomib, como era de esperar, apenas sufrían cambios en la expresión de ninguna de las proteínas estudiadas.

5.2.5.2. Efecto de la tigeciclina sobre la actividad de la enzima COX durante la resistencia a bortezomib

Respecto a la intensidad de tinción producida en relación a la actividad de la enzima citocromo c oxidasa, se observó que las células JJN3 R al tratarlas con tigeciclina y/o su combinación con bortezomib, disminuían su expresión en comparación con las células control y con aquellas tratadas solo con bortezomib (ver figura 32b).

5.2.5.3. Efecto de la tigeciclina sobre el potencial de membrana mitocondrial durante la resistencia a bortezomib

En este experimento, la citometría solo se pudo llevar a cabo usando la sonda mitocondrial mitoTracker Red. La sonda para medir la abundancia mitocondrial no se pudo emplear ya que el fluorocromo FITC se excita con el láser verde, que presenta la misma longitud de onda para la excitación de GFP presente en la línea celular JJN3 R. Utilizando la sonda mitoTracker Red se pudo observar que la señal correspondiente al potencial de membrana mitocondrial en las células tratadas con bortezomib y tigeciclina disminuía ligeramente en comparación con las células control. En el caso de las células

tratadas con la combinación se producía una disminución más marcada en comparación con el control, encontrándose una bajada de aproximadamente el 50% (Figura 32c).

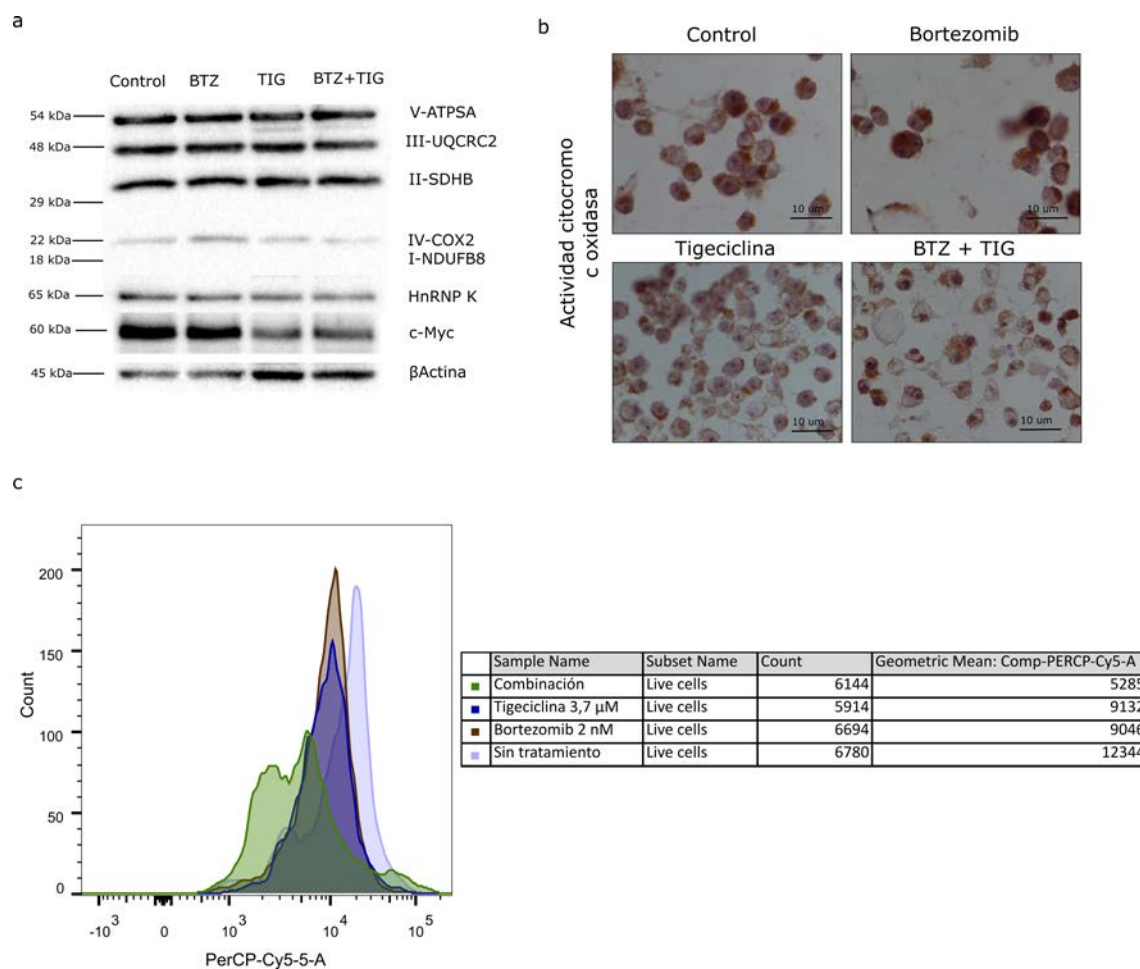


Figura 32.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 R con tigeciclina, bortezomib y su combinación. a) Western Blot (WB) con anticuerpos anti-OXPHOS, anti- HnRNP K y anti-c-Myc en la línea JJN3 R sin tratar, tratada con bortezomib, tratada con tigeciclina y tratada con la combinación de bortezomib y tigeciclina. La β actina se utilizó como control de carga del experimento ($N = 3$). b) Imágenes de los ensayos histoenzimáticos (objetivo 100X) representativos de cada condición, control, bortezomib, tigeciclina y combinación en la línea JJN3 R ($N = 3$). c) Histogramas con cada una de las condiciones estudiadas, se representan los cambios de intensidad de señal registrados para la sonda mitoTracker Red en las células JJN3 R control, tratadas con bortezomib, tratadas con tigeciclina y tratadas con la combinación ($N = 3$).

5.2.6. Efecto de la inhibición de c-Myc sobre la reprogramación mitocondrial

5.2.6.1. Caracterización de la inhibición de c-Myc en el modelo de estudio

Con el objetivo de averiguar si la regulación que se produce sobre c-Myc, al emplear un inhibidor mitocondrial como la tigeciclina, afecta directamente a la reprogramación mitocondrial, se llevaron a cabo una serie de estudios con el fármaco JQ1. Este compuesto, un inhibidor de bromodominio BRD4, se eligió porque su mecanismo de acción implica indirectamente la inhibición de los niveles de *MYC*. De esta forma, se puede estudiar el efecto de la inhibición de *MYC* independientemente de su regulación mitocondrial. Para ello, inicialmente se confirmó la sensibilidad a JQ1 de las líneas celulares bajo estudio, JN3 S y R (ver figura 33a). En ambas líneas se obtuvieron dosis de efectividad dentro del rango nanomolar. A continuación, en este caso solo en la línea sensible a bortezomib, se estudió si el efecto citotóxico del bortezomib mejoraba en combinación con JQ1. Los resultados de los estudios de dosis respuesta revelaron que las cinco dosis de JQ1 estudiadas en combinación de 2 nM de bortezomib, hacían disminuir significativamente la supervivencia de las células en comparación con aquellas solo tratadas en monoterapia con ambos fármacos. Los test t de Student realizados demostraron que existían diferencias significativas entre cada dosis estudiada en monoterapia en comparación con la misma dosis en combinación con 2 nM de bortezomib.

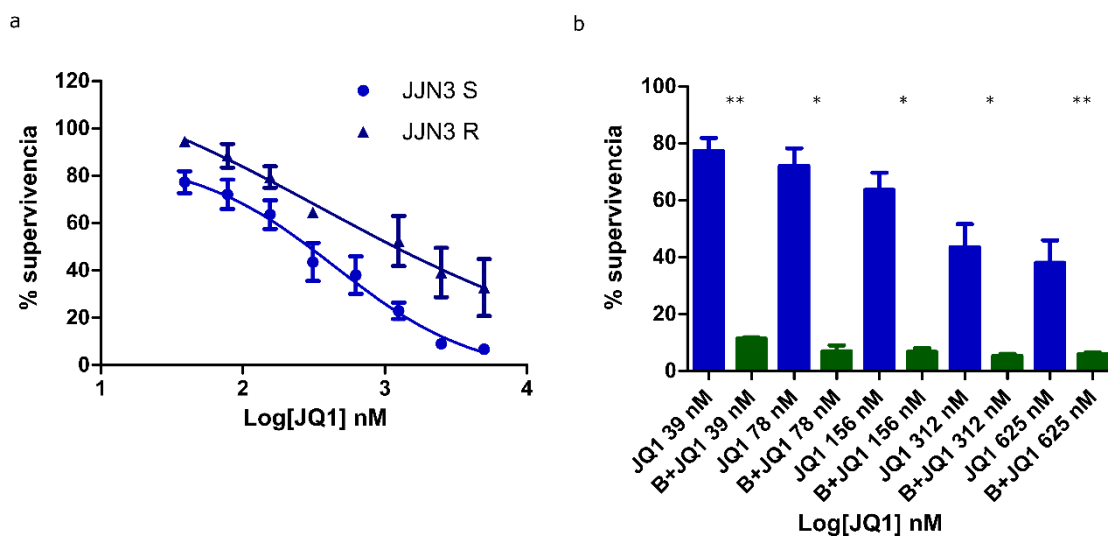


Figura 33.- Estudio de la inhibición de *c-Myc* con JQ1 en la línea celular JJN3. a) Representación gráfica de los experimentos dosis-respuesta a 48h en las líneas celulares JJN3 S ($IC_{50} = 445.9$ nM) y JJN3 R ($IC_{50} = 362.6$ nM) con JQ1. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE. b) Gráfico de barras que representa el % de supervivencia de las células JJN3 S expuestas durante 48h a los tratamientos, bortezomib solo o bortezomib en combinación con JQ1. $P < 0.05$ en todas las dosis estudiadas ($n=3$).

Por otro lado, se evaluó en la línea resistente a bortezomib si el tratamiento con JQ1 permite una mayor sensibilidad de las células al bortezomib tras 48h de sensibilización. Se observó que cuando se aplica una dosis de 78 o 156 nM de JQ1, las células pasan a ser ligeramente más sensibles al efecto del bortezomib (Figura 34).

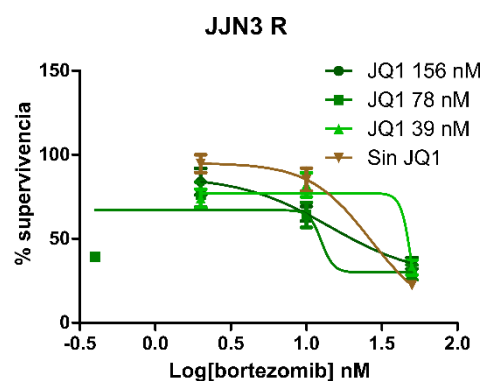


Figura 34.- Estudio de sensibilización de la línea celular JJN3 R con JQ1 en combinación con bortezomib. a) Gráfico dosis-respuesta correspondiente a los tratamientos de 48h en la línea JJN3 R con bortezomib, previamente expuestos durante 48h a tres dosis de JQ1. IC_{50} Bortezomib con JQ1 156 nM = 14.3 nM; IC_{50} Bortezomib con JQ1

78 nM = 12.5 nM; IC50 Bortezomib con JQ1 39 nM = 51.5 nM; IC50 Bortezomib sin tratamiento de JQ1 = 26.5 nM. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.6.2. Estudio de la actividad mitocondrial tras la inhibición de c-Myc

Los estudios funcionales de la actividad mitocondrial se dirigieron a verificar que la citotoxicidad producida por fármacos como JQ1, consecuencia de la inhibición de c-Myc, no tiene ninguna acción directa sobre la mitocondria. En primer lugar, se evaluó la expresión de los complejos de la cadena respiratoria por western blot, en las distintas condiciones descritas en la tabla 12. Tanto para la línea JLN3 sensible como resistente a bortezomib, la expresión de los complejos de la cadena respiratoria apenas varía para cada una de las condiciones estudiadas. En el caso de la expresión de c-Myc y HnRNP K en la línea sensible se observó una importante disminución de la expresión tanto en las células tratadas con JQ1 como con la combinación de bortezomib y JQ1. Para la línea JLN3 R la expresión de c-Myc se reduce ligeramente tras el tratamiento de JQ1 y/o su combinación con bortezomib. Mientras que la proteína HnRNP K no ve alterada su expresión en ninguna de las condiciones (Figura 35a).

Los ensayos histoenzimáticos dirigidos a analizar la actividad de la enzima COX en células JLN3 S y R demostraron que el tratamiento con JQ1 y/o su combinación con bortezomib no provocaban ningún cambio en la actividad de la enzima como se puede observar en las imágenes al microscopio de las cuatro condiciones bajo estudio de la figura 35b.

Finalmente se evaluó el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo en las mismas condiciones previamente estudiadas. La línea JLN3 sensible mostró un aumento de la expresión de la sonda mitocondrial tras el tratamiento con la combinación de bortezomib y JQ1. Sin embargo, con JQ1 en monoterapia no se observó ninguna diferencia (Figura 35c).

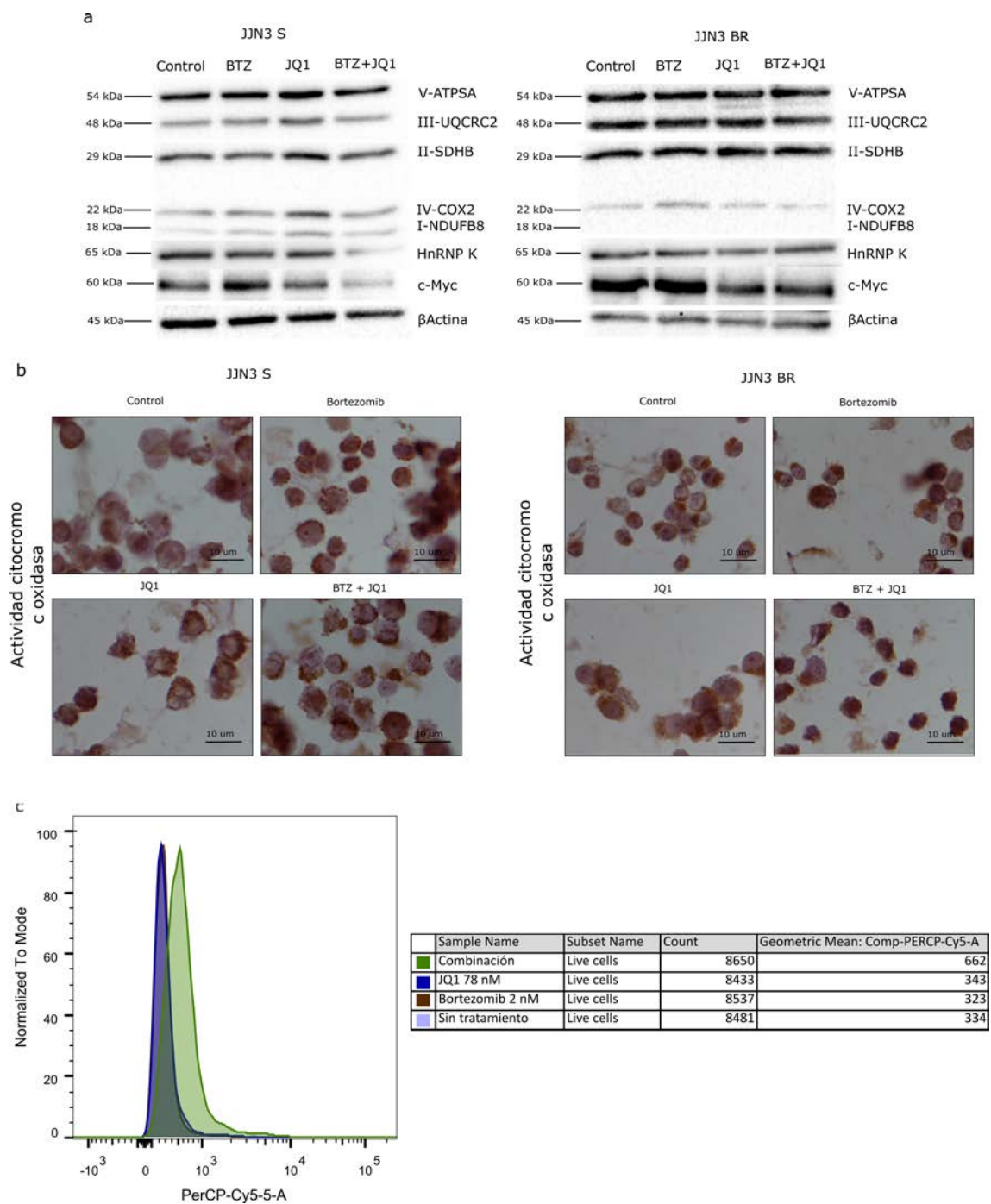


Figura 35.- Estudio de la actividad mitocondrial en las líneas celulares JJN3 y JJN3 R con bortezomib, JQ1 y su combinación. a) Western Blot (WB) con anticuerpos anti-OXPPOS, anti- HnRNP K y anti-c-Myc en las líneas JJN3 S y JJN3 R sin tratar, tratadas con bortezomib, tratadas con JQ1 y tratadas con la combinación de bortezomib y JQ1. La beta-actina se utilizó como control de carga del experimento (N = 3). b) Imágenes de los ensayos histoenzimáticos (objetivo 100X) representativos de cada condición, control, bortezomib, JQ1 y combinación en las líneas JJN3 S y R (N = 3). c) Histogramas con cada una de las condiciones estudiadas, se representan los cambios de expresión registrados para la sonda mitoTracker Red en las células JJN3 S control, tratadas con bortezomib, tratadas con JQ1 y tratadas con la combinación (N = 3).

5.2.6.3. Estudios de sensibilización: tigeciclina y JQ1.

De forma complementaria a los estudios enfocados a validar el efecto de c-Myc, se investigó el potencial beneficio del uso de la tigeciclina previo a la exposición al fármaco JQ1, permitiendo que las células respondan a dosis más bajas de este fármaco. Los ensayos de dosis respuesta demostraron que la línea JJN3 S cuando había sido tratada con 11 μM de tigeciclina, las células eran 3.2 veces más sensibles a JQ1 que las células que no habían sido sensibilizadas durante 48 h con tigeciclina, ver figura 36a. Además, en el caso de la línea resistente, JJN3 R, se vio que cuando se trataban las células 48 h con 3.7 μM de tigeciclina, luego eran 2.2 veces más sensibles al efecto de JQ1 (Figura 36b).

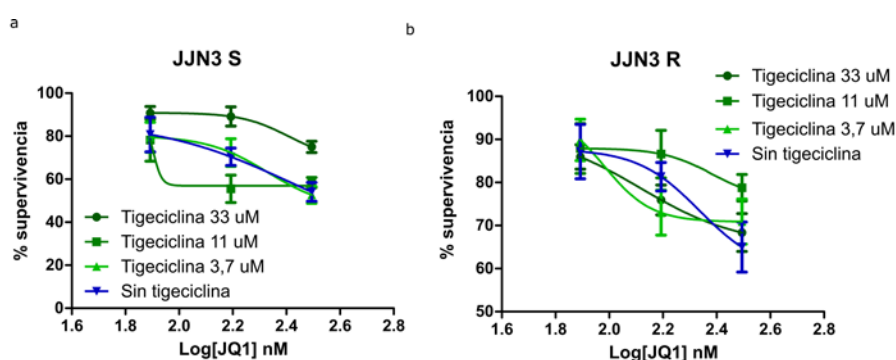


Figura 36.- Estudio de sensibilización de las líneas celulares JJN3 y JJN3 R con tigeciclina en combinación JQ1. a) Gráfico dosis-respuesta correspondiente a los tratamientos de 48h en la línea JJN3 S con JQ1, previamente expuestos durante 48h a tres dosis de tigeciclina. $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 33 μM = 254 nM; $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 11 μM = 80 nM; $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 3.7 μM = 214 nM; $IC_{50} JQ1$ sin tratamiento de tigeciclina = 257 nM. b) Gráfico dosis-respuesta correspondiente a los tratamientos de 48h en la línea JJN3 R con JQ1, previamente expuestos durante 48h a tres dosis de tigeciclina. $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 33 μM = 130.9 nM; $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 11 μM = 238.9 nM; $IC_{50} JQ1$ con tigeciclina 3.7 μM = 95.57 nM; $IC_{50} JQ1$ sin tratamiento de tigeciclina = 216.4 nM. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.7. Estudio del efecto de la tigeciclina sobre el receptor CD38

El receptor de membrana CD38, conocido en MM por estimular OXFOS y en consecuencia aumentar la carga mitocondrial de las células de MM (102), fue evaluado en este estudio. Con el objetivo de averiguar si un inhibidor mitocondrial como la tigeciclina podría estar produciendo su efecto a través de la regulación de la expresión de CD38, se llevaron a cabo una serie de estudios con el fármaco daratumumab, anticuerpo monoclonal anti-CD38.

5.2.7.1. Ensayos dosis-respuesta y de lisis: daratumumab y tigeciclina

Para dar respuesta sobre el papel que juega CD38 en la inhibición mitocondrial, se procedió a trabajar con la línea celular RPMI-8226, ya que línea celular JJN3 no expresa dicho receptor. Inicialmente se realizaron estudios de dosis respuesta para evaluar la citotoxicidad de los fármacos daratumumab y tigeciclina sobre la línea CD38+, RPMI-8226. Como se aprecia en la figura 37a, se obtiene un dato aproximado del valor de IC50, siendo la curva de dosis respuesta a daratumumab prácticamente plana. Esto es debido a que este fármaco necesita la presencia de células efectoras (NK, linfocitos T) para ejercer su mecanismo de acción sobre las células plasmáticas. En el caso de la tigeciclina, al ser un fármaco cuyo mecanismo de acción no depende exclusivamente de la presencia de células efectoras, el resultado del ensayo dosis-respuesta reveló que las células tratadas presentaban una IC50 dentro del mismo rango de diluciones que la obtenida con la línea celular JJN3 (IC50= 32.7 μ M). A continuación, se evaluó el efecto citotóxico de ambos fármacos en presencia de células efectoras, en concreto células mononucleares de sangre periférica (en inglés, peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) de donantes sanos. Las células tratadas con diluciones seriadas de daratumumab en presencia de células efectoras 1:10, como se indican en la tabla 12, reflejaron que la dosis para la cual se obtiene un 50% de lisis es de 8 μ g/ml. Para las células tratadas con tigeciclina se observó que la dosis para la cual se obtiene un 50% de lisis es parecida a la que resulta del estudio de dosis-respuesta (29,9 μ M) (Figura 37b).

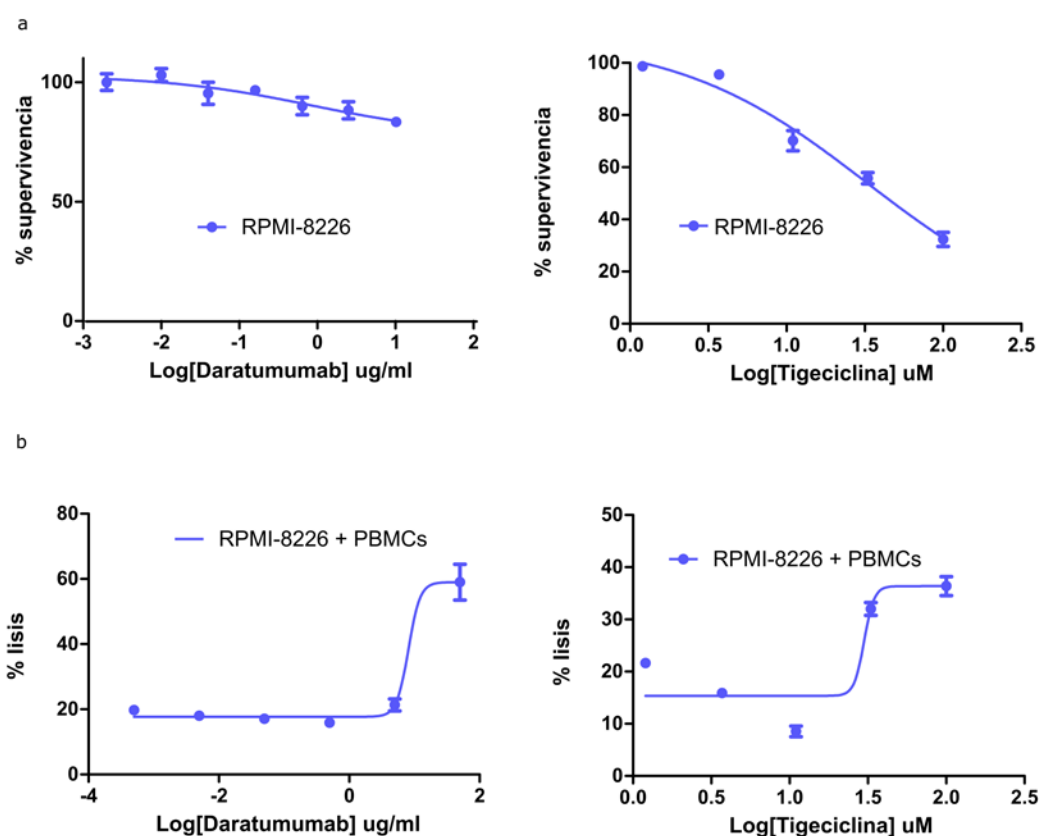


Figura 37.- Estudio de lisis y de dosis respuesta con daratumumab y tigeciclina en la línea celular RPMI-8226. a) Representación gráfica de los experimentos dosis-respuesta a 48h en la línea celular RPMI-8226 con daratumumab (izquierda) y con tigeciclina (derecha) ($n=3$). b) Representación gráfica de los ensayos de lisis en presencia de células efectoras (PBMCs) (Ratio 1:10) con las curvas correspondientes al tratamiento de 48 h con daratumumab (izquierda) o con tigeciclina (derecha) ($n=3$). Cada experimento se repitió al menos tres veces. Datos normalizados respecto al control negativo (DMSO) y representados como valores medios \pm EE.

5.2.7.2. Efecto de la tigeciclina sobre la expresión de CD38

A continuación, se estudió por citometría la variación en la expresión de CD38, en células RPMI-8226 tratadas con daratumumab o tigeciclina, en presencia o ausencia de células efectoras, en ratio 1:10. El tratamiento con anti-CD38 (control positivo), provocó una reducción de la expresión de CD38 tanto en las células que habían sido tratadas tanto en presencia como en ausencia de células efectoras (Figura 38).



Figura 38.- Estudio de la inhibición de CD38 con daratumumab en presencia o ausencia de PBMCs en la línea celular RPMI-8226. Histogramas que representan los cambios de expresión registrados para CD38-FITC en las células RPMI-8226 control y tratadas con daratumumab, en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de células efectoras (PBMCs) (N = 3).

Además, cuando las células se trataron con tigeciclina en presencia de células efectoras, se registró una bajada en la expresión de CD38. Sin embargo, los tratamientos con tigeciclina en ausencia de células efectoras hicieron que la expresión de CD38 solo se viera ligeramente disminuida (Figura 39).

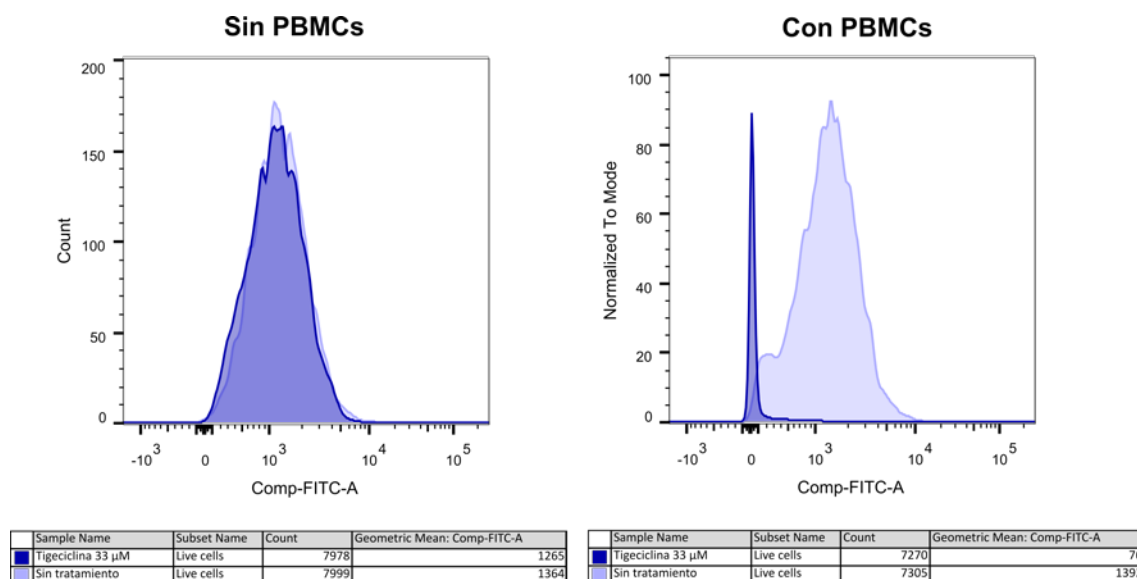


Figura 39.- Estudio de la inhibición de CD38 con tigeciclina en presencia o ausencia de PBMCs en la línea celular RPMI-8226. Histogramas que representan los cambios de expresión registrados para CD38-FITC en las células RPMI-8226 control y tratadas con tigeciclina, en ausencia (izquierda) o en presencia (derecha) de células efectoras (PBMCs) (N = 3).

5.2.7.3. Efecto de la inhibición de CD38 sobre la actividad mitocondrial

Como en el caso de JQ1, los estudios funcionales de la actividad mitocondrial se dirigieron a verificar que la citotoxicidad producida por fármacos como daratumumab, consecuencia de la inhibición de CD38, no tiene ninguna acción directa sobre la mitocondria. Para poder comparar con el efecto producido por la tigeciclina se analizó también su efecto sobre la línea celular RPMI-8226, ya que en esta línea no había sido estudiada previamente. Los estudios de la expresión de las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria y de c-Myc se evaluaron por western blot. Las células tratadas con daratumumab presentaron un aumento de la expresión de todos los complejos de la cadena respiratoria, a excepción del complejo V, el cual aparecía ligeramente disminuido. Respecto al tratamiento con tigeciclina, las células mostraron un aumento de expresión de los complejos II y IV, mientras que los otros tres aparecen similares al control (Complejo I) o disminuidos (complejos III y V). También se analizó la expresión de c-Myc, observándose que el tratamiento de daratumumab provoca una disminución de la expresión de c-Myc. Y, acorde a lo observado con la línea JN3 S, las células RPMI también disminuyeron la expresión de c-Myc tras tratarlas con tigeciclina (Figura 40a).

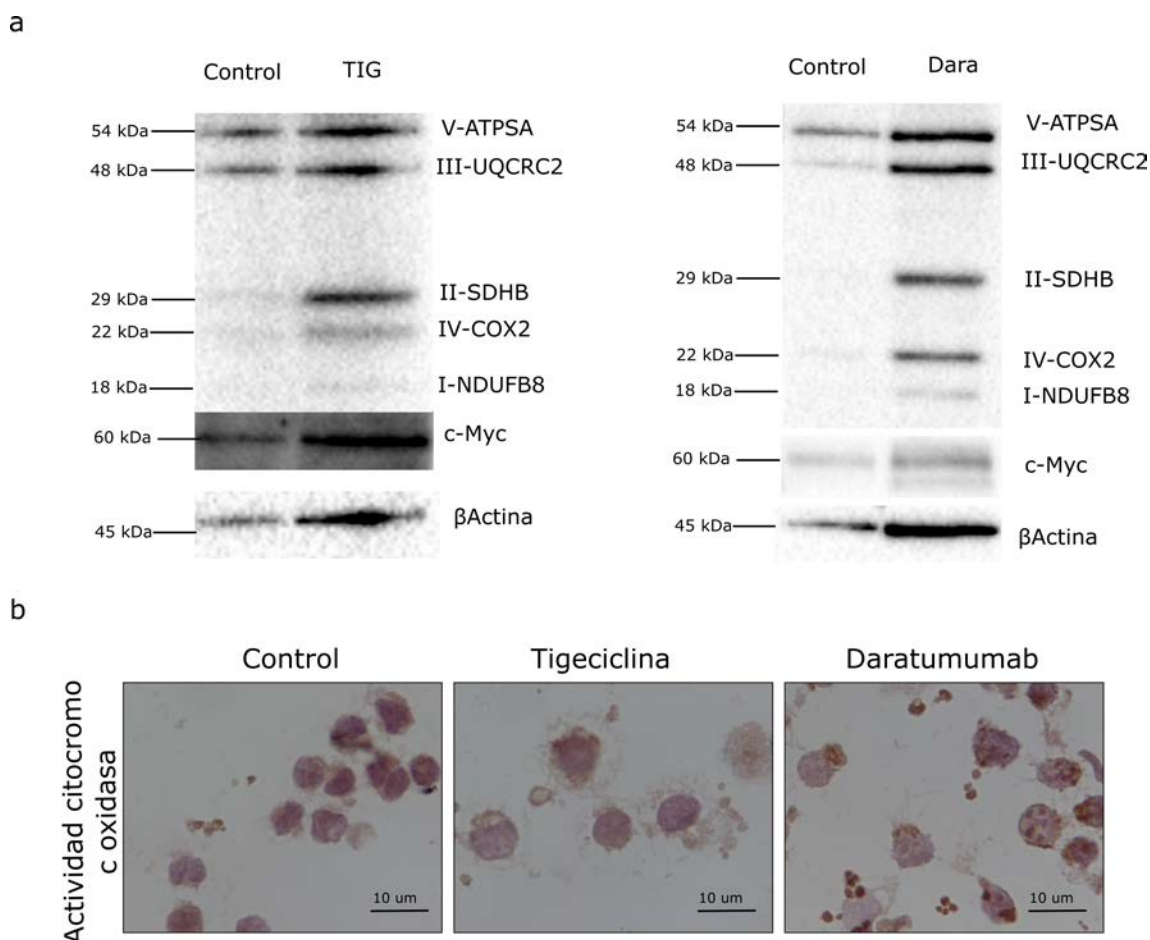


Figura 40.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con tigeciclina y daratumumab por western blot y por histoenzimática de COX. a) Western Blot (WB) con anticuerpos anti-OXPPOS y anti-c-Myc en la línea RPMI sin tratar y tratada con tigeciclina (izquierda) o con daratumumab (derecha). La β actina se utilizó como control de carga de los experimentos ($N = 3$). b) Imágenes de los ensayos histoenzimáticos (objetivo 100X) representativos de cada condición, control, tigeciclina y daratumumab en la línea RPMI-8226 ($N = 3$).

Los estudios de la actividad enzimática de COX en células tratadas con daratumumab mostraron un aumento de la tinción en comparación con las células control. Sin embargo, en cuanto a las células tratadas con tigeciclina se observó que, al igual que sucedía con la línea JJN3 S, la tinción de COX disminuía (Figura 40b). Respecto al potencial de membrana mitocondrial analizado por citometría de flujo, se vio que la condición con el tratamiento de daratumumab sin células efectoras no reducía la expresión de la sonda mitoTracker Red. (Figura 41).

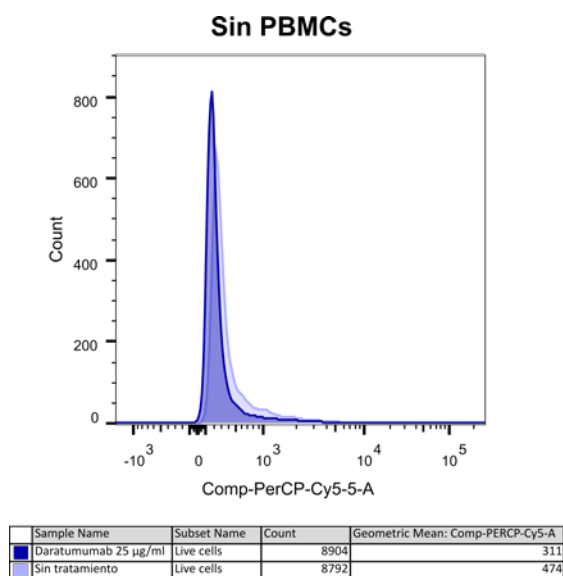


Figura 41.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con daratumumab por citometría de mitoTracker Red. Histogramas que representan los cambios de expresión registrados para mitoTracker Red en las células RPMI-8226 control y tratadas con daratumumab, en ausencia de células efectoras (PBMCs) ($N = 3$).

Los datos obtenidos con tigeciclina corroboraron que la línea celular RPMI-8226 sufre los mismos efectos a nivel de potencial de membrana mitocondrial que las líneas JN3 S y R, ya que la expresión de esta sonda se encontró disminuida en las células tratadas con tigeciclina, ver figura 42.

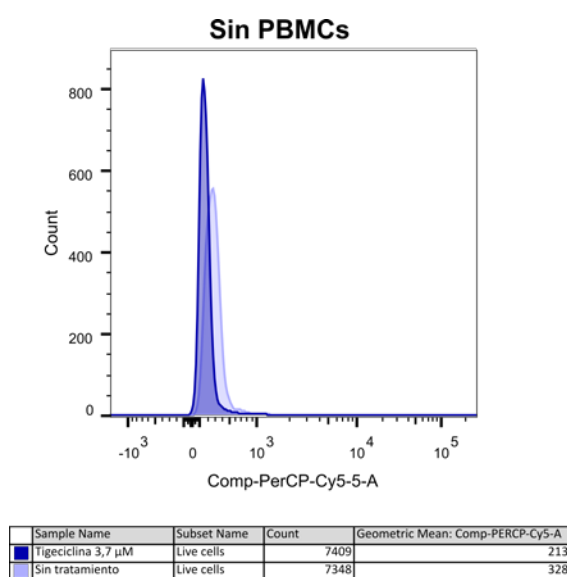


Figura 42.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con tigeciclina por citometría de mitoTracker Red. Histograma que representa los cambios de expresión registrados para mitoTracker Red en las células RPMI-8226 control y tratadas con tigeciclina) (N = 3).

5.2.8. Estudio del mecanismo molecular responsable de la citotoxicidad de la tigeciclina mediado por células efectoras

Los resultados previamente descritos indican que la tigeciclina aumenta la muerte celular mediada por células efectoras. Para analizar qué mecanismo puede estar siendo responsable de este aumento de citotoxicidad de la tigeciclina en presencia de células efectoras, se hizo una búsqueda para evaluar la expresión de los siguientes ligandos en las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226:

5.2.8.1. Ligandos de NKG2D: MIC A/B, ULBP 1, ULBP 2/5/6, ULBP3.

Se analizó la expresión de siete ligandos de NKG2D a través de una combinación de cuatro anticuerpos (MIC A/B, ULBP 1, ULBP 2/5/6, ULBP3), para determinar si su expresión se ve influida por el tratamiento con tigeciclina. Los resultados no fueron concluyentes, pues en la línea JJN3 se observó un ligero aumento de la expresión de estos ligandos en conjunto mientras que en la línea RPMI-8226 la expresión disminuía, ver figura 43.

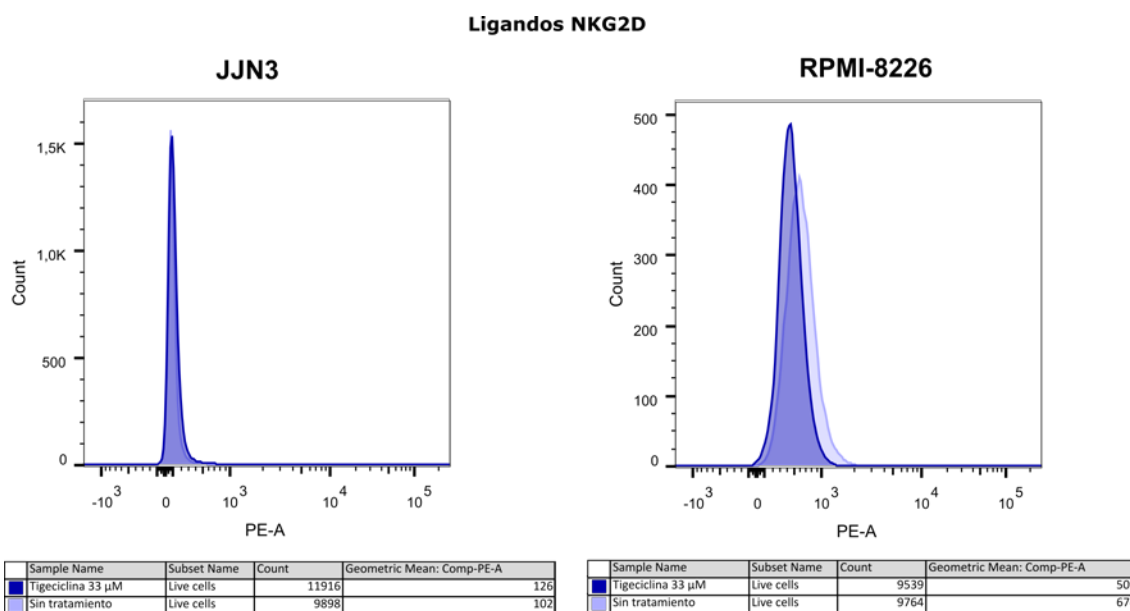


Figura 43.- Expresión de los ligandos de NKG2D en PE tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 µM de tigeciclina.

5.2.8.2. Ligandos virales: CD155, CD112.

En el caso de la expresión de los ligandos CD155 y CD112 se utilizó una combinación de anticuerpos en el mismo fluorocromo para reconocer. Se obtuvieron resultados opuestos en cada una de las líneas analizadas. La línea celular JJN3 al tratarla con tigeciclina mostraba que estos ligandos disminuían su expresión; mientras que en la línea RPMI-8226 se observó que la expresión de los ligandos aumentaba (Figura 44).

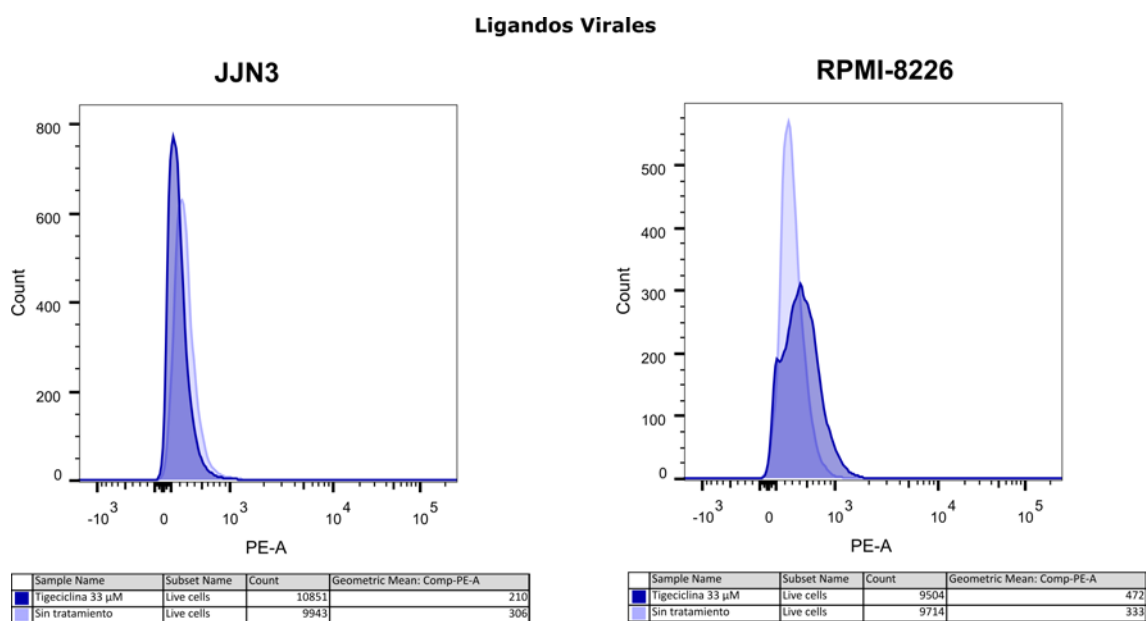


Figura 44.- Expresión de los ligandos virales CD155 y CD112 en PE tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 µM de tigeciclina.

5.2.8.3. HLA-E

La expresión de este péptido, Complejo mayor de histocompatibilidad clase I E, que se une a receptores de las células NKs, se encontró disminuido en la línea JJN3 tras el tratamiento con tigeciclina. En la línea RPMI-8226, sin embargo, se observó un aumento en la expresión de HLA-E, ver figura 45.

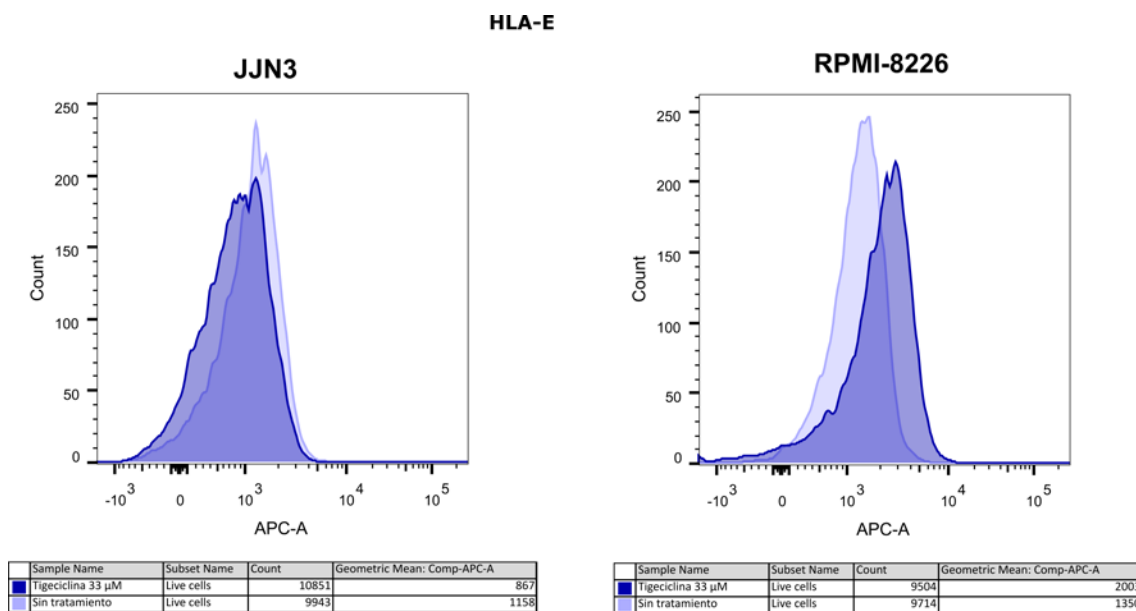


Figura 45.- Expresión de HLA-E en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 µM de tigeciclina.

5.2.8.4. Ligandos de apoptosis: FAS, TRAIL-DR4, TRAIL-DR5.

El estudio de estos tres ligandos de apoptosis reveló una disminución de la expresión en ambas líneas estudiadas tras el tratamiento con tigeciclina como se representa en la gráfica 46.

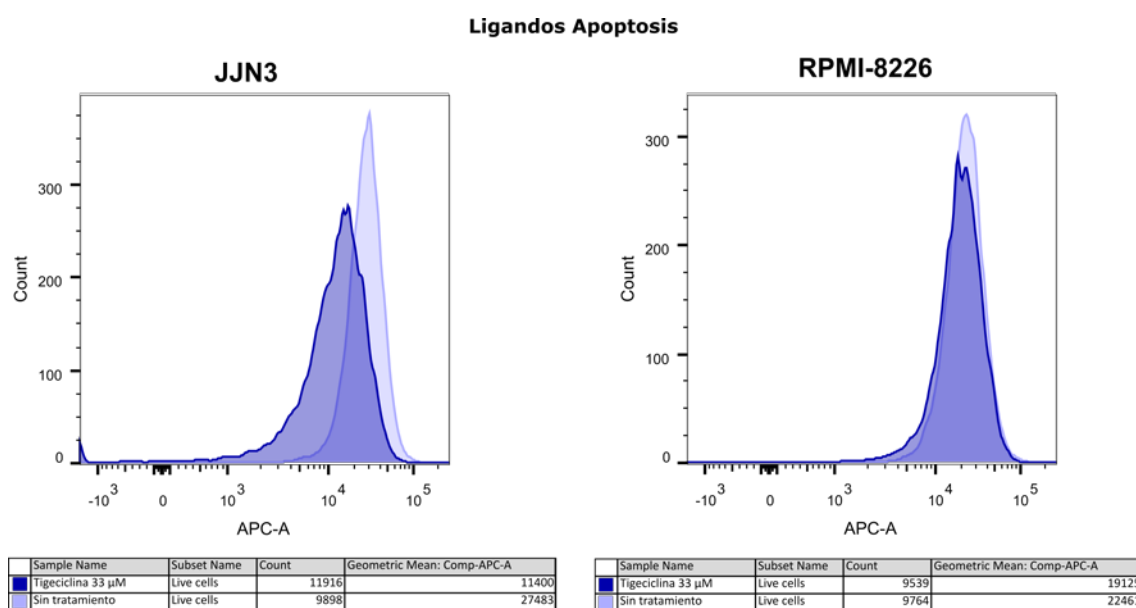
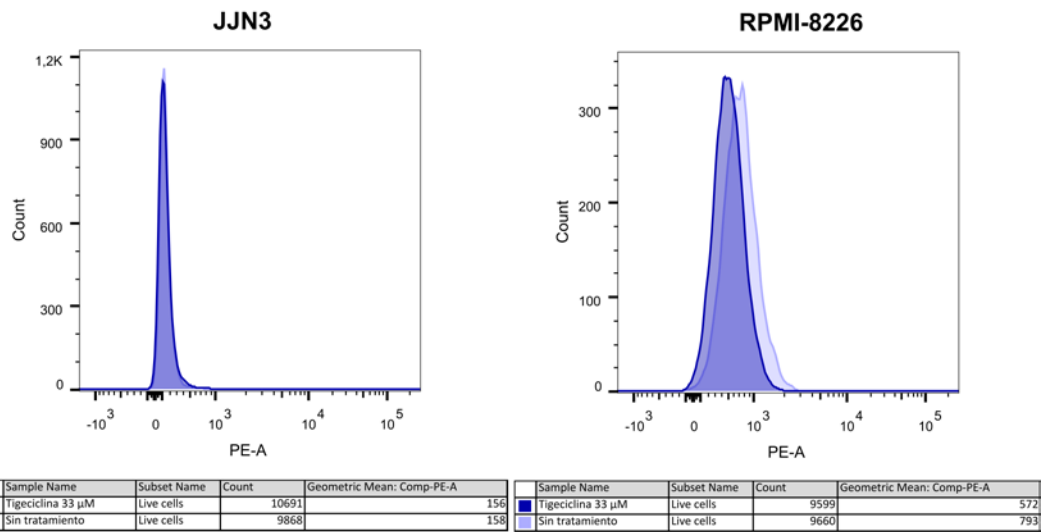


Figura 46.- Expresión de los ligandos de apoptosis en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JLN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

5.2.8.5. Ligandos de muerte celular programada (Programmed cell death ligands): PD-L1, PD-L2.

Tras observar que en ninguno de los ligandos anteriores se encontraba una tendencia clara que justificara el aumento de citotoxicidad en presencia de células efectoras, se finalizó con el estudio de los ligandos de muerte celular programada o PD-L1 y 2. En este caso, los resultados mostraron una tendencia, es decir, en ambas líneas tras someterlas al tratamiento de tigeciclina se produjo una disminución en la expresión de ambos ligandos (Figura 47).

PD-L1



PD-L2

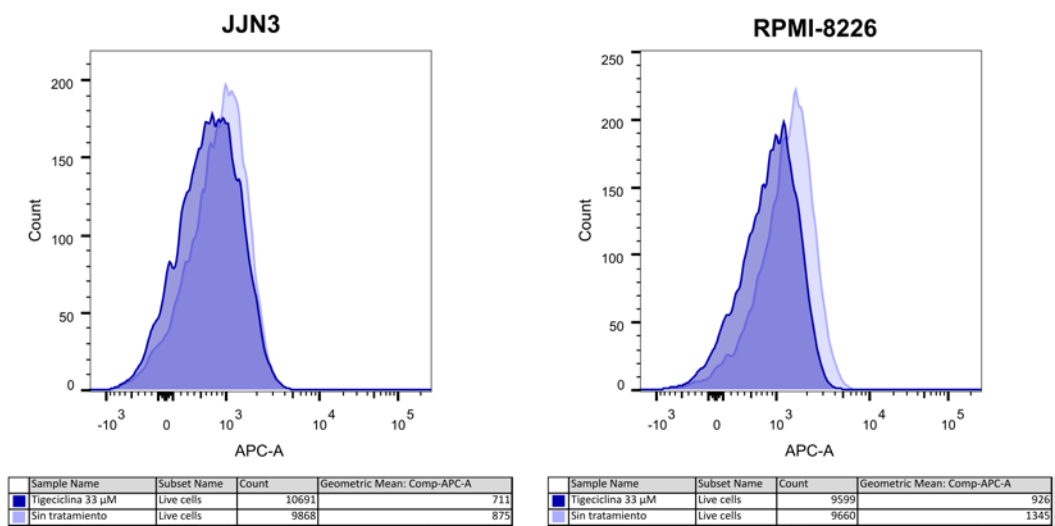


Figura 47.- Expresión de los ligandos PD-L1 en PE y PD-L2 en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JYN3 y RPMI-8226 con 33 µM de tigeciclina.

5.3. ESTUDIO *EX VIVO*

Con el fin de verificar la eficacia de la tigeciclina, tanto en monoterapia como en combinación con bortezomib en células plasmáticas de pacientes con MM, se procedió a realizar un experimento *ex vivo*. De esta forma, tanto células de médula ósea recién extraídas de pacientes con GMSI (n=1) como con MM (n=3) se sometieron a las distintas condiciones de tratamiento bajo estudio; bortezomib a 2 nM, tigeciclina a 3,7 μ M y la combinación de ambos fármacos. Al evaluar el porcentaje de células plasmáticas totales CD38+/CD138+ vivas tras la exposición a los tratamientos durante 48h, se detectó la misma tendencia observada en las líneas celulares, es decir, la tigeciclina provocó citotoxicidad por sí sola, reduciendo alrededor de un 40% la población. Además, su combinación con bortezomib aumentó la citotoxicidad respecto al uso de bortezomib en monoterapia, obteniéndose supervivencias cercanas al 50% (ver figura 48 a y b). Además, se pudo estudiar la expresión de la sonda mitoTracker Red en las distintas condiciones, revelándose que las células primarias de pacientes con MM tratadas con tigeciclina y /o su combinación con bortezomib reflejaban una disminución del potencial de membrana mitocondrial mientras que las células de pacientes con GMSI no mostraban ningún cambio sustancial (Figura 48c).

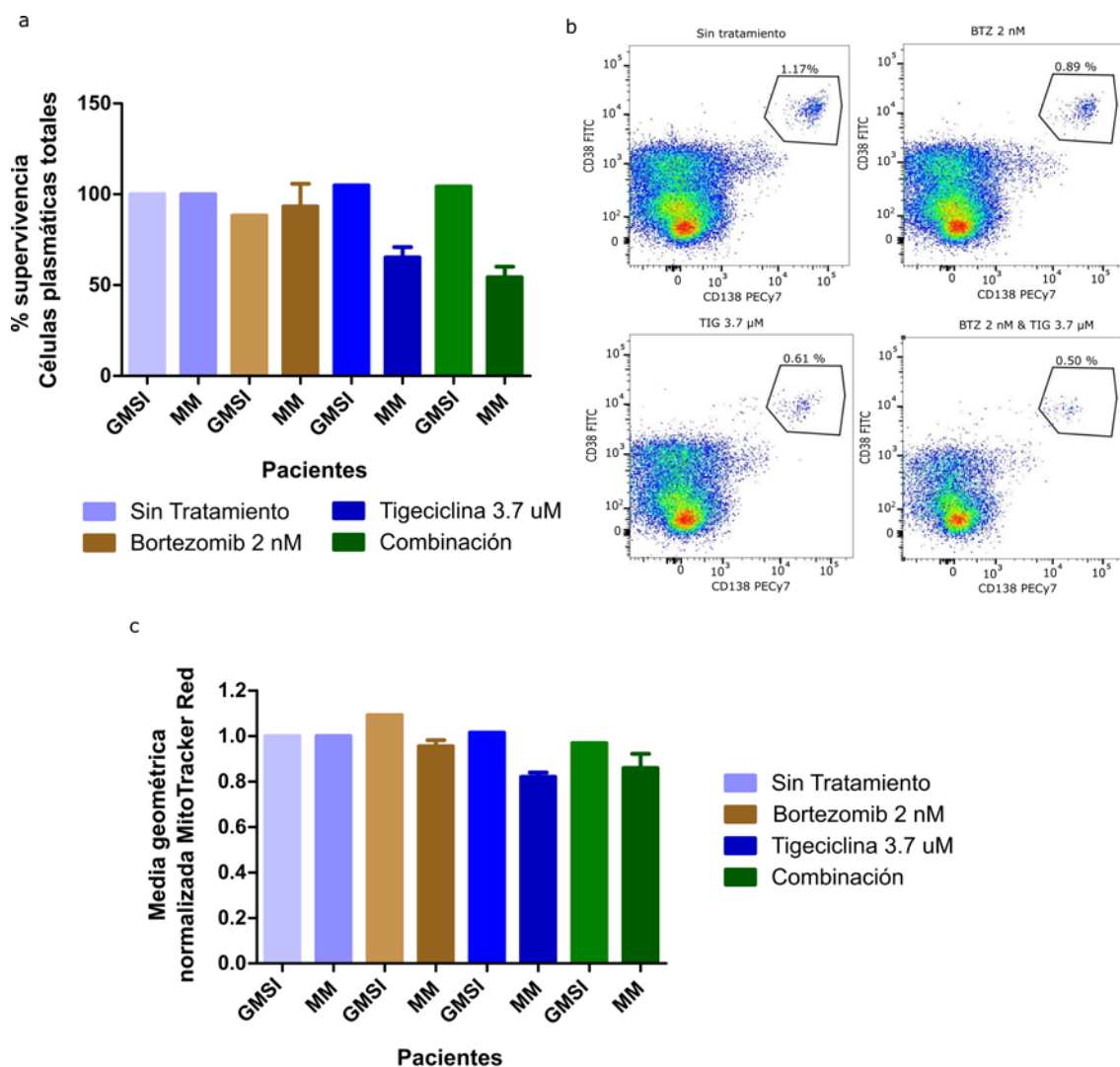


Figura 48.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeciclina ex vivo con células primarias de pacientes con GMSI y MM. a) Gráfico de barras con los porcentajes de supervivencia de la población de células plasmáticas CD38+/CD138+ tras los tratamientos durante 48h. b) Dot plot representativo que muestra el porcentaje de células CD38+/CD138+ de un paciente de MM tras su tratamiento con bortezomib, con tigeciclina/o con la combinación de ambos durante 48hc) Gráfico de barras con la media geométrica de la expresión del MitoTracker Red tras la incubación de los tratamientos 48h.

5.4. ESTUDIO *IN VIVO*

Después de analizar los datos de los estudios *in vitro* y *ex vivo*, se procedió a validar la eficacia de la tigeciclina sola o en combinación en un modelo *in vivo* de MM. Con el fin de modelar el efecto terapéutico anti-mieloma de la tigeciclina se generó un modelo animal con alta actividad mitocondrial, que permite recapitular la agresividad de la enfermedad. Para ello se realizó un xenoinjerto con un millón de células de la línea JLN3-ffLuc-GFP en ratones NSG hembras, como se describe en el apartado 4.2.14. Acorde a la prueba piloto en la que se valoró el éxito del injerto sin necesidad de someter a los animales a irradiación, se determinó que para llevar a cabo el experimento se podía prescindir de irradiar a los animales puesto que estos desarrollaron el mieloma tal y como se había descrito previamente con irradiación. A continuación, para comprobar la efectividad del tratamiento se evaluó semanalmente la progresión de la enfermedad mediante la cuantificación de la señal luminiscente obtenida de la imagen *in vivo*. Finalmente se analizó la supervivencia en cada grupo de tratamiento.

5.4.1. Bioluminiscencia

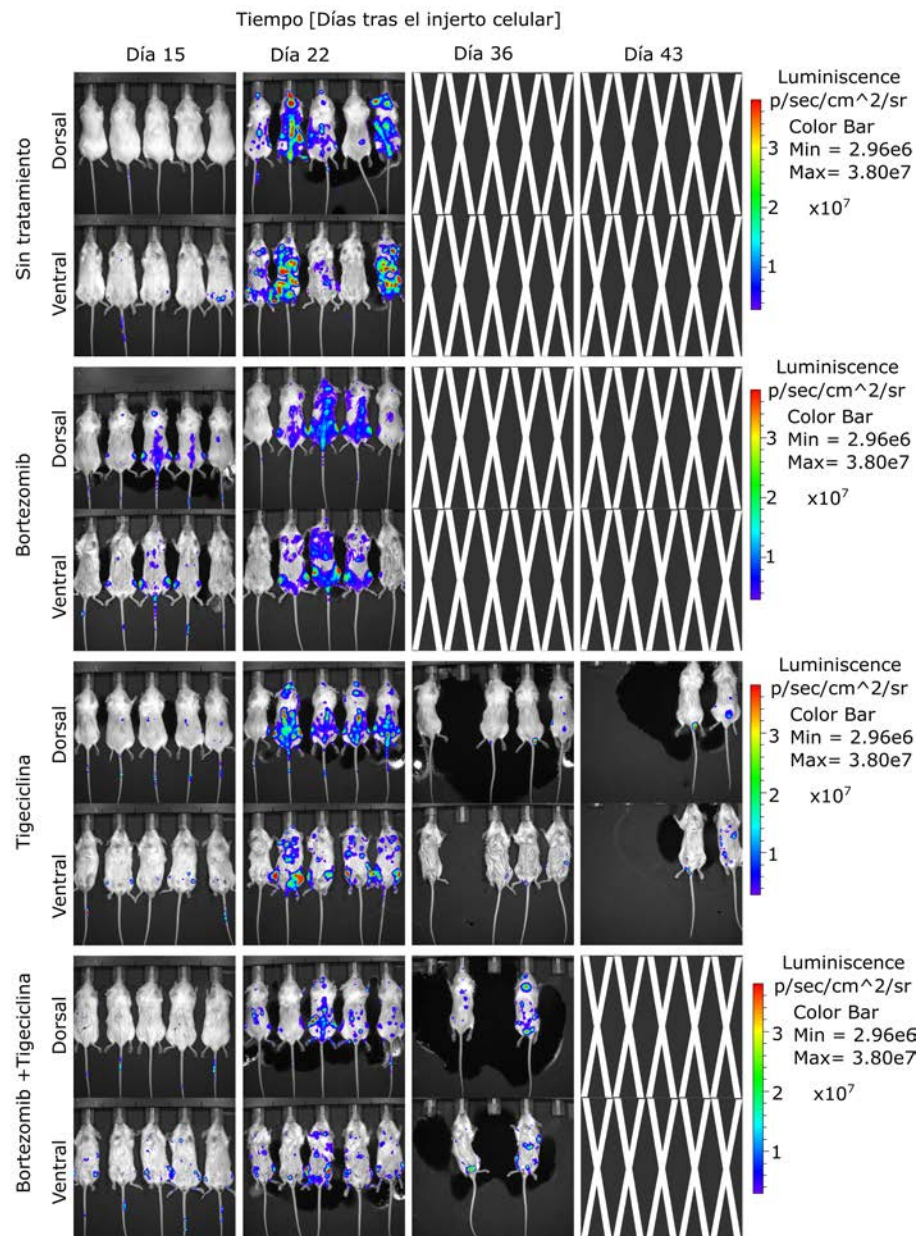
Los estudios semanales de imagen *in vivo* se examinaron para determinar las variaciones en la señal luminiscente de cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo (6 semanas). Los resultados obtenidos muestran como la tigeciclina y la combinación con bortezomib inhiben la proliferación de las células tumorales en comparación con el grupo de ratones control y el grupo de los tratados con bajas dosis de bortezomib (Figura 49a).

5.4.2. Curva de supervivencia

Acorde a los resultados de bioluminiscencia, el estudio de la supervivencia reveló que los animales tratados con tigeciclina y/o su combinación con bortezomib alcanzaban unas supervivencias medias de 31 y 33 días respectivamente en comparación con los 27 y 25.5 días registradas en los grupos control y en los tratados únicamente con bortezomib, como se observa en la figura 49b. Además, los análisis estadísticos demostraron que el

aumento de la supervivencia de los grupos tratados con tigeciclina, tanto sola como en combinación, es significativo respecto al grupo control (Control - tigeciclina $p = 0.0004$; control - combinación $p = 0.02$) y al grupo tratado sólo con bortezomib (Bortezomib - tigeciclina $p = 0.0001$; bortezomib – combinación $p = 0.01$).

A



b

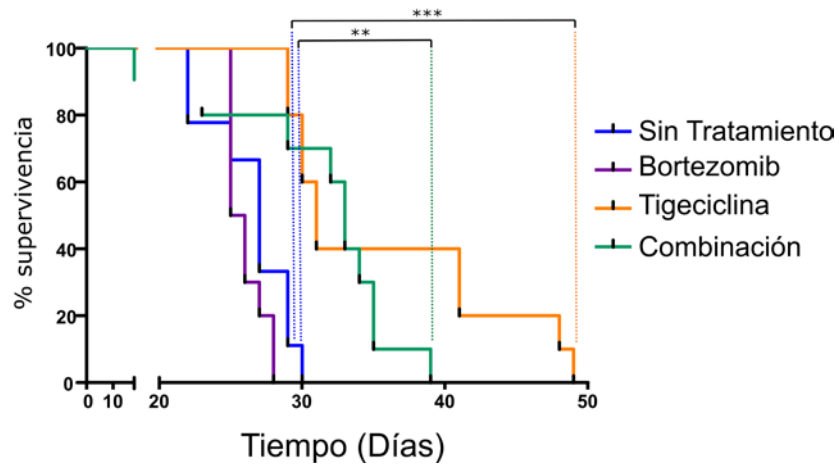


Figura 49.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeciclina in vivo en ratones NSG injertados con la línea JN3-*flLuc-GFP*. a) Tabla con las imágenes de bioluminiscencia dorsales y ventrales obtenidas de cada grupo de tratamiento en 4 momentos temporales del experimento (día 15, 22, 36 y 43). b) Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones NSG (n=40) expuestos a los cuatro condiciones de tratamiento bajo estudio. Se representa la significación estadística entre los grupos control-tigeciclina (** $p = 0.0004$) y control-combinación (** $p = 0.02$).

6. DISCUSIÓN

El Mieloma Múltiple, es un tumor hematológico que se caracteriza por presentar un metabolismo aberrante, cuya energía se obtiene fundamentalmente por la glucólisis (94). Para su proliferación, las células plasmáticas presentan un comportamiento errático, determinado por el metabolismo mitocondrial, un mecanismo biológico muy bien caracterizado en el contexto de apoptosis (122), pero apenas estudiado en cuanto a la actividad mitocondrial en la evolución de la enfermedad del MM.

6.1. ELEVADA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE.

Los datos obtenidos de muestras de pacientes tanto, en estadios pre-malignos (GMSI o SM) como en el momento de diagnóstico de la enfermedad como en las recaídas, representan la primera caracterización de la actividad mitocondrial y su implicación en la progresión del mieloma múltiple. De forma que el estudio llevado a cabo ha permitido establecer los niveles de expresión de ciertas moléculas implicadas en dicha actividad mitocondrial tanto a nivel génico, proteico como funcional según progresa la enfermedad.

Previamente, ha sido descrito que otros tumores hematológicos como la leucemia mieloide aguda, presentan una alteración de la biogénesis mitocondrial debida al aumento de expresión de genes como *MYC*, *TFAM*, *TUFM* y *NRF1*, pudiendo suponer una nueva vulnerabilidad en el tratamiento de la enfermedad (87). En este trabajo, los genes *MYC*, *HNRNPK*, *TFAM*, *TUFM*, *NRF1* y *COXII*, mostraron la misma tendencia de aumento de los niveles de expresión, es decir, se ha encontrado que su expresión se encuentra más elevada en muestras de pacientes con MM al diagnóstico o en recaída que en pacientes en uno de los estadios pre-malignos, como son GMSI o SM. Estas conclusiones se pueden extraer en base a los hallazgos encontrados en los tres estudios realizados a nivel génico en este trabajo; como son el análisis de datos obtenidos del repositorio COMMPASS, de la base canEvo y de los pacientes del Hospital 12 de Octubre.

En concreto, los análisis de expresión de RNAseq reportados sobre los genes *MYC*, *COXII*, *TUFM*, *NRF1* o *HNRNPK* en 770 pacientes con MM de la base de datos COMMPASS (Fig. 12a) demuestran que una elevada expresión de estos genes se encuentra directamente relacionada con una menor supervivencia libre de progresión. Por

otro lado, los resultados obtenidos de la base canEvolve han permitido detectar que el aumento de expresión de los genes *TFAM*, *TUFM*, *MYC*, *HNRNPK* y *NRF1* se produce según progresa el mieloma. De esta forma, se ha verificado que la expresión de dichos genes es significativamente mayor en pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico o MM en recaída que en sujetos sanos; incluso que la expresión en los pacientes en recaída y al diagnóstico es mayor que en pacientes en estadios pre-malignos; con que es la primera vez que se evidencia el aumento de los niveles de expresión de los genes *TUFM*, *HNRNPK*, *NRF1* y *COXII* en el MM. Por otro lado, se ha permitido validar los niveles de expresión de *MYC* y *TFAM*. De hecho, acorde a los resultados obtenidos, está descrito que *MYC* estimula la biogénesis mitocondrial (123) y los pacientes de mieloma que presentan alteraciones genéticas de *MYC* muestran un peor pronóstico (112). Además, el aumento de *TFAM* y *MYC* ha sido recientemente descrito en la progresión del mieloma (104), tal y como se observa en las cohortes estudiadas de pacientes en recaída.

Los estudios llevados a cabo por qPCR con muestras de pacientes del Hospital 12 de Octubre, reflejan la misma tendencia de aumento de expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *HNRNPK* y *NRF1* según progresa la enfermedad, sobre todo en las muestras de recaídas. De esta manera, la baja expresión detectada en los casos de los genes *TUFM* y *TFAM* en los pacientes al diagnóstico en comparación con los niveles de expresión de pacientes con GMSI, parece deberse a que en los pacientes de este grupo ya existan alteraciones de la expresión con respecto a la situación normal (Figura 17a-b). Para este tipo de técnica no se ha podido obtener suficiente calidad de muestra procedente de donantes mediante los métodos de extracción de ADN/ARN, ya que el número de células plasmáticas CD138+ purificadas es muy reducido; ello se debe a que la presencia de estas células de forma fisiológica en médula ósea es inferior al 1%. Otra de las razones por las que se atribuye la detección de reducidos niveles de expresión en los pacientes al diagnóstico, puede deberse a la amplia heterogeneidad de las muestras, ya que los valores de desviación obtenidos en los genes *TUFM* y *TFAM* muestran un amplio intervalo, siendo la media \pm desviación típica de 0.55 ± 0.44 para el gen *TUFM* y de 0.7 ± 0.32 para el gen *TFAM*. Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral, no podemos descartar que dichas diferencias existan en los pacientes en recaída al compararlos con pacientes con GMSI (n=7 en recaída y n = 9 con GMSI). Respecto a los niveles de expresión de los genes *NRF1* y *HNRNPK* (Figura 17d-e), se ha registrado una ligera tendencia de aumento de expresión según progresa la enfermedad. Sin embargo, no se detectan diferencias

significativas entre los distintos estadios; de nuevo, pudiéndose deber al reducido número de muestras empleadas. En el caso del gen *MYC* (Figura 17c), la expresión por qPCR no mostraba diferencias entre los grupos; sin embargo, al comparar muestras de pacientes con SM, de MM al diagnóstico y en recaída con pacientes GMSI, sí que se evidenciaban esas diferencias. De hecho, se pudo analizar la supervivencia libre de progresión por SPSS respecto a los niveles de expresión de *MYC* (Figura 18), revelando que existe una menor supervivencia de los pacientes con alta expresión del gen, tal y como se había constatado en los resultados del análisis del COMMPASS. En este trabajo, además, se puede confirmar que la reducción de la supervivencia en función de la elevada expresión de *MYC*, se produce en los cuatro momentos de la enfermedad evaluados (GMSI, SM, DX y REC).

Estudios previos han demostrado que los genes implicados en la cadena respiratoria y en el metabolismo de la glucosa se encuentran sobreexpresados en el mieloma (96, 100); por lo que una mayor expresión de los genes relacionados con la biogénesis mitocondrial, es consistente con las alteraciones mitocondriales que se suceden en la progresión de la enfermedad. En concreto, la expresión de *MYC* se considera como el claro ejemplo de la expansión mitocondrial ya que varios genes como *TFAM*, *TUFM* y *NRF1*, que intervienen en la transcripción y traducción mitocondrial, son directamente regulados por *MYC* (114). Además, resultados previos del grupo determinaron que los pacientes con mieloma presentaban un aumento del ADNmt (120), relacionándose con el aumento de expresión de *TFAM*, conocido por ser esencial en el mantenimiento del ADNmt (124, 125). Por tanto, el ADNmt promueve la oncogénesis, lo que influye en los patrones de expresión génica (79), y en la consecuente malignización de las células plasmáticas. De esta forma se quiso analizar los niveles de expresión de vías relacionadas con la biogénesis mitocondrial, constatándose que a través del estudio de las firmas moleculares (MitoBio) de las vías de la cadena respiratoria y de la actividad de la enzima COX se observan mayores niveles de expresión de estas vías en pacientes con MM de nuevo diagnóstico y en recaída que en sujetos sanos. La detección de las firmas MitoBio sobreexpresadas, está en concordancia con la activación de la vía de la fosforilación oxidativa (OXFOS) reportada por Zhan y colaboradores (104).

Por otro lado, para verificar a nivel proteico la activación de la fosforilación oxidativa, se estudió la expresión de una de las proteínas más abundantes de la

mitocondria, la subunidad II del complejo IV de la cadena respiratoria (COXII). Los resultados obtenidos demuestran que esta proteína se encuentra más expresada en pacientes con MM al diagnóstico y en recaída, que en estadios previos de la enfermedad (Figura 19). En este caso, no se pudo valorar la diferencia de expresión en comparación con donantes sanos ya que el cilindro de médula ósea del paciente sólo se procesa en personas con sospecha de la enfermedad. Sin embargo, los análisis de la enzima citocromo c oxidasa sí que se pudieron comparar con sujetos sanos. Esto se debió a que el procesamiento de este tipo de muestras se hizo directamente en fresco por nuestro laboratorio. La evaluación de la función mitocondrial a través de la tinción de la enzima COX ha sido previamente descrita en células musculares para determinar su disfunción (117, 126), considerándose un buen indicador subrogado de dicha función en otros cánceres, como es en el colorrectal (82). En este trabajo, las células diana eran las células plasmáticas y el objetivo ha sido verificar un aumento de función según progresa el mieloma. Los resultados obtenidos han revelado un aumento de tinción, demostrando así, que el aumento de actividad de la enzima COX está directamente relacionado con el aumento del contenido proteico de la COXII, tal y como sugieren Samelman y colaboradores (127). Además, es conocido que la actividad de COX, al ser un componente crítico de la cadena de transporte de electrones, afecta directa o indirectamente todos los aspectos de la función mitocondrial (128). Es por ello que la última caracterización funcional llevada a cabo, fue el estudio de la masa y el potencial de membrana mitocondriales.

Los estudios dirigidos a conocer la masa mitocondrial y el potencial de membrana mitocondrial han demostrado que se produce un aumento de ambas sondas en pacientes con MM respecto a pacientes en estadios previos de la enfermedad (GMSI). Curiosamente, en trabajos recientes enfocados a resistencias a inhibidores del proteasoma, se muestra como las células mielomatosas presentan un fenotipo maligno acompañado por un aumento de la masa mitocondrial así como una mayor dependencia en la respiración mitocondrial (102, 106). Incluso otros autores sugieren que son las células tipo pluripotentes, con reducida expresión de CD138, las que presentan mayor masa mitocondrial y un elevado potencial de membrana mitocondrial (92). Además, se conoce que el potencial de membrana se ve afectado por la hexokinasa II, y en MM el grupo de Arfani han revelado que esta enzima se encuentra sobreexpresada (94).

En resumen, esta primera parte del trabajo confirma observaciones previas sobre la reprogramación metabólica en el MM y profundiza en la caracterización de la función mitocondrial tanto en pacientes en estadios pre-malignos de la enfermedad (GMSI y SM) como en pacientes al diagnóstico como en recaída. El estudio de los genes ha permitido correlacionar su expresión con la supervivencia, sin embargo, a pesar de la falta de significación en el resto de análisis, tanto funcionales como proteicos, por el limitado número de muestras y la gran heterogeneidad de los pacientes empleados; sí que se ha podido detectar una clara tendencia que podría influir en la supervivencia, por lo que se necesitan más estudios con un tamaño muestral mayor que permitan evaluar su correlación.

6.2. LA INHIBICIÓN MITOCONDRIAL ES UN MECANISMO DE CITOTOXICIDAD EN EL MIELOMA MÚLTIPLE. EFICACIA DE LA TIGECICLINA EN MONOTERAPIA Y EN COMBINACIÓN CON BORTEZOMIB.

6.2.1. Inhibición de la actividad mitocondrial del Mieloma Múltiple *in vitro*

Para esta segunda parte del trabajo, acorde a los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica de los pacientes, se seleccionó como modelo celular de estudio una línea de mieloma que presenta un alto ADNmt, alta expresión de *MYC* y elevada actividad mitocondrial (Figura 22). Fue la línea JJN3 la que presentó estas tres características evaluadas. De hecho, Sánchez y colaboradores demostraron que las líneas JJN3 y RPMI-8226 exhiben un metabolismo alterado (97). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estudios previos han descrito como las células primarias de MM presentan un metabolismo mitocondrial aumentado en comparación con las líneas celulares (102).

Nuestros hallazgos han sentado la base de que la elevación de la actividad mitocondrial es un mecanismo de malignidad unido a c-Myc y a la fosforilación oxidativa. De hecho, la maquinaria mitocondrial ha sido previamente descrita como diana indirecta para el bloqueo de c-Myc a través del uso de antibióticos (129). Son varios los

autores los que proponen nuevas dianas dirigidas al elevado metabolismo de las células de MM, debida a la alta dependencia en la fosforilación oxidativa (70, 73, 105). De hecho, en los últimos años, diferentes clases de antibióticos se han aprobado por la FDA como es el caso de la neomicina en el cáncer de estómago, por su efecto independiente para tratar infecciones al inhibir la biogénesis mitocondrial en células tumorales (130). La tigeciclina inhibe la síntesis proteica bacteriana y, debido a la similitud de la mitocondria y los ribosomas bacterianos, también se ve inhibida la síntesis de proteínas codificadas por la mitocondria (131). Nuestros resultados están en línea con las observaciones previas en otros cánceres hematológicos que ya demostraron un efecto terapéutico de la tigeciclina en diferentes tumores hematológicos como en linfoma (131), en la leucemia mieloide aguda (89, 132) e incluso en el mieloma (133). En este contexto se demostró que la tigeciclina dirige su efecto contra la célula plasmática inhibiendo la respiración (medida como OCR o tasa de consumo de oxígeno) y la actividad de COX, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial y reduciendo la abundancia de los complejos I y IV de la cadena respiratoria y la expresión de c-Myc/ HnRNP K.

Además de la tigeciclina, hay otros inhibidores mitocondriales que pueden ser útiles en tumores reprogramados metabólicamente. Uno de estos compuestos es venetoclax, que actúa como inhibidor de Bcl2 (134). Sin embargo, a diferencia de la tigeciclina, venetoclax parece ser más citotóxico en células plasmáticas con reducida respiración mitocondrial (135). El aumento de fosforilación oxidativa en MM puede ser un inconveniente en el tratamiento con venetoclax, pero la inclusión de tigeciclina podría suponer una nueva ventana terapéutica en el tratamiento del MM y de otras alteraciones de células B, especialmente con la contribución de c-Myc (136).

En este trabajo se ha podido explorar el beneficio que aporta la combinación de tigeciclina con bortezomib. Se constató que la citotoxicidad de ambos fármacos juntos mejoraba el efecto producido de cada fármaco en monoterapia, al obtenerse buenos índices de sinergia ($CI < 0,5$). Es por ello que se evaluaron los patrones de actividad mitocondriales como resultado del tratamiento de la combinación. De forma que la sinergia de bortezomib y tigeciclina provoca una disminución más acusada de la respiración mitocondrial y de la expresión proteica de los complejos de la cadena respiratoria que la provocada por la tigeciclina sola (Figuras 26-29). Sin embargo, en el tratamiento con bortezomib o carfilzomib se observó como todos los parámetros mitocondriales se veían estimulados, a excepción de la expresión de c-Myc/ HnRNP K.

De hecho, la disminución de c-Myc y HnRNP K ha sido descrita en otras neoplasias de células B tras el tratamiento con bortezomib (137). Sin embargo, cuando el tratamiento con bortezomib se alarga en el tiempo se produce un efecto compensatorio, estimulándose la expresión de c-Myc, tal y como se ha visto en los resultados obtenidos de las muestras de pacientes en recaída (Figura 3c). Además, esta observación coincide con estudios previos que demuestran que algunos factores de transcripción mitocondrial como *TFAM* son regulados directamente por *MYC* contribuyendo a la ganancia de masa mitocondrial (123, 129, 138) y por tanto, queda claro el papel del bortezomib en la reprogramación metabólica (102, 104-106, 139).

Por otro lado, se evaluó la eficacia de la tigeciclina en células resistentes a bortezomib, ya que hay autores que sugieren que las células de mieloma resistentes a este fármaco pueden ser más sensibles a inhibidores mitocondriales (105). En nuestros experimentos, observamos que estas células resistentes a bortezomib respondían de la misma forma a la tigeciclina que sus homólogas sensibles. Este hecho podría deberse a que las células resistentes o en recaída tienen un fenotipo “stem” que se ha relacionado con una mayor actividad mitocondrial (92). Además, resaltar que los resultados obtenidos de los estudios moleculares sobre el efecto en la actividad mitocondrial demostraron que la combinación de bortezomib y tigeciclina hacía disminuir esta actividad en cuanto a la expresión de los complejos de la cadena respiratoria, la expresión de c-Myc, HnRNP K; en cuanto a la actividad de la enzima COX y en cuanto al potencial de membrana mitocondrial (Figura 32). Este hecho apoya la hipótesis que reportan otros autores de que otros mecanismos no mutacionales permiten que las células resistentes a inhibidores del proteasoma reviertan esa resistencia, por ejemplo, aplicando terapias intermitentes a altas dosis de los mismos inhibidores (50). En este trabajo se ha podido demostrar que tratamientos de sensibilización con tigeciclina mejoraban el efecto citotóxico reportado de sus correspondientes ensayos de combinación tanto con bortezomib como con el inhibidor de BRD4, e indirecto de *MYC*, JQ1 (Figuras 25 y 36). Por ello, son importantes más estudios que exploren los mecanismos moleculares que generan la resistencia, ya que hasta ahora se han centrado fundamentalmente en buscar mutaciones como por ejemplo las descritas en PSBM5 (140) o en el factor de crecimiento insulínico (141). De hecho, la sobreexpresión de *MYC* en MM se considera un mecanismo de resistencia no caracterizado (142-146). Y, *HNRNPK*, una ribonucleoproteína que regula c-Myc en

neoplasias de células B, se ha propuesto que está involucrada en el desarrollo de la tumorigénesis (144).

En conjunto, estos hallazgos muestran que la elevación de la biogénesis mitocondrial en MM, es un mecanismo unido a c-Myc y a la reprogramación metabólica, lo que respalda el uso de inhibidores mitocondriales, como la tigeciclina, con inhibidores del proteasoma, como bortezomib. De esta forma, la maquinaria mitocondrial es una potencial diana indirecta de c-Myc que ha mostrado ser una alternativa eficaz con antibióticos genéricos (129), como tigeciclina (88) y claritromicina entre otros (147, 148). Es más, otros autores han reportado un efecto sinérgico de la tigeciclina con el agente quimioterapéutico de elección, cisplatino, en carcinoma hepatocelular (149).

La eficacia de la tigeciclina en células plasmáticas se produce fundamentalmente por la alteración de la actividad mitocondrial, pero también se ha podido describir que influye en los niveles de expresión de c-Myc. De hecho, c-Myc se considera una molécula clave en las neoplasias de células B, fundamentalmente porque regula la formación de centros germinales y el destino de las células B en la zona oscura y en la clara del bazo (150). En el contexto del MM, el 20-50% de pacientes muestran translocaciones en c-Myc, un 15-20% amplificaciones (151, 152) y en más del 60% se identifica activación de la vía de c-Myc (153). Se conoce que los cánceres con sobreexpresión de c-Myc son a su vez altamente dependientes de vías metabólicas específicas, que pueden no ser esenciales en la célula y suponen una ventana terapéutica con la que alterar la expresión de c-Myc (115). Este tipo de estrategias persiguen aprovechar el fenómeno de letalidad sintética. El concepto de letalidad sintética tiene sus orígenes en estudios genéticos y hace referencia a la interacción letal de dos genes, de forma que cuando uno de ellos está alterado la expresión es viable, pero cuando ocurre en ambos genes resulta letal (154). En los últimos años, este tipo de estrategias han ganado importancia, y en el caso de c-Myc se han descrito varias moléculas que interaccionan con c-Myc de forma que su depleción afecta la expresión de este, como es el caso de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) (115) o la lactato deshidrogenasa (LDH), genes regulados por *MYC*. Por ejemplo, se ha descrito que la inhibición de LDH ha resultado en la inhibición de la linfomagénesis en un modelo de cáncer pancreático (155). En el caso del MM, se ha explorado la interacción con BRD4, una proteína implicada en la elongación de la transcripción de *MYC* y cuya inhibición afecta la expresión de c-Myc (156). Es por ello que se llevaron estudios con el conocido inhibidor de BRD4, JQ1, para esclarecer el mecanismo de acción a nivel

molecular. En estudios previos de cáncer de ovario se ha demostrado como el uso de JQ1, hace disminuir la glicolisis de las células y la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa, que se encuentra desregulada por la expresión de c-Myc (157). En este trabajo, los parámetros mitocondriales evaluados no mostraron ningún cambio bajo el tratamiento de JQ1. Si bien es cierto, que como era de esperar se verificó la abolición de c-Myc en las células de MM tras exponerlas a JQ1. Además, la combinación de bortezomib y JQ1 muestra la reducción de c-Myc, como respuesta de un mayor efecto citotóxico, también reportado por otros autores (158).

En segundo lugar, se confirmó en este estudio la implicación del receptor de membrana CD38 en la actividad mitocondrial. Para esta parte del trabajo se utilizó la línea celular RPMI-8226, ya que la línea JJN3 usada como modelo hasta ahora, no tiene expresión de CD38, con lo que se decidió trabajar con la siguiente línea caracterizada como de alta actividad mitocondrial (ver figura 22) y con expresión endógena de CD38. Previamente, Marlein y colaboradores han demostrado la relación de CD38 y la transferencia de mitocondrias en células plasmáticas, lo que se traduce en un aumento de la masa mitocondrial (102). En este contexto, los resultados reportados en este estudio confirman que la tigeciclina provoca la reducción de CD38 en la línea RPMI-8226, que se acompaña con la disminución de la actividad COX y del potencial de membrana mitocondrial. En cuanto a la expresión de los complejos de la cadena respiratoria, se encuentra cierta discordancia, ya que la reducción de la expresión se detecta en los complejos III y V en la línea RPMI-8226, a diferencia de lo reportado con la línea JJN3, en la que se encontraban disminuidos los complejos I y IV. Este hecho parece deberse a las diferencias de actividad mitocondrial basal que presentan ambas líneas, tal y como se puede observar en los estudios realizados en las 6 líneas celulares de mieloma para clasificar su nivel de actividad mitocondrial (Figura 22). Por lo que se requieren más estudios que permitan discernir las diferencias de expresión que se encuentra en los complejos tras el tratamiento con tigeciclina. De la misma forma, es necesario profundizar en las causas por las que disminuye CD38 en presencia de células efectoras (Figura 39). Si bien al estudiarlo en comparación con el uso de daratumumab, que muestra un aumento de la expresión de los complejos de la cadena respiratoria y de la actividad de COX, queda patente que los mecanismos por los que el daratumumab hace disminuir CD38 son independientes de las vías que pueda emplear la tigeciclina. De hecho, el aumento de actividad mitocondrial podría deberse a la predisposición que presentan las células de

volverse resistentes a tratamientos con anticuerpos monoclonales como daratumumab a través de la sobre-regulación de CD38 como se ha sugerido previamente (159). En el caso del estudio de la expresión de CD38 en presencia o ausencia de PBMCs tras el tratamiento con daratumumab cabría esperar una mayor reducción en la expresión de CD38 en la condición en presencia de PBMCs ya que la presencia de células efectoras provoca una actividad inmunomediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Sin embargo, los niveles de reducción de CD38 son parecidos en las condiciones con/sin PBMCs; en un principio cabría la duda de que el daratumumab y el anticuerpo CD38 de citometría compiten por el mismo epítipo, pero acorde a la bibliografía publicada ambas moléculas no compiten por la misma unión; ya que el clon HB7 correspondiente al anticuerpo usado en citometría para CD38 se une a una localización diferente al daratumumab en el dominio extracelular de la porción C terminal (160, 161). Descartada esta hipótesis, se considera que la falta de detección de una mayor reducción en la expresión de CD38 en las células tratadas con PBMCs, pueda ser debido, a que las PBMCs han sido puestas en cultivo apenas 4h tras las 48h en cultivo con el daratumumab, con lo que células B reguladoras, T reguladoras y NK seguirán manteniendo los niveles de expresión de CD38, que suelen presentar de forma basal (162), provocando que en el cómputo global de la expresión no se detecte una disminución mayor de la fluorescencia. Por tanto, la falta de identificación fenotípica de estas poblaciones ha supuesto una limitación en el estudio de la expresión de CD38. Respecto al efecto que ejerce la tigeciclina sobre la expresión de CD38, se demuestra que fundamentalmente se debe a la presencia de células efectoras. En este contexto, los resultados obtenidos de la expresión de los ligandos de apoptosis PD-L1 y PD-L2, justifican que la tigeciclina estimule de forma indirecta el efecto de las células efectoras gracias a la reducción de estos dos ligandos, que generalmente se encuentran bloqueando el sistema inmune, acorde a lo publicado previamente (163, 164). De hecho, el grupo de Costa confirma que esta inmunosupresión descrita en pacientes con MM se debe a la interacción del microambiente, la expresión de CD38 y la expresión de PD-L1 (38). Además, otros autores han demostrado que el aumento de expresión de PD-L1 está asociado con la progresión de la enfermedad de GMSI y SM a MM (1), y a su vez regulado por la expresión de c-Myc (165), lo que apoya los resultados descritos. De la misma forma, estudios con otros inhibidores mitocondriales como la metformina provocan una reducción de la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 (163). Otra de las formas de

inmunosupresión que se han descrito en MM es la debida al aumento de los ligandos de apoptosis FAS L y TRAIL bloqueando la actividad de las células T (94, 166, 167). En este estudio se ha podido demostrar la reducción de la expresión de estos ligandos en la célula plasmática tras el tratamiento con tigeciclina, lo que justifica que la citotoxicidad observada al usar células efectoras se viera aumentada.

6.2.2. Citotoxicidad ex vivo del inhibidor mitocondrial, tigeciclina, en células primarias de pacientes con MM

La realización de este estudio ha permitido validar la eficacia citotóxica de la tigeciclina en células primarias de pacientes. Para este tipo de experimentos la muestra de médula ósea extraída de los pacientes fue separada mediante ficoll para obtener así las células mononucleadas, que fueron expuestas a los distintos tratamientos. Estudios previos demuestran que, el uso de todas las células mononucleadas, o la fracción de CD138+ purificadas mediante bolas magnéticas, es igual de útil para llevar a cabo estudios *ex vivo*; de hecho parece ser incluso más beneficioso usar toda la fracción de células mononucleadas obtenidas del ficoll, ya que células mielomatosas tendrán parte del soporte celular que tienen de manera fisiológica (168). De hecho, otros autores reclaman la importancia de realizar los estudios de fármacos y sus combinaciones en modelos que simulen el microambiente en médula ósea, y para ello proponen modelos de cultivo 3D, los cuales todavía están poco explorados y son costosos (169). Sin embargo, para este trabajo se empleó como se ha descrito, toda la fracción de células mononucleadas para los tratamientos *ex vivo*. Hay que recalcar que, en el caso de bortezomib, existen estudios previos en células primarias de pacientes con MM que corroboran los resultados reportados en este trabajo (170). Se ha podido observar que en los tres pacientes estudiados con MM los resultados de viabilidad eran variables en presencia de 2 nM de bortezomib, encontrándose desde ningún efecto a una reducción de la supervivencia entre un 14 y un 24%. Esta misma variabilidad es la que describen Hideshima y colaboradores al comprobar que las células primarias de MM expuestas a dosis crecientes de bortezomib presentaban valores de IC50 entre 2,5 nM y 30 nM (170). En el caso de la tigeciclina, las diferencias encontradas en el porcentaje de células CD138/CD38+, fueron más pequeñas; la desviación fue de 9.7 mientras que para las

células tratadas con bortezomib era de 21.6 (ver figura 34). Además, se pudo comprobar que el efecto citotóxico provocado *in vitro* a dosis de 3.7 μM en la línea JJN3 (Figura 9), se correspondía con la reducción detectada en el porcentaje de células CD138/CD38+ tratadas con la misma dosis de tigeclina. Resultados similares se han reportado en estudios con otros tumores hematológicos, como en células primarias de leucemia mieloide aguda (89) y de leucemia mieloide crónica (132). Los hallazgos de este estudio muestran como la tigeclina, empleada en monoterapia o en combinación con bortezomib reduce el porcentaje total de células plasmáticas tras 48 horas de tratamiento. Si bien es cierto que la población utilizada para este experimento es muy reducida (N = 4), por lo que debería ampliarse el estudio. Las razones que se encuentran detrás de esta limitación se deben fundamentalmente a las dificultades que muestran las células primarias de mieloma para ser cultivadas *ex vivo*, acorde a publicaciones previas (171).

6.2.3. Reducción de la carga tumoral de MM *in vivo* con tigeclina en monoterapia y en combinación con bortezomib

Los modelos murinos de mieloma múltiple son una herramienta clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Son numerosos los modelos preclínicos que se han descrito, sin embargo, no hay ningún sistema que modele de forma eficaz la enfermedad (66).

Los ratones NOD/SCID-gamma, con ausencia de expresión de interleucina 2 (IL-2) han sido caracterizados como un modelo de ratón capaz de desarrollar mieloma múltiple en médula ósea, mediante el injerto ya sea de líneas celulares como de células primarias de pacientes (172). Estos ratones NSG, han demostrado ser un modelo muy eficaz para la realización de xenotransplantes. La razón fundamental por la que estos ratones son más útiles se argumenta por la mejora asociada al injerto a causa de una función inmune residual; ya que en comparación con otros ratones inmunodeprimidos, como es el caso de los ratones NOD/SCID, el injerto se ve favorecido por la ausencia de células NK (67). Sin embargo, la bibliografía reporta que en la mayoría de los casos los animales han de ser sometidos a irradiación 24h previas a la inoculación de las células tumorales para asegurar el éxito del injerto. Si bien, en este trabajo se pudo establecer que se podía prescindir de la irradiación de los ratones ya que en el caso de la línea utilizada,

JJN3, el mieloma se estableció y se desarrolló correctamente acorde a lo publicado con animales sometidos a irradiación. De esta forma, en el experimento final nuestros resultados validan el correcto injerto del mieloma en el 90% de los ratones (18/20) a los 15 días de la inoculación intravenosa de las células tumorales, mediante imagen *in vivo*. Si bien es cierto que 7 días después (22 días post-injerto) se detectó señal luminiscente en el 100% de los animales. De la misma forma ha sido reportado en un estudio, que con la línea celular MM1.S a día 14 post-injerto no todos los ratones presentan señal lumínica, sin embargo, se vio que a día 22 todos los animales presentaban señal. En este mismo trabajo, los autores señalan que líneas celulares de MM, como la MM1.S o la JJN3 son de las más representativas del tumor desarrollado en los pacientes (173). En cuanto a las variables sexo y edad, se determinó el uso de ratones hembra NSG de 6 a 8 semanas de edad, acorde a bibliografía previa (174). El mieloma múltiple en humanos tiene una incidencia ligeramente mayor en hombres que en mujeres (175), pero en este trabajo se han usado hembras para evitar agresividad entre los animales, y en base a estudios que avalan que la variable biológica asociada al sexo sólo debe tenerse en cuenta en estudios que impliquen cambios hormonales (176).

El injerto de la línea JJN3-ffLuc-GFP por vía intravenosa de 1×10^6 células resultó ser efectivo, ya que los animales presentaron como principal síntoma, la paraplejía aproximadamente a las 3 semanas tras el injerto, signo clínico asociado a la agresividad de la línea celular. Además, Lawson y colaboradores demuestran la infiltración de células JJN3 en médula ósea (174). De esta forma se confirma que el modelo de MM con la línea JJN3 es altamente reproducible, acorde a lo reportado por otros autores previamente (66, 67, 177, 178).

El seguimiento de una vez por semana de la señal lumínica a través de imagen *in vivo* ha permitido de una forma no invasiva, registrar cómo progresaba el mieloma en los animales control y cómo se alteraba su progresión en los tres grupos de tratamiento. El procedimiento para llevar a cabo este seguimiento se basó en publicaciones previas (66, 172). Hay que reseñar que en uno de los animales del grupo control, como se puede ver en la figura 49a, el estudio de la señal lumínica no se ha correlacionado directamente con el grado de infiltración de la enfermedad, pues a día 22 post-injerto apenas presentaba señal en el estudio de imagen y, sin embargo, a los 7 días (29 días post-injerto) se tuvo que sacrificar por inicio de parálisis debida al MM. Esta limitación de la imagen *in vivo* puede deberse a una posible pérdida de la expresión del gen luciferasa, de forma que la

imagen *in vivo* no se corresponda con la evolución clínica de los animales. Hasta el momento, no se conocen estudios que describan la variabilidad entre la imagen *in vivo* y el número de células injertadas. De hecho, aunque es conocido que en este modelo murino de MM, los primeros signos de la enfermedad se producen generalmente a las 3 semanas del injerto intravenoso (67, 173, 178), los estudios previos no dan información sobre la aparición de sintomatología, como es la parálisis de los miembros posteriores y su correlación con la imagen *in vivo*.

En cuanto a los tratamientos, en el caso de los ratones tratados con bortezomib, las imágenes *in vivo* muestran a los 22 días post-injerto menor intensidad de señal que los ratones del grupo control; sin embargo, las diferencias de supervivencia media entre ambos grupos son de apenas 1.5 días (25.5 de media en el grupo de bortezomib y 27 días de media en el grupo control). Estudios previos muestran resultados similares, como es el grupo de Beider, que a los 24 días post-injerto con la línea RPMI8226, los ratones se sacrifican por inicio de morbilidades, tanto en los tratados como los que no, detectándose una menor presencia de la línea celular en médula ósea en los ratones tratados con bortezomib que en los controles (179). En otro estudio se puede ver como a 28 días tras el injerto de la línea L363, los ratones de los distintos grupos de tratamiento se sacrifican por inicio de parálisis, sin embargo, la imagen *in vivo* previa, muestra como los animales tratados con bortezomib presentan una menor señal que los controles (180). Respecto a los tratamientos con tigeciclina, es la primera vez que se demuestra cómo se reduce la carga tumoral en la imagen *in vivo* de los ratones tratados con tigeciclina y o su combinación con bortezomib. Ya que estudios previos habían explorado el efecto de la tigeciclina, pero en un modelo de enfermedad de MM subcutáneo, controlando las variaciones de volumen de la masa tumoral (133). Con todos estos resultados, queda patente la falta de estudios que describan y analicen la supervivencia de los animales así como la necesidad de trasladar los hallazgos de los modelos *in vivo* a la práctica clínica (181).

A lo largo de este trabajo se persiguió el uso de las 3Rs, para conseguir la máxima calidad en la investigación, minimizando los posibles problemas tal y como sugirieron Russell y Burch en 1959 (182). En el caso del reemplazo, el desarrollo de este estudio se justifica a través de su autorización por parte de la autoridad competente, ya que a día de hoy no existen métodos alternativos que permitan predecir el potencial anti-tumoral de la terapia bajo estudio, más allá de los ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Por lo que el modelo

in vivo es imprescindible para la validación de la terapia. Respecto al número de animales que fueron necesarios para realizar el estudio se consideró un mínimo de 10 por grupo, ya que no se encontraron estudios similares que lo justificaran. Si bien es cierto, que acorde a la ecuación de recurso en la que se calcula el valor E, que resulta de la resta del número total de animales respecto al número total de grupos, se deduce que con 7 animales por grupo podría haber sido suficiente para detectar las diferencias entre los grupos (183). De forma, con el objetivo de refinar en el uso de animales y ya que el uso de imagen *in vivo* se considera un argumento clave para la reducción del número de animales en los experimentos (184), se expusieron solo 5 animales por grupo a este procedimiento. La bioluminiscencia permitió la detección y la cuantificación de la señal de lumínica que presentaban los animales en cada grupo de tratamiento.

En el caso del refinamiento, para la administración de bortezomib y tigeciclina se siguieron las indicaciones previamente descritas por otros autores. El uso de la tigeciclina se realizó acorde a experimentos similares en modelos murinos de leucemia mieloide crónica (132) y aguda (89), a través de aumentos progresivos de la dosis a lo largo de las 4 semanas de tratamiento (50 – 100 mg/kg). En el caso de bortezomib, muchos de los estudios indican su administración por vía intravenosa (185, 186). Sin embargo, para la tigeciclina, la vía de administración de elección es la intraperitoneal; con lo que de cara a realizar el tratamiento combinado de bortezomib y tigeciclina, se buscaron referencias que reportaran la eficacia de la administración de bortezomib por vía intraperitoneal (187, 188). Todas estas medidas han permitido reducir al mínimo cualquier efecto colateral tras la administración de cualquiera de los dos fármacos, como por ejemplo la toxicidad. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo han mostrado que el uso de imagen *in vivo* es clave para hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad del MM en los animales.

Estos hallazgos han permitido validar los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *ex vivo* con la tigeciclina y/o su combinación con bortezomib. De hecho, los ratones tratados con tigeciclina en monoterapia han mostrado una reducción significativa de la enfermedad acorde a estudios previos (133).

7. CONCLUSIONES

1. Los estudios de expresión génica, proteica y funcional de moléculas clave en el metabolismo mitocondrial muestran alteraciones en pacientes de gammapatías monoclonales de significado incierto, mieloma smoldering, mieloma múltiple y mieloma múltiple en recaída. Estos resultados ponen de manifiesto que los distintos estadios de la enfermedad se ven acompañados de una elevación progresiva de la actividad mitocondrial, lo que sugiere su implicación en el desarrollo, progresión y generación de resistencias en el mieloma múltiple.

2. La selección de la línea celular de mieloma múltiple JJN3 y su homónima resistente a bortezomib, JJN3 R, es la aproximación metodológica más apropiada para analizar la actividad mitocondrial debido a que los parámetros mitocondriales analizados se encuentran más elevados, representando de forma significativa la situación en pacientes tanto con mieloma al diagnóstico como en resistencia a bortezomib. La selección del modelo murino NSG injertado mediante inyección intravenosa con la línea celular JJN3, sin necesidad de irradiación, es la aproximación metodológica más adecuada para imitar el desarrollo de la enfermedad del mieloma múltiple debido a que el tumor se establece y prolifera desde médula ósea, y es reproducible entre los animales.

3. El inhibidor mitocondrial tigeiclina es eficaz en líneas celulares de mieloma *in vitro*, en células primarias de pacientes *ex vivo* y en el modelo de ratón con la línea JJN3 *in vivo*. Esto pone en evidencia el éxito de la explotación terapéutica de la actividad mitocondrial. La combinación con bortezomib pone de manifiesto la potenciación farmacológica de la tigeiclina *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* debido a un mayor impacto molecular a través de la reducción de la actividad mitocondrial y la expresión de *MYC*, lo que podría subvertir el desarrollo de la resistencia a bortezomib.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gulla A, Anderson KC. Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into future. *Haematologica*. 2020.
2. Jiménez Pdjmm. *hematología Patología Médica*. Segunda edición revisada ed. Madrid 1996. 557 p.
3. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:249-74.
4. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046.
5. Wahed A, Dasgupta A. Chapter 7 - Monoclonal Gammopathy and Its Detection. In: Wahed A, Dasgupta A, editors. *Hematology and Coagulation*. San Diego: Elsevier; 2015. p. 117-32.
6. Kyle RA, Steensma DP. History of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res*. 2011;183:3-23.
7. Zink A, Rohrbach H, Szeimies U, Hagedorn HG, Haas CJ, Weyss C, et al. Malignant tumors in an ancient Egyptian population. *Anticancer Res*. 1999;19(5b):4273-7.
8. Nerlich A, Rohrbach H, Bachmeier B, Zink A. Malignant tumors in two ancient populations: An approach to historical tumor epidemiology. *Oncology Reports*. 2006.
9. Capasso LL. Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer*. 2005;113(1):2-13.
10. Cushing AC, Ramsay EC, Newman SJ, Hespel AM, Sula MM. hypergammaglobulinemia and myeloma in five tigers (*panthera tigris*): clinicopathological findings. *J Zoo Wildl Med*. 2019;50(1):219-24.
11. Mellor PJ, Haugland S, Smith KC, Powell RM, Archer J, Scase TJ, et al. Histopathologic, Immunohistochemical, and Cytologic Analysis of Feline Myeloma-Related Disorders: Further Evidence for Primary Extramedullary Development in the Cat. *Veterinary Pathology*. 2008;45(2):159-73.
12. Munoz A, Riber C, Satue K, Trigo P, Gomez-Diez M, Castejo FM. Multiple Myeloma in Horses, Dogs and Cats: A Comparative Review Focused on Clinical Signs and Pathogenesis. *Multiple Myeloma - A Quick Reflection on the Fast Progress*: InTech; 2013.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7-30.
14. Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2014;64(6):422-44.
15. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells. *International Journal of Hematology*. 2013;97(3):306-12.
16. Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med*. 1993;178(3):1023-31.
17. Bortnick A, Murre C. Cellular and chromatin dynamics of antibody-secreting plasma cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2016;5(2):136-49.
18. Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, Boise LH. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
19. Glick B, Chang TS, Jaap RG. The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poultry Science*. 1956;35(1):224-5.
20. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(2):226-34.
21. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood*. 2010;116(25):5501-6.
22. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):e538-e48.

23. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, Snowden JA, Pratt G, Ashcroft J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *British Journal of Haematology*. 2011;154(1):32-75.
24. George ED, Sadvovsky R. Multiple myeloma: recognition and management. *Am Fam Physician*. 1999;59(7):1885-94.
25. Dispenzieri A, Gertz MA, Therneau TM, Kyle RA. Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(5):476-87.
26. Rincón-Vásquez NJ, Jaramillo-Arbeláez PE, Llanos-Albornoz CM. Morfología e inmunofenotipo de las células plasmáticas en el mieloma múltiple. *Medicina y Laboratorio*. 2017;23(9-10):443-58.
27. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphologie*. 2015;99(325):38-62.
28. Jiang N, Qi C, Chang H. Dutcher bodies in multiple myeloma are highly associated with translocation t(4;14) and IgA isotype. *British Journal of Haematology*. 2015;171(5):890-2.
29. Seili-Bekafigo I, Valković T, Babarović E, Duletić-Načinović A, Jonjić N. Myeloma cell morphology and morphometry in correlation with clinical stages and survival. *Diagn Cytopathol*. 2013;41(11):947-54.
30. Ghevaert C, Fournier M, Bernardi F, Geneviève F, Pouyol F, Zandecki M. Non-secretory Multiple Myeloma with Multinucleated Giant Plasma Cells. *Leukemia & Lymphoma*. 1997;27(1-2):185-9.
31. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, Béné MC. Immunophenotype of Normal and Myelomatous Plasma-Cell Subsets. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.
32. Morandi F, Horenstein AL, Costa F, Giuliani N, Pistoia V, Malavasi F. CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
33. Hartman WR, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari K, Liu M, Wu T-Y, et al. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system. *Leukemia & Lymphoma*. 2010;51(7):1315-25.
34. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2010;23(3):433-51.
35. Plesner T, Van De Donk NWCJ, Richardson PG. Controversy in the Use of CD38 Antibody for Treatment of Myeloma: Is High CD38 Expression Good or Bad? *Cells*. 2020;9(2):378.
36. Kawano Y, Fujiwara S, Wada N, Izaki M, Yuki H, Okuno Y, et al. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *International Journal of Oncology*. 2012;41(3):876-84.
37. Flores-Montero J, De Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2016;90(1):61-72.
38. Costa F, Marchica V, Storti P, Malavasi F, Giuliani N. PD-L1/PD-1 Axis in Multiple Myeloma Microenvironment and a Possible Link with CD38-Mediated Immune-Suppression. *Cancers*. 2021;13(2):164.
39. Zingoni A, Cecere F, Vulpis E, Fionda C, Molfetta R, Soriani A, et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *The Journal of Immunology*. 2015;195(2):736-48.
40. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(6):575-82.
41. Alexandrakis MG, Pappa CA, Kolovou A, Kyriakaki S, Vyzoukaki R, Devetzoglou M, et al. Circulating levels of soluble Fas ligand reflect disease progression in multiple myeloma. *Med Oncol*. 2014;31(5):953.
42. Zambello R, Barilà G, Manni S, Piazza F, Semenzato G. NK cells and CD38: Implication for (Immuno)Therapy in Plasma Cell Dyscrasias. *Cells*. 2020;9(3):768.
43. Locklin RM, Croucher PI, Russell RGG, Edwards CM. Agonists of TRAIL death receptors induce myeloma cell apoptosis that is not prevented by cells of the bone marrow microenvironment. *Leukemia*. 2007;21(4):805-12.

44. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, Mcgonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKP46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells. *Cancer Research*. 2007;67(18):8444-9.
45. Guillerey C, Ferrari De Andrade L, Vuckovic S, Miles K, Ngiow SF, Yong MCR, et al. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(5):2077-89.
46. Molfetta R, Zitti B, Lecce M, Milito ND, Stabile H, Fionda C, et al. CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3):922.
47. Lagana A, Ruan DF, Melnekoff D, Leshchenko V, Perumal D, Rahman A, et al. Increased HLA-E Expression Correlates with Early Relapse in Multiple Myeloma. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):59-.
48. Barwick BG, Neri P, Bahlis NJ, Nooka AK, Dhodapkar MV, Jaye DL, et al. Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nature Communications*. 2019;10(1).
49. Caprio C, Sacco A, Giustini V, Roccaro AM. Epigenetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers*. 2020;12(10):2996.
50. Ge M, Qiao Z, Kong Y, Liang H, Sun Y, Lu H, et al. Modulating proteasome inhibitor tolerance in multiple myeloma: an alternative strategy to reverse inevitable resistance. *British Journal of Cancer*. 2020.
51. Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future. *Journal of Hematology & Oncology*. 2016;9(1).
52. Pinto V, Bergantim R, Caires HR, Seca H, Guimarães JE, Vasconcelos MH. Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers*. 2020;12(2):407.
53. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orłowski R, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014;28(3):525-42.
54. Hall AG, Tilby MJ. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev*. 1992;6(3):163-73.
55. Scheijen B. Molecular mechanisms contributing to glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies. *Cancer Drug Resistance*. 2019.
56. Burwick N, Sharma S. Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future. *Ann Hematol*. 2019;98(1):19-28.
57. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Geyer SM, Kabat B, et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*. 2005;106(13):4050-3.
58. Chang X, Zhu Y, Shi C, Stewart AK. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2014;46(3):240-53.
59. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*. 2013;54(4):683-7.
60. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*. 2002;99(12):4525-30.
61. Accardi F, Toscani D, Bolzoni M, Dalla Palma B, Aversa F, Giuliani N. Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-13.
62. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3281-90.
63. Jagannath S, Durie BGM, Wolf J, Camacho E, Irwin D, Lutzky J, et al. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2005;129(6):776-83.

64. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib Plus Dexamethasone Induction Improves Outcome of Patients With t(4;14) Myeloma but Not Outcome of Patients With del(17p). *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(30):4630-4.
65. Michels TC, Petersen KE. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2017;95(6):373-83.
66. Lwin ST, Edwards CM, Silbermann R. Preclinical animal models of multiple myeloma. *BoneKey Reports*. 2016;5:772.
67. Paton-Hough J, Chantry AD, Lawson MA. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease. *Bone*. 2015;77:57-68.
68. Schüler J, Ewerth D, Waldschmidt J, Wäsch R, Engelhardt M. Preclinical models of multiple myeloma: a critical appraisal. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13 Suppl 1:S111-23.
69. Wolpaw AJ, Dang CV. Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy. *Trends in Cell Biology*. 2018;28(3):201-12.
70. Beielstein AC, Pallasch CP. Tumor Metabolism as a Regulator of Tumor-Host Interactions in the B-Cell Lymphoma Microenvironment-Fueling Progression and Novel Brakes for Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17).
71. Pavlova N, Natalya, Thompson B, Craig. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. 2016;23(1):27-47.
72. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell*. 2016;61(5):667-76.
73. Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*. 2020;368(6487).
74. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol*. 2015;11(1):9-15.
75. Weinhouse S, Millington RH, Wenner CE. Metabolism of neoplastic tissue. I. The oxidation of carbohydrate and fatty acids in transplanted tumors. *Cancer Res*. 1951;11(11):845-50.
76. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24(11):2482-90.
77. Cheng C-W, Kuo C-Y, Fan C-C, Fang W-C, Jiang SS, Lo Y-K, et al. Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species. *Cell Death & Disease*. 2013;4(6):e681-e.
78. D'Erchia AM, Atlante A, Gadaleta G, Pavesi G, Chiara M, De Virgilio C, et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion*. 2015;20:13-21.
79. Lee WT, St John JC. Mitochondrial DNA as an initiator of tumorigenesis. *Cell Death Dis*. 7. England2016. p. e2171.
80. D'Erchia AM, Atlante A, Gadaleta G, Pavesi G, Chiara M, De Virgilio C, et al. Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion*. 2015;20:13-21.
81. Reznik E, Miller ML, Senbabaoglu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife*. 2016;5.
82. Zhang K, Chen Y, Huang X, Qu P, Pan Q, Lu L, et al. Expression and clinical significance of cytochrome c oxidase subunit IV in colorectal cancer patients. *Arch Med Sci*. 2016;12(1):68-77.
83. Barbato A, Scandura G, Puglisi F, Cambria D, La Spina E, Palumbo GA, et al. Mitochondrial Bioenergetics at the Onset of Drug Resistance in Hematological Malignancies: An Overview. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.
84. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol*. 2017;18(5):488-98.

85. de Oliveira MF, Amoêdo ND, Rumjanek FD. Energy and Redox Homeostasis in Tumor Cells. *International Journal of Cell Biology*. 2012;2012:593838.
86. Bosc C, Selak MA, Sarry J-E. Resistance Is Futile: Targeting Mitochondrial Energetics and Metabolism to Overcome Drug Resistance in Cancer Treatment. *Cell Metabolism*. 2017;26(5):705-7.
87. Sriskanthadevan S, Jeyaraju DV, Chung TE, Prabha S, Xu W, Skrtic M, et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood*. 2015;125(13):2120-30.
88. Xu Z, Yan Y, Li Z, Qian L, Gong Z. The Antibiotic Drug Tigecycline: A Focus on its Promising Anticancer Properties. *Front Pharmacol*. 2016;7:473.
89. Skrtic M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(5):674-88.
90. Dong Z, Abbas MN, Kausar S, Yang J, Li L, Tan L, et al. Biological Functions and Molecular Mechanisms of Antibiotic Tigecycline in the Treatment of Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(14):3577.
91. Bloedjes TA, De Wilde G, Guikema JEJ. Metabolic Effects of Recurrent Genetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers*. 2021;13(3):396.
92. Schibler JC. Targeting unique oxidative metabolism of clonogenic multiple myeloma cells for therapy [Doctor of Philosophy]: University of Iowa; 2016.
93. Rizzieri D, Paul B, Kang Y. Metabolic alterations and the potential for targeting metabolic pathways in the treatment of multiple myeloma. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2019;2019.
94. El Arfani C, De Veirman K, Maes K, De Bruyne E, Menu E. Metabolic Features of Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
95. Wu X, Guo J, Chen Y, Liu X, Yang G, Wu Y, et al. The 60-kDa heat shock protein regulates energy rearrangement and protein synthesis to promote proliferation of multiple myeloma cells. *Br J Haematol*. 2020;190(5):741-52.
96. Xiang Y, Fang B, Liu Y, Yan S, Cao D, Mei H, et al. SR18292 exerts potent antitumor effects in multiple myeloma via inhibition of oxidative phosphorylation. *Life Sci*. 2020;256:117971.
97. Sanchez WY, Mcgee SL, Connor T, Mottram B, Wilkinson A, Whitehead JP, et al. Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *British Journal of Cancer*. 2013;108(8):1624-33.
98. Xu S, Zhou T, Doh HM, Trinh KR, Catapang A, Lee JT, et al. An HK2 Antisense Oligonucleotide Induces Synthetic Lethality in HK1–HK2+ Multiple Myeloma. *Cancer Research*. 2019;79(10):2748-60.
99. Fujiwara S, Wada N, Kawano Y, Okuno Y, Kikukawa Y, Endo S, et al. Lactate, a putative survival factor for myeloma cells, is incorporated by myeloma cells through monocarboxylate transporters 1. *Experimental Hematology & Oncology*. 2015;4(1).
100. Maiso P, Huynh D, Moschetta M, Sacco A, Aljawai Y, Mishima Y, et al. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2015;75(10):2071-82.
101. Lee WT, Cain JE, Cuddihy A, Johnson J, Dickinson A, Yeung KY, et al. Mitochondrial DNA plasticity is an essential inducer of tumorigenesis. *Cell Death Discov*. 2016;2:16016.
102. Marlein CR, Piddock RE, Mistry JJ, Zaitseva L, Hellmich C, Horton RH, et al. CD38-Driven Mitochondrial Trafficking Promotes Bioenergetic Plasticity in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 2019;79(9):2285-97.
103. Boise LH, Shanmugam M. Stromal Support of Metabolic Function through Mitochondrial Transfer in Multiple Myeloma. *Cancer Research*. 2019;79(9):2102-3.
104. Zhan X, Yu W, Franqui-Machin R, Bates ML, Nadiminti K, Cao H, et al. Alteration of mitochondrial biogenesis promotes disease progression in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017;8(67):111213-24.

105. Besse L, Besse A, Mendez-Lopez M, Vasickova K, Sedlackova M, Vanhara P, et al. A metabolic switch in proteasome inhibitor-resistant multiple myeloma ensures higher mitochondrial metabolism, protein folding and sphingomyelin synthesis. *Haematologica*. 1042019. p. e415-e9.
106. Giallongo C, Tibullo D, Puglisi F, Barbato A, Vicario N, Cambria D, et al. Inhibition of TLR4 Signaling Affects Mitochondrial Fitness and Overcomes Bortezomib Resistance in Myeloma Plasma Cells. *Cancers*. 2020;12(8):1999.
107. Dalva-Aydemir S, Bajpai R, Martinez M, Adekola KUA, Kandela I, Wei C, et al. Targeting the Metabolic Plasticity of Multiple Myeloma with FDA-Approved Ritonavir and Metformin. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1161-71.
108. Misund K, Keane N, Stein CK, Asmann YW, Day G, Welsh S, et al. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. *Leukemia*. 2020;34(1):322-6.
109. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes*. 2017;8(4):116.
110. De Barrios O, Meler A, Parra M. MYC's Fine Line Between B Cell Development and Malignancy. *Cells*. 2020;9(2):523.
111. Manasanch EE. Myc is also the bad guy in myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(11):2485-6.
112. Sekiguchi N, Ootsubo K, Wagatsuma M, Midorikawa K, Nagata A, Noto S, et al. Impact of C-Myc gene-related aberrations in newly diagnosed myeloma with bortezomib/dexamethasone therapy. *Int J Hematol*. 2014;99(3):288-95.
113. Seo JH, Agarwal E, Chae YC, Lee YG, Garlick DS, Storaci AM, et al. Mitochondrial fission factor is a novel Myc-dependent regulator of mitochondrial permeability in cancer. *EBioMedicine*. 2019;48:353-63.
114. Morrish F, Hockenbery D. MYC and Mitochondrial Biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4(5):a014225-a.
115. Hsieh AL, Dang CV. MYC, Metabolic Synthetic Lethality, and Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2016;207:73-91.
116. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998;72(11):8463-71.
117. Bala U, Leong MP-Y, Lim CL, Shahar HK, Othman F, Lai M-I, et al. Defects in nerve conduction velocity and different muscle fibre-type specificity contribute to muscle weakness in Ts1Cje Down syndrome mouse model. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197711.
118. Abdul-Aziz AM, Shafat MS, Mehta TK, Di Palma F, Lawes MJ, Rushworth SA, et al. MIF-Induced Stromal PKC β /IL8 Is Essential in Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res*. 2017;77(2):303-11.
119. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. 2010;70(2):440-6.
120. Ruiz-Heredia Y, Samur MK, Ortiz-Ruiz A, Fernández RA, Sanchez-Vega B, Blazquez A, et al. Abnormalities in Mitochondrial DNA Copy Number Have Pathogenetic and Prognostic Implications in Multiple Myeloma. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):4378-.
121. Malaney P, Hornbaker M, Gallardo M, Zhang X, McArthur M, Bueso-Ramos C, et al. hnRNPK as a Driver of Lymphomagenesis. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2017;17:S374-S5.
122. Dalton WS. Targeting the mitochondria: an exciting new approach to myeloma therapy. Commentary re: N. J. Bahlis et al., Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3658-3668, 2002. *Clin Cancer Res*. 2002;8(12):3643-5.
123. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, et al. Myc stimulates nuclear encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6225-34.
124. Wen S, Gao J, Zhang L, Zhou H, Fang D, Feng S. p53 increase mitochondrial copy number via up-regulation of mitochondrial transcription factor A in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(46):75981-95.

125. Chandrasekaran K, Anjaneyulu M, Inoue T, Choi J, Sagi AR, Chen C, et al. Mitochondrial transcription factor A regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(2):E132-41.
126. Karkucinska-Wieckowska A, Pronicki M, Wieckowski MR. Histoenzymatic methods for visualization of the activity of individual mitochondrial respiratory chain complexes in the muscle biopsies from patients with mitochondrial defects. *Methods Mol Biol.* 2015;1241:85-93.
127. Samelman TR, Shiry LJ, Cameron DF. Endurance training increases the expression of mitochondrial and nuclear encoded cytochrome c oxidase subunits and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2000;83(1):22-7.
128. Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(6):1252-63.
129. D'Andrea A, Gritti I, Nicoli P, Giorgio M, Doni M, Conti A, et al. The mitochondrial translation machinery as a therapeutic target in Myc-driven lymphomas. *Oncotarget.* 2016;7(45):72415-30.
130. Volpari T, De Santis F, Bracken AP, Pupa SM, Buschbeck M, Wegner A, et al. Anticancer innovative therapy: Highlights from the ninth annual meeting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;51:1-9.
131. Norberg E, Lako A, Chen PH, Stanley IA, Zhou F, Ficarro SB, et al. Differential contribution of the mitochondrial translation pathway to the survival of diffuse large B-cell lymphoma subsets. *Cell Death Differ.* 2017;24(2):251-62.
132. Kuntz EM, Baquero P, Michie AM, Dunn K, Tardito S, Holyoake TL, et al. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med.* 2017;23(10):1234-40.
133. Ma R, Zhang Y, Wang W, Wu J, Yang Q, Xu W, et al. Inhibition of autophagy enhances the antitumour activity of tigecycline in multiple myeloma. *J Cell Mol Med.* 2018;22(12):5955-63.
134. Roca-Portoles A, Rodriguez-Blanco G, Sumpton D, Cloix C, Mullin M, Mackay GM, et al. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition.
135. Bajpai R, Sharma A, Achreja A, Edgar CL, Wei C, Siddiqua AA, et al. Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2020;11(1):1228.
136. Ravà M, D'Andrea A, Nicoli P, Gritti I, Donati G, Doni M, et al. Therapeutic synergy between tigecycline and venetoclax in a preclinical model of MYC/BCL2 double-hit B cell lymphoma. *Sci Transl Med.* 2018;10(426).
137. Suk FM, Lin SY, Lin RJ, Hsine YH, Liao YJ, Fang SU, et al. Bortezomib inhibits Burkitt's lymphoma cell proliferation by downregulating sumoylated hnRNP K and c-Myc expression. *Oncotarget.* 2015;6(28):25988-6001.
138. Sotillo E, Laver T, Mellert H, Schelter JM, Cleary MA, McMahon S, et al. Myc overexpression brings out unexpected antiapoptotic effects of miR-34a. *Oncogene.* 2011;30(22):2587-94.
139. Thompson RM, Dytfeld D, Reyes L, Robinson RM, Smith B, Manevich Y, et al. Glutaminase inhibitor CB-839 synergizes with carfilzomib in resistant multiple myeloma cells. *Oncotarget.* 2017;8(22):35863-76.
140. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, et al. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood.* 2008;112(6):2489-99.
141. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 2012;120(16):3260-70.
142. Hong J, Maacha S, Belkhiri A. Transcriptional upregulation of c-MYC by AXL confers epirubicin resistance in esophageal adenocarcinoma. *Mol Oncol.* 2018;12(12):2191-208.
143. Moyo TK, Wilson CS, Moore DJ, Eischen CM. Myc enhances B-cell receptor signaling in precancerous B cells and confers resistance to Btk inhibition. *Oncogene.* 2017;36(32):4653-61.

144. Gallardo M, Malaney P, Aitken MJL, Zhang X, Link TM, Shah V, et al. Uncovering the role of hnRNP K, an RNA-binding protein, in B-cell lymphomas. *J Natl Cancer Inst.* 2019.
145. Green AR, Aleskandarany MA, Agarwal D, Elsheikh S, Nolan CC, Diez-Rodriguez M, et al. MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br J Cancer.* 2016;114(8):917-28.
146. Tan J, Li Z, Lee PL, Guan P, Aau MY, Lee ST, et al. PDK1 signaling toward PLK1-MYC activation confers oncogenic transformation, tumor-initiating cell activation, and resistance to mTOR-targeted therapy. *Cancer Discov.* 2013;3(10):1156-71.
147. Niesvizky R, Jayabalan DS, Christos PJ, Furst JR, Naib T, Ely S, et al. BiRD (Biaxin [clarithromycin]/Revlimid [lenalidomide]/dexamethasone) combination therapy results in high complete- and overall-response rates in treatment-naïve symptomatic multiple myeloma. *Blood.* 2008;111(3):1101-9.
148. Hellmann A, Rule S, Walewski J, Shpilberg O, Feng H, van de Velde H, et al. Effect of cytochrome P450 3A4 inducers on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles of bortezomib in patients with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(12):781-91.
149. Tan J, Song M, Zhou M, Hu Y. Antibiotic tigecycline enhances cisplatin activity against human hepatocellular carcinoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(1):17-23.
150. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood.* 2013;122(24):3884-91.
151. Walker BA, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Begum DB, Dahir NM, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2015;6:6997.
152. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell.* 2006;9(4):313-25.
153. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell.* 2011;146(6):904-17.
154. Reinhardt HC, Jiang H, Hemann MT, Yaffe MB. Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle.* 2009;8(19):3112-9.
155. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(5):2037-42.
156. Toyoshima M, Howie HL, Imakura M, Walsh RM, Annis JE, Chang AN, et al. Functional genomics identifies therapeutic targets for MYC-driven cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(24):9545-50.
157. Qiu H, Jackson AL, Kilgore JE, Zhong Y, Chan LL-Y, Gehrig PA, et al. JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer*. *Oncotarget.* 2015;6(9):6915-30.
158. Tseelesuren D, Kant R, Yen C-H, Hsiao H-H, Chen Y-MA. 1,2,3,4,6-Penta-O-Galloyl-Beta-D-Glucopyranoside Inhibits Proliferation of Multiple Myeloma Cells Accompanied with Suppression of MYC Expression. *Frontiers in Pharmacology.* 2018;9.
159. Horenstein AL, Bracci C, Morandi F, Malavasi F. CD38 in Adenosinergic Pathways and Metabolic Re-programming in Human Multiple Myeloma Cells: In-tandem Insights From Basic Science to Therapy. *Front Immunol.* 2019;10:760.
160. Ghose J, Viola D, Terrazas C, Caserta E, Troadec E, Khalife J, et al. Daratumumab induces CD38 internalization and impairs myeloma cell adhesion. *OncoImmunology.* 2018;7(10):e1486948.
161. Martin TG, Corzo K, Chiron M, Van De Velde H, Abbadessa G, Campana F, et al. Therapeutic Opportunities with Pharmacological Inhibition of CD38 with Isatuximab. *Cells.* 2019;8(12):1522.
162. Morandi F, Airoidi I, Marimpietri D, Bracci C, Faini AC, Gramignoli R. CD38, a Receptor with Multifunctional Activities: From Modulatory Functions on Regulatory Cell Subsets and Extracellular Vesicles, to a Target for Therapeutic Strategies. *Cells.* 2019;8(12):1527.

163. Cha JH, Yang WH, Xia W, Wei Y, Chan LC, Lim SO, et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*. 2018;71(4):606-20.e7.
164. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:2298.
165. Jovanović KK, Roche-Lestienne C, Ghobrial IM, Facon T, Quesnel B, Manier S. Targeting MYC in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(6):1295-306.
166. Frassanito, Silvestris, Silvestris, Cafforio, Camarda, Iodice, et al. Fas/Fas ligand (FasL)-deregulated apoptosis and IL-6 insensitivity in highly malignant myeloma cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 1998;114(2):179-88.
167. Motz GT, Santoro SP, Wang L-P, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nature Medicine*. 2014;20(6):607-15.
168. Weiss C, Uziel O, Wolach O, Nordenberg J, Beery E, Bulvick S, et al. Differential downregulation of telomerase activity by bortezomib in multiple myeloma cells-multiple regulatory pathways in vitro and ex vivo. *British Journal of Cancer*. 2012;107(11):1844-52.
169. Papadimitriou K, Kostopoulos IV, Tsopanidou A, Orologas-Stavrou N, Kastiris E, Tsitsilonis OE, et al. Ex Vivo Models Simulating the Bone Marrow Environment and Predicting Response to Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers*. 2020;12(8):2006.
170. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The Proteasome Inhibitor PS-341 Inhibits Growth, Induces Apoptosis, and Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells. *Cancer Research*. 2001;61(7):3071-6.
171. Zhang W, Gu Y, Sun Q, Siegel DS, Tolias P, Yang Z, et al. Ex Vivo Maintenance of Primary Human Multiple Myeloma Cells through the Optimization of the Osteoblastic Niche. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0125995.
172. Schueler J, Wider D, Klingner K, Siegers GM, May AM, Wäsch R, et al. Intratibial Injection of Human Multiple Myeloma Cells in NOD/SCID IL-2R γ (Null) Mice Mimics Human Myeloma and Serves as a Valuable Tool for the Development of Anticancer Strategies. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e79939.
173. Sarin V, Yu K, Ferguson ID, Gugliemini O, Nix MA, Hann BC, et al. Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. 2019.
174. Lawson MA, Paton-Hough JM, Evans HR, Walker RE, Harris W, Ratnabalan D, et al. NOD/SCID-GAMMA mice are an ideal strain to assess the efficacy of therapeutic agents used in the treatment of myeloma bone disease. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119546.
175. Chang-Chan D-Y-L, Ríos-Tamayo R, Rodríguez Barranco M, Redondo-Sánchez D, González Y, Marcos-Gragera R, et al. Trends of incidence, mortality and survival of multiple myeloma in Spain. A twenty-three-year population-based study. *Clinical and Translational Oncology*. 2021.
176. Shansky RM. Are hormones a "female problem" for animal research? *Science*. 2019;364(6443):825-6.
177. Hjorth-Hansen H, Seifert MF, Borset M, Aarset H, Ostlie A, Sundan A, et al. Marked osteoblastopenia and reduced bone formation in a model of multiple myeloma bone disease in severe combined immunodeficiency mice. *J Bone Miner Res*. 1999;14(2):256-63.
178. Lath DL, Buckle CH, Evans HR, Fisher M, Down JM, Lawson MA, et al. ARQ-197, a small-molecule inhibitor of c-Met, reduces tumour burden and prevents myeloma-induced bone disease in vivo. *PLOS ONE*. 2018;13(6):e0199517.
179. Beider K, Rosenberg E, Dimenshtein-Voevoda V, Sirovsky Y, Vladimirovsky J, Magen H, et al. Blocking of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) promotes terminal mitophagy in multiple myeloma, disturbing calcium homeostasis and targeting ubiquitin pathway and bortezomib-induced unfolded protein response. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020;13(1).
180. Udi J, Schüler J, Wider D, Ihorst G, Catusse J, Waldschmidt J, et al. Potent in vitro and in vivo activity of sorafenib in multiple myeloma: induction of cell death, CD138-downregulation and inhibition of migration through actin depolymerization. *British Journal of Haematology*. 2013;161(1):104-16.

-
181. Vlummens P, De Veirman K, Menu E, De Bruyne E, Offner F, Vanderkerken K, et al. The Use of Murine Models for Studying Mechanistic Insights of Genomic Instability in Multiple Myeloma. *Frontiers in Genetics*. 2019;10.
182. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120-32.
183. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013;4(4):303-6.
184. Gomes AL, Gilchrist S, Kersemans V, Westcott M, Smart S. Refinement of in vivo optical imaging: Development of a real-time respiration monitoring system. *Laboratory Animals*. 2018;52(5):531-5.
185. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, et al. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res*. 2002;62(17):4996-5000.
186. Zhang L, Mager DE. Physiologically-based pharmacokinetic modeling of target-mediated drug disposition of bortezomib in mice. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2015;42(5):541-52.
187. Wang H, Xiao L, Tao J, Srinivasan V, Boyce B, Ebetino F, et al. Synthesis of a Bone-Targeted Bortezomib with In Vivo Anti-Myeloma Effects in Mice. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):154.
188. Zeniya M, Mori T, Yui N, Nomura N, Mandai S, Isobe K, et al. The proteasome inhibitor bortezomib attenuates renal fibrosis in mice via the suppression of TGF- β 1. *Scientific Reports*. 2017;7(1).

9. LISTADO TABLAS

Tabla 1. Criterios de sospecha para establecer el diagnóstico de mieloma múltiple.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de los distintos estadios de MM.

Tabla 3. Tratamientos en MM.

Tabla 4. Modelos in vivo de MM humano.

Tabla 5.- Descripción de los oligonucleótidos (n=3) utilizados para el estudio del número de copias mitocondriales.

Tabla 6.- Descripción de los oligonucleótidos (n=4) utilizados para la titulación de partículas virales generadas en la transfección.

Tabla 7.- Descripción de los anticuerpos primarios usados para estudios de Western Blot.

Tabla 8.- Descripción de los anticuerpos secundarios usados para estudios de Western Blot.

Tabla 9.- Descripción del anticuerpo usado para ensayos de inmunohistoquímica.

Tabla 10.- Descripción de los anticuerpos usados para estudios de citometría.

Tabla 11.- Descripción de las sondas moleculares usados para estudios de citometría.

Tabla 12 Descripción de las dosis estudiadas de cada fármaco, para que ensayos se utilizaron y en qué líneas celulares se estudió.

Tabla 13 Esquema de la generación de la línea celular JJN3 resistente a bortezomib (JJN3 BR).

Tabla 14 Condiciones de preparación de la curva de calibración para la estimación del número de copias de ADNmt.

Tabla 15 Mezcla de reacción para la cuantificación del número de copias de ADNmt (izquierda). Programa del termociclador para llevar a cabo la RT-PCR (derecha).

Tabla 16 Izquierda, mezcla de reacción para la generación de ADNc. Derecha, condiciones de la retrotranscripción.

Tabla 17 Arriba, mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión de ARN mensajero. Abajo las condiciones de la qRT-PCR.

10. LISTADO FIGURAS

Figura 1. Incidencia global de Mieloma múltiple en 2020.

Figura 2. El desarrollo de las gammapatías monoclonales.

Figura 3. Proteinograma o electroforesis de las proteínas del suero.

Figura 4. Células Mott en MM.

Figura 5. Células flameadas en pacientes con a) plasmocitosis reactiva b) GMSI y c) MM.

Figura 6. Cuerpos de Dutcher en pacientes con MM.

Figura 7. Bastones de Auer en pacientes con MM.

Figura 8. Célula plasmática inmadura con nucléolo prominente y cromatina finamente dispersada.

Figura 9. Células plasmáticas con uno o más núcleos y contorno irregular.

Figura 10. Hipótesis de fenotipos causales inducidos por el tratamiento de tigeclina en células cancerígenas.

Figura 11. Representación esquemática del metabolismo celular del MM en comparación con una célula plasmática sana.

Figura 12.- Correlación de la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *COXII*, *NRF1* y *HNRNPK*.

Figura 13.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPK* en cohortes de donantes sanos y de pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico y MM en recaída de la base de datos canEvolve. a) Normal (control) versus GMSI; b) normal versus smoldering; c) normal versus MM al diagnóstico; d) normal versus MM en recaída.

Figura 14.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPK* en cohortes de donantes sanos y de pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico y MM en recaída de la base de datos canEvolve. a) GMSI versus smoldering; b) GMSI versus MM al diagnóstico; c) GMSI versus MM en recaída

Figura 15.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPK* en cohortes de donantes sanos y de pacientes con GMSI, SM, MM al

diagnóstico y MM en recaída de la base de datos canEvolve. a) SM versus MM al diagnóstico b) SM versus MM en recaída.

Figura 16.- Mapas de calor con la expresión de los genes *MYC*, *TUFM*, *TFAM*, *NRF1* y *HNRNPK* en cohortes de donantes sanos y de pacientes con GMSI, SM, MM al diagnóstico y MM en recaída de la base de datos canEvolve. a) análisis de enriquecimiento de la colección de genes correspondientes a las firmas moleculares (MSigDB) de la vía de la cadena respiratoria mitocondria; b) y de la actividad de la citocromo c oxidasa.

Figura 17.- Expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial por qPCR en cohortes de pacientes.

Figura 18.-Curvas Kaplan Meier comparando la SLP para el gen *MYC* en función de los pacientes que presentan recaídas.

Figura 19.- Inmunohistoquímica de COXII en pacientes de MM.

Figura 20.- Histoenzimática de COX en pacientes de MM.

Figura 21.- Citometría de las sondas mitoTracker Green y Red en pacientes de MM.

Figura 22.- Caracterización de la actividad mitocondrial en líneas celulares de MM.

Figura 23.- Curvas de dosis respuesta para los fármacos bortezomib y tigeclina en líneas celulares de MM.

Figura 24.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeclina en la línea celular JJN3.

Figura 25.- Estudio de sensibilización de la línea celular JJN3 con tigeclina en combinación con bortezomib.

Figura 26.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 con tigeclina, bortezomib y su combinación por western blot.

Figura 27.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 con tigeclina, bortezomib y su combinación por histoenzimática de COX.

Figura 28.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 con tigeclina, bortezomib y su combinación por citometría de mitoTracker Green y Red.

Figura 29.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 con tigeciclina, bortezomib y su combinación por Seahorse.

Figura 30.- Evaluación de la inhibición mitocondrial con carfilzomib.

Figura 31.- Evaluación de la inhibición mitocondrial con la línea celular JJN3 R.

Figura 32.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular JJN3 R con tigeciclina, bortezomib y su combinación.

Figura 33.- Estudio de la inhibición de c-Myc con JQ1 en la línea celular JJN3.

Figura 34.- Estudio de sensibilización de la línea celular JJN3 R con JQ1 en combinación con bortezomib.

Figura 35.- Estudio de la actividad mitocondrial en las líneas celulares JJN3 y JJN3 R con bortezomib, JQ1 y su combinación.

Figura 36.- Estudio de sensibilización de las líneas celulares JJN3 y JJN3 R con tigeciclina en combinación JQ1.

Figura 37.- Estudio de lisis y de dosis respuesta con daratumumab y tigeciclina en la línea celular RPMI-8226.

Figura 38.- Estudio de la inhibición de CD38 con daratumumab en presencia o ausencia de PBMCs en la línea celular RPMI-8226.

Figura 39.- Estudio de la inhibición de CD38 con tigeciclina en presencia o ausencia de PBMCs en la línea celular RPMI-8226.

Figura 40.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con tigeciclina y daratumumab por western blot y por histoenzimática de COX.

Figura 41.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con daratumumab por citometría de mitoTracker Red.

Figura 42.- Estudio de la actividad mitocondrial en la línea celular RPMI-8226 con tigeciclina por citometría de mitoTracker Red.

Figura 43.- Expresión de los ligandos de NKG2D en PE tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

Figura 44.- Expresión de los ligandos de virales CD155 y CD112 en PE tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

Figura 45.- Expresión de HLA-E en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

Figura 46.- Expresión de los ligandos de apoptosis en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

Figura 47.- Expresión de los ligandos PD-L1 en PE y PD-L2 en APC tras el tratamiento de las líneas celulares JJN3 y RPMI-8226 con 33 μ M de tigeciclina.

Figura 48.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeciclina *ex vivo* con células primarias de pacientes con GSMI y MM.

Figura 49.- Estudio de la combinación de bortezomib y tigeciclina *in vivo* en ratones NSG injertados con la línea JJN3-ffLuc-GFP.

11. ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNmt: ADN mitocondrial
- ADNn: ADN nuclear
- ARNm: ARN mensajero
- ATP: adenosín trifosfato
- BRD4: inhibidor de bromodominio 4
- CI: índice de combinación (combinatiry index)
- COX: citocromo c oxidasa
- COXII: subunidad II de COX
- CP: célula plasmática
- DMSO: dimetilsulfóxido
- EE: error estándar de la media
- FDA: Food and Drug Administration
- FITC: fluoresceína 5-isotiocianato
- GFP: proteína fluorescente verde (green fluoresecent protein)
- GMSI: gammapatía monoclonal de significaco incierto
- HE: histoenzimática
- HLA-E: complejo mayor de histocompatibilidad E
- HNRNPK: ribonucleoproteina nuclear heterogénea K (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K)
- HR: hazard ratio (cociente de riesgo)

Ig: inmunoglobulina

IP: intraperitoneal

IVIS: in vivo imaging system

JJN3 BR: JJN3 resistente a bortezomib

LDHA: Lactato deshidrogenasa A

LDHB: Lactato deshidrogenasa B

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LMA: leucemia mieloide aguda

MM: mieloma múltiple

MO: médula ósea

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NK: asesina natural (natural killer)

NRF1: factor nuclear de la respiración 1 (Nuclear respiratory factor 1)

NSG: Nod Scid Gamma

OCR: oxygen consumption rate

OXFOS: fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD-L1: ligando de muerte celular programada 1 (Programmed cell death ligand 1)

PD-L2: ligando de muerte celular programada 2 (Programmed cell death ligand 2)

PE: ficoeritrina

PI: inhibidores del proteasoma

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

REC: recaída

RNAseq: secuenciación de ARN

ROS: especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

RT-PCR: PCR a tiempo real

SM: mieloma smoldering

SPF: supervivencia libre de progresión

TBS: Tris Buffer Salino

TFAM: factor de transcripción mitocondrial A (Transcription Factor A, Mitochondrial)

TUFM: factor mitocondrial Tu de la traducción (Tu translation elongation factor, mitochondrial)

WB: western blot

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1. TABLA DE PACIENTES

		GMSI (N=15)	SM (N=19)	MM (N=27)	Recaída (N=22)
Edad media (rango), años		67 (48-82)	78,9 (54-85)	70 (56-86)	66 (38-79)
Sexo, (%)	Hombre	40	36,8	59,3	50
	Mujer	60	63,2	40,7	50
CP MO, media % (rango)		7,87 (3-17)	22 (1,7-55)	39,2 (1-84)	42,4 (4-90)
CPP citometría %, media (rango)		1 (0,3-5)	5,36 (0,7-24)	9,2 (1,4-38,7)	15,4 (0,03-40)
Tipo de Ig de cadena pesada (suero)	no detectado	0	0	3,8	0
	IgG	46,7	61,1	69,2	68,2
	IgA	53,3	38,9	26,9	18,2
	IgM	0	0	0	13,6
	IgD	0	0	0	0
	biclonal	0	0	0	0
Tipo de Ig de cadena ligera (suero)	no detectado	0	0	0	0
	kappa	25	44,4	74,1	50
	lambda	75	55,6	25,9	45
	biclonal	0	0	0	4,5
Proteína M en suero, ≥ 3 gr/dl (%)		0	13,3	19	25
Proteína M en orina, detectada (%)		14,3	18,2	57,9	53,3
Kappa, (%)	$\geq 19,4$ mg/l	77,8	40	57,9	50
Lambda, (%)	$\geq 26,3$ mg/l	66,7	40	36,8	41,7
Ratio kappa/lambda, (%)	$< 0,26$ mg/l	22,2	13,3	21,1	30
	$\geq 0,26 <$ $1,65$ mg/l	22,2	53,3	0	0
	$\geq 1,65$ mg/l	55,6	33,3	78,9	70

Creatinina (%)	≥1,3 mg/dl	33,3	21,1	24,5	30,8
Calcio sérico (%)	≥11 mg/dl	0	5,3	1,9	4
LDH (%)	≥225 U/I	14,3	21,1	20,5	12
Albúmina (%)	≤2,8 g/dl	0	5,3	3,8	15,4
Refractoriedad, si (%)		NA	NA	31,8	50
Tipo de tratamiento previo (%)	Con PI	NA	0	0	59,1
	Sin PI	NA	100	100	40,9
Tipo de tratamiento posterior (%)	Con PI	NA	31,6	44,4	68,4
	Sin PI	NA	68,4	55,6	31,6
Categorías de mejor respuesta alcanzada*, (%)	MBRP	0	5,3	3,7	0
	RP	0	15,8	14,8	40
	RC	0	5,3	25,9	25
	RC EMR+	0	0	14,8	5
	RC EMR-	0	0	11,1	5
	EE	0	0	3,7	25
	NA	100	73,7	25,9	0

Principales características clínicas de los pacientes con mieloma múltiple incluidos en el estudio (N=83)

Frecuencias en porcentaje de varios parámetros clínicos de las muestras de pacientes empleadas en este trabajo.






Abreviaciones: CP: célula plasmática, EE: enfermedad estable, EMR-: enfermedad mínima residual negativa, EMR+: enfermedad mínima residual positiva, Ig: inmunoglobulina, IMWG: en inglés International Myeloma Working Group, LDH: lactato deshidrogenasa, MBRP: muy buena respuesta parcial, MO: médula ósea, NA: no aplica, PI: inhibidor del proteasoma, RC: respuesta completa, RP: respuesta parcial.

**La respuesta fue evaluada objetivamente al inicio de cada ciclo y confirmada por los médicos, mediante criterios de la IMWG.*

12.2. ANEXO 2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Article

Myc-Related Mitochondrial Activity as a Novel Target for Multiple Myeloma

Alejandra Ortiz-Ruiz ^{1,2,†}, Yanira Ruiz-Heredia ^{1,2,†}, María Luz Morales ^{1,2}, Pedro Aguilar-Garrido ^{1,2}, Almudena García-Ortiz ^{1,2}, Antonio Valeri ^{1,2}, Carmen Bárcena ³, Rosa María García-Martin ³, Vanesa Garrido ^{1,2}, Laura Moreno ^{1,2}, Alicia Gimenez ^{1,2}, Miguel Ángel Navarro-Aguadero ¹, María Velasco-Estevez ¹, Eva Lospitao ⁴, María Teresa Cedena ², Santiago Barrio ^{1,2}, Joaquín Martínez-López ^{1,2,‡}, María Linares ^{1,2,5,‡} and Miguel Gallardo ^{1,2,*,‡}

- ¹ H12O-CNIO Hematological Malignancies Clinical Research Unit, CNIO, 28029 Madrid, Spain; maortiz@cnio.es (A.O.-R.); yanira_heredia@altumsequencing.com (Y.R.-H.); mlmorales@cnio.es (M.L.M.); paguilar@cnio.es (P.A.-G.); a.garcia.imas12@h12o.es (A.G.-O.); avaleri27@yahoo.es (A.V.); gvaneg@hotmail.com (V.G.); lmorenos@salud.madrid.org (L.M.); gimenezsa.imas12@h12o.es (A.G.); manavarro@cnio.es (M.Á.N.-A.); mvelasco@tcd.ie (M.V.-E.); santiago_barrio@altumsequencing.com (S.B.); jmarti01@med.ucm.es (J.M.-L.); mlinares@ucm.es (M.L.)
- ² Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; mariateresa.cedena@salud.madrid.org
- ³ Pathology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; carmen.barcena@salud.madrid.org (C.B.); rgarciamartin4@salud.madrid.org (R.M.G.-M.)
- ⁴ CNIO-Lilly Cell Signalling and Immunometabolism Section, CNIO, 28029 Madrid, Spain; eplospitao@cnio.es
- ⁵ Biochemistry and Molecular Biology Department, Pharmacy School, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: mgallardod@cnio.es
- † Contributed equally as co-first authors.
- ‡ Contributed equally as co-senior authors.



Citation: Ortiz-Ruiz, A.; Ruiz-Heredia, Y.; Morales, M.L.; Aguilar-Garrido, P.; García-Ortiz, A.; Valeri, A.; Bárcena, C.; García-Martin, R.M.; Garrido, V.; Moreno, L.; et al. Myc-Related Mitochondrial Activity as a Novel Target for Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 1662. <https://doi.org/10.3390/cancers13071662>

Academic Editor: Aldo M. Roccaro

Received: 28 February 2021

Accepted: 29 March 2021

Published: 1 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Multiple myeloma represents the cancer with the 21st highest global incidence. The rapid acquisition of drug resistance to proteasome inhibitors requires a deep knowledge on the mechanisms involved in proliferation in order to provide novel targets for the disease. The aim of our study was to characterize the mitochondrial activity in primary multiple myeloma (MM) cells along the course of the disease and to provide a therapeutic alternative to inhibit Myc function by blocking OXPHOS metabolism. We confirmed MM patients show enhanced mitochondrial activity linked to c-Myc expression. The use of tigecycline provides evidence for a novel strategy addressing c-Myc functionality by mitochondrial activity inhibition.

Abstract: Mitochondria are involved in the development and acquisition of a malignant phenotype in hematological cancers. Recently, their role in the pathogenesis of multiple myeloma (MM) has been suggested to be therapeutically explored. MYC is a master regulator of b-cell malignancies such as multiple myeloma, and its activation is known to deregulate mitochondrial function. We investigated the impact of mitochondrial activity on the distinct entities of the disease and tested the efficacy of the mitochondrial inhibitor, tigecycline, to overcome MM proliferation. COXII expression, COX activity, mitochondrial mass, and mitochondrial membrane potential demonstrated a progressive increase of mitochondrial features as the disease progresses. In vitro and in vivo therapeutic targeting using the mitochondrial inhibitor tigecycline showed promising efficacy and cytotoxicity in monotherapy and combination with the MM frontline treatment bortezomib. Overall, our findings demonstrate how mitochondrial activity emerges in MM transformation and disease progression and the efficacy of therapies targeting these novel vulnerabilities.

Keywords: multiple myeloma; mitochondria; tigecycline; MYC

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy of plasma cells that accounts for 1% of all cancers and ~10% of all blood cancers [1]. Despite extensive efforts to improve the survival of patients with MM, current therapies are unsatisfactory and ~50% of patients quickly develop resistance and relapse [2]. Several novel treatments have been tested for relapsed MM, however, a better understanding of the molecular mechanisms that control the onset and progression of malignant MM is needed to develop more specific and effective interventions.

One of the most recognized molecules involved in the pathogenesis of MM is MYC gene deregulation. MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-MYC) is an oncogene with many important functions at the cellular and nuclear levels, whose activation regulates several genes involved in mitochondrial transcription, mitochondrial translation, protein import, and complex assembly [3,4]. MYC has been described as a proto-oncogene involved in many cancers, including leukemia and lymphoma [5–7]. In MM, it is known that aberrant expression of MYC is due to recurrent chromosomal alterations [8] and previous studies have demonstrated that its expression is involved in MM progression from early stages of plasma cell dyscrasias, including monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM), to MM [9]. Several authors have reported that MYC deregulation is involved in disease progression and has been related with poor progression-free survival in MM patients [10]. Moreover, MYC direct transcription has been described as promoting changes in mitochondrial dynamics that influence therapy resistances [11]. However, MYC is a protein that traditionally could not be targeted pharmacologically. In this context it has been proposed that synthetic lethal interactions with MYC could be exploited as an alternative to target it. In this case, Hsieh has proposed that nutrient deprivation leads to cell death as MYC-overexpressing cells are glucose- and glutamine-addicted [12]. Previous studies have reported that MM is dependent on glutamine for survival, and that also depends on MYC expression [13]. It is known that MYC overexpression has exaggerated effects on mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism, and sensitivity to OXPHOS inhibitors [14]. Previous studies have demonstrated that MM patients have increased mitochondrial biogenesis compared to normal plasma cells, and corroborated that MYC promoted this process [15]. In this context, control of MYC expression has been proposed to be a meaningful achievement in the fight against MM [9]. As strategies to directly target MYC have not been reached until now, key targets involved in MYC deregulation have been exploited as new approaches to treat MYC-driven malignancies.

Mitochondria are bioenergetics and biosynthetic organelles that control several crucial cellular pathways, including growth, proliferation, and apoptosis [16,17]. Numerous studies have evaluated the role of mitochondrial DNA (mtDNA) alterations in cancer, and modifications in mitochondrial content, structure, function, activity [5,18], and respiration [19], all of which seem important for cancer progression. Indeed, mitochondria are essential for tumor formation and growth, and their dysfunction promotes tumor cell metastasis [20]. Oxidative phosphorylation (OXPHOS) was traditionally believed to be downregulated in all cancers, but recent studies have demonstrated that some cancers show an upregulation, particularly in hematological cancers, reviewed in [21,22]. Accordingly, cancer has been characterized as an altered state of energy metabolism involving genetic alterations in nuclear DNA (nDNA), in mitochondrial DNA (mtDNA), and in mtDNA copy number (mtDNA CN) [20,23,24], and metabolic reprogramming based on shifts in OXPHOS activity, representing a hallmark of malignancy and cancer progression [23].

There is a crucial need to identify new cellular targets and/or pathways that regulate metabolic reprogramming during MM cell growth and progression and, in this respect, addressing mitochondrial activity represents a novel pathway to target this vulnerability [24].

Tigecycline is a glycylicycline class antibiotic with similar structure to tetracyclines. The mechanism of action of tigecycline is the protein translation inhibition by 30S ribosomal unit binding, with high activity against gram-negative and gram-positive bacteria.

However, tigecycline is also known to inhibit mitochondrial oxidative phosphorylation, by suppressing COXI and COXII, and inhibiting mitochondrial activity, translation, and biogenesis. This, and other molecular mechanisms that are not well-known, impacts against cancer cells, and its use in different tumors has been suggested [25].

Here, we explored the enhanced mitochondrial activity features in MM development and tested the therapeutic effect of the OXHPOS inhibitor, tigecycline, on MM, a MYC-driven malignancy. Our study identified a novel vulnerability of MYC through mitochondrial activity regulation to avoid MM progression.

2. Materials and Methods

2.1. Myeloma Cell Lines and Primary Multiple Myeloma Samples

A total of 110 samples from 83 patients were collected in accordance with the Declaration of Helsinki and with the approval of the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain). Written consents were obtained from patients for tissue collection. Clinical data of patients are summarized in Table 1 and Table S1. All primary MM specimens were obtained from bone marrow, and cylinders and aspirates were processed for further analysis. Cylinders were fixed and processed for COXII (cytochrome c oxidase subunit II) immunohistochemistry. Aspirates were processed by standard Ficoll-Paque density centrifugation. Plasma cells were purified by magnetic-activated cell sorting with CD138+ microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Fresh bone marrow myeloma cells (BMMCs) were cultured in RPMI medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), penicillin/streptomycin (Lonza, Basel, Switzerland), and 6% plasma from the same patient.

Table 1. Main characteristics of multiple myeloma (MM) patients included in the study (N = 83).

MM Patients Clinical Variables		MGUS (N = 15)	SMM (N = 19)	NDMM (N = 27) ^a	RRMM (N = 22)
Median age (range), years		65 (48–82)	76 (54–85)	68 (50–86)	65.5 (38–79)
Sex, (%)	Male	40	36.8	59.3	50
	Female	60	63.2	40.7	50
PC BM, average % (range)		7.87 (3–17)	22 (1.7–55)	39.2 (1–84)	42.4 (4–90)
PPC MFC %, average (range)		1 (0.3–5)	5.3 (0.7–24)	9.2 (1.4–38.7)	15.4 (0.03–40)
Type of Ig heavy chain (serum)	nondetected	0	0	3.8	0
	IgG	46.7	61.1	69.2	68.2
	IgA	53.3	38.9	26.9	18.2
	IgM	0	0	0	13.6
	IgD	0	0	0	0
	biclonal	0	0	0	14.8
Type of Ig light chain (serum)	nondetected	0	0	0	0
	kappa	25	44.4	74.1	50
	lambda	75	55.6	25.9	45.5
	biclonal	0	0	0	4.5
Serum M-spike, ≥3 g/dL (%)		0	13.3	19	25
Urine M-spike, detected (%)		14.3	18.2	60	53.3
	Kappa, (%)	≥19.4 mg/L	77.8	40	57.9
	Lambda, (%)	≥26.3 mg/L	66.7	40	36.8
Free kappa/lambda ratio, (%)	<0.26 mg/L	22.2	13.3	21.1	30
	≥0.26 <1.65 mg/L	22.2	53.3	0	0
	≥1.65 mg/L	55.6	33.3	78.9	70
Creatinine (%)	≥1.3 mg/dL	33.3	21.1	30.8	13.6
Serum calcium (%)	≥11 mg/dL	0	5.3	4	0
LDH (%)	≥225 U/I	14.3	21.1	12	23.8
Albumin (%)	≤2.8 g/dL	0	5.3	15.4	4.5

Table 1. Cont.

MM Patients Clinical Variables	MGUS (N = 15)	SMM (N = 19)	NDMM (N = 27) ^a	RRMM (N = 22)
Immunoparesis, yes (%)	18.2	35.7	84.2	87.5
Refractory, yes (%)	NA	NA	31.8	50
Type of prior treatment (%)				
with PI	NA	0	0	59.1
without PI	NA	100	100	40.9
Type of following treatment (%)				
with PI	NA	31.6	44.4	68.4
without PI	NA	68.4	55.6	31.6
Best response categories *, (%)				
VGPR	0	5.2	3.7	0
PR	0	15.8	14.8	40
CR	0	5.3	25.9	25
CR MRD+	0	0	14.8	5
CR MRD−	0	0	11.1	5
SD	0	0	3.7	25
NA	100	73.7	25.9	0

Percentage frequencies of several clinical parameters from sample patients used in this study. Abbreviations: BM, bone marrow; CR, complete response; Ig, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenated; MRD−, minimal residual disease negative; MRD+, minimal residual disease positive; NA, not applicable; NDMM, newly diagnosed multiple myeloma; PC, plasma cell; PI, proteasome inhibitors; PR, partial response; RRMM, relapsed multiple myeloma; SD, stable disease; VGPR, very good partial response. * Objective response was assessed at the start of each cycle and confirmed by the physicians, using IMWG criteria. ^a NDMM patients englobe newly diagnosed and follow-up patients.

Three human myeloma cell lines (JJN3 S, L363, and OPM2) were obtained from the DSMZ cell repository (Braunschweig, Germany). Cell lines were expanded and cryogenically frozen upon acquisition to establish stocks in liquid nitrogen until use. The RPMI-8226 cell line was kindly provided by Christopher Driessen (Kantonsspital, St. Gallen, Switzerland) and NCI-H929 cells were a kind gift from Joaquin Teixidó (CIB, Madrid, Spain). JJN3 BR cells were established by dose escalation of bortezomib once-weekly for a period of five months. JJN3 S cells were lentivirally transduced with a third-generation pRLLuc/GFP virus and helper plasmids (pMDLg/RRE, pREV, and VSV-G). Vector titration was performed using dilutions of lentiviral supernatants. Cells expressed firefly luciferase and GFP in a fusion protein driven by the CMV promoter. GFP+ cells were detected by flow cytometry and quantitative real-time PCR (qPCR), followed by sorting on a FACS BD INFLUX cell sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). All cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator, in an atmosphere of 5% CO₂, and passaged every 2–3 days. Cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin.

2.2. MYC Gene Expression Analysis

We analyzed RNAseq data from a total of 770 samples of patients with MM at diagnosis from the CoMMpass repository. The data were generated as part of the publicly available Multiple Myeloma Research Foundation Personalized Medicine Initiatives (<https://research.themmr.org>, accessed on 22 April 2020) with the identifier IA14, under “Code availability”. We ran the molecular gene view on the entire dataset to study the expression of MYC. Kaplan–Meier curves of PFS were plotted with balanced stratification of high and low expression of the gene studied.

2.3. RNA and DNA Extraction and Quantitative PCR (qPCR)

We extracted RNA and DNA from purified plasma cells (CD138+) using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Evaluation of the mtDNA CN was performed with DNA extracted from 5 MM cell lines (OPM2, L363, RPMI8226, NCI-H929, and JJN3) and the ratio between mtDNA and nDNA was examined using the 12 S mitochondrial probe and the RNAsP nuclear probe, respectively, as described [26]. Gene expression was studied from the extracted RNA and processed into cDNA to quantify the expression of MYC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), while beta-D-glucuronidase (GUSB, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as a housekeeping gene. This dataset included 47 samples from Hospital 12 de Octubre patients: 9 MGUS, 9 SMM, 18 NDMM, 11 RRMM, and 3 MM cell lines, which were profiled using TaqMan probes. qPCR

was performed on an ABI PRISM 7900HT instrument (Applied Biosystems; Grand Island, NY, USA) with TaqMan gene expression (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) assays in triplicate using SDS 2.2 software (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). The relative amount of targets was determined by the comparative Ct method [27].

2.4. Optical Microscopy

For immunocytochemistry analysis, paraffin-embedded sections (0.5 μm) were deparaffinized with xylene, rehydrated with graded ethanol, and stained with an antimicrotubule antibody (MTC02; Abcam, Cambridge, UK), followed by DAB development. Sections were then counterstained with hematoxylin and mounted with DPX (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Images were classified on an intensity scale of 0–2, with 2 being the highest intensity stain (2: positive cells [Grade II]; 1: positive cells [Grade I]; 0: negative cells). Stained whole samples were assessed under double-blinded conditions. All slides were evaluated in conventional light-field microscopy, objective 40X, using an optical microscope (Olympus AX70), and analyzed with the Olympus Cellsens software. The dataset included 4 MGUS, 7 SMM, 13 NDMM, and 11 RRMM samples. For the histochemical assay, fresh samples (CD138 + BMMCs) were spun onto a slide by cytospin centrifugation ($700\times g$, 5 min, Shandon Single Cyto Slides™; ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Thereafter, slides were incubated in a rehydrated COX (cytochrome C oxidase enzyme) solution (Bio-Optica, Milan, Italy) at 37 °C for 1 h and 30 min, and were then counterstained with Carazzi's hematoxylin for 2 min (Panreac, Barcelona, Spain). Detection was performed using the same microscope Olympus AX70 objective 100X on 18 patient samples (4 MGUS, 5 SMM, 5 NDMM, and 4 RRMM) and 5 MM cell lines (OPM2, L363, RPMI8226, NCI-H929, and JJN3). Quantification of the stained cells was manually assessed under double-blinded conditions, providing for each slide a score based on a scale from 0 to 4 (Grade 0: no stain; Grade 1: low stain; Grade 2: medium stain; Grade 3: high stain; Grade 4: very high stain).

2.5. Multiparametric Flow Cytometry Analysis

Erythrocyte-lysed whole BMMCs, JJN3 S, and JJN3 BR cell lines were studied by flow cytometry. All events from the distinct conditions applied to BMMCs were analyzed and 10,000 events for each condition in the case of experiments with cell lines. Plasma cell (PC) population CD38+/CD138+ was assessed to detect variations of GeoMean PCs after 48-h treatment with tigecycline (3.7 μM), bortezomib (2 nM), and their combination. Cells were incubated for 30 min at room temperature with CD38 FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and CD138 PE-Cy7 (Biolegend, San Diego, CA, USA). Data from the different treatments were normalized to samples with no treatment. Moreover, mitochondrial content and membrane potential were analyzed with MitoTracker Green and Mitotracker Red probes from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA), respectively. JJN3 S, JJN3 BR cells, and BMMCs were incubated for 10 min at 37 °C with 150 nM MitoTracker Green and with 150 nM MitoTracker Red, followed by a PBS wash. Additionally, Mitotracker Green and Mitotracker Red were assessed over JJN3 S and JJN3 BR after 48-h exposure to tigecycline (3.7 μM), bortezomib (2 nM), and their combination or JQ1 (78 nM), bortezomib (2 nM), and their combination. Death cells were stained with DAPI.

2.6. In Vitro and Ex Vivo Drug Assays

The effect of tigecycline (Selleckchem, Houston, TX, USA) on cell viability and mitochondrial activity was assessed in MM cell lines (JJN3, JJN3 BR). Bortezomib was also purchased from Selleckchem and both drugs were diluted in DMSO. JQ1 was kindly provided by the Pharmacy Department at Hospital 12 de Octubre. Cells were seeded at 1×10^6 cells/mL in 96-well plates. Cell lines and CD138+ BMPCs were treated for 48 h with bortezomib and/or tigecycline (0.1% DMSO), JQ1, or vehicle. For drug synergy calculation, a range of serial dilutions of tigecycline were made across the IC50 value. For bortezomib, only one concentration (2 nM) was selected for the combinatory assays. The agents were then added simultaneously for 48 h and cell viability assays were performed.

Additionally, we performed a “conditioning + treatment” assay, with a 48-h pretreatment of tigecycline (33, 11, and 3.7 μM) followed by 48-h bortezomib treatment of five serial dilutions. Quantitative analysis of dose–effect relationships of bortezomib and tigecycline were determined after measurement of cell growth using the cell-permeant dye Calcein-AM (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) (100 μM). The signal intensity of the stained cells was monitored at 496 nm (excitation) and 516 nm (emission) using the EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) [28]. Viability data were normalized to those of DMSO controls. Potential synergistic or additive effects were calculated using CompuSyn software (ComboSyn Inc., Biosoft; Cambridge, UK). Drug synergism, addition, and antagonism effects were defined by combination index values of <1.0 , 1.0 , and >1.0 , respectively. The Chou–Talalay Combination Index Theorem was used to calculate the combination index (CI) of bortezomib and tigecycline [29].

2.7. Western Blotting

Cells were harvested after stimulation and then lysate in RIPA buffer. Lysates were cleared by centrifugation ($14,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) and protein concentration was determined by Bradford Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Samples were normalized to 46.7 μg of total proteins and loaded onto 10% SDS-PAGE gels followed by transfer onto a PVDF membrane. Blots were incubated with primary and secondary antibodies (listed in Table S2). An antibody to β -actin or GAPDH was used to check for equivalent protein loading. Membranes were developed by enhanced chemiluminescence (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and the protein bands were detected with a ChemiDoc MP instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Densitometry was performed with Image Lab software, normalized to the signal of β -actin or GAPDH, and normalized to the control, set as one. Uncropped Western blot data are attached as Figure S4.

2.8. Animal Model

A MM xenograft mouse model was used for the in vivo study. The animal study was conducted according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committees of the Comunidad de Madrid, Spain, under an approved protocol (PROEX 023/17). Female 6–8 week-old NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice (Vivotecnia, Madrid, Spain) were inoculated intravenously by tail vein injection with JJN3-ffLuc-GFP cells (1×10^6). Four days later, mice were randomized into four groups of 10 animals—(1) the first group received intraperitoneal injections of vehicle (0.9% saline solution) five days a week; (2) the second group received 0.2 mg/kg bortezomib intraperitoneally five times weekly for four weeks; (3) the third group received intraperitoneal injections of tigecycline five times weekly for four weeks at increasing doses, 50–50–75–100 mg/kg/week (starting at 50 mg/kg for the first two weeks, followed by 75 mg/kg for the third week, and 100 mg/kg for the fourth week); (4) the fourth group was treated with a combination of bortezomib and tigecycline, five times weekly, the first two weeks with 0.2 mg/kg bortezomib and 50 mg/kg tigecycline, and the following weeks with increasing doses of tigecycline (third week: 75 mg/kg; fourth week: 100 mg/kg). Five mice of each treatment group were monitored for tumor burden, distribution, and engraftment every week by IVIS whole-body bioluminescence imaging. Bioimaging of MM burden in vivo was performed by IVIS Imaging system (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA). Before the acquisition, Luciferin (D-luciferin monosodium salt, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) was prepared in PBS and 150 mg/kg and was injected intraperitoneally, with luminescence signal detection 10 min later. The signal data were analyzed using Living Image 4.2 (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA) software.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Software Inc. (version 6.0, La Jolla, CA, USA). All data are presented as the mean \pm SEM and are representative of three

independent experimental replicates ($N = 3$). Normally distributed data were analyzed by unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA. For nonparametric data, the Mann–Whitney test was used to compare two groups. For more than two independent samples, statistical comparisons were carried out using the nonparametric method Kruskal–Wallis test, when the distribution was not normal. The major clinicopathological characteristics and available treatment information of the patients are presented in Table 1 and Table S1 and summarized by frequency and percentage. PFS were analyzed by Kaplan–Meier curves. *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Patients with Newly Diagnosed and Relapsed MM Exhibit Elevated Myc Expression Features

We first assessed MYC gene expression in a dataset of patients with NDMM. Using RNAseq CoMMpass data of 770 patients [30], we observed that PFS was significantly decreased when MYC was overexpressed (hazard ratio [HR] 1.18), as illustrated in Figure 1A. Additionally, we performed differential MYC expression along the distinct MM entities. The pattern of increased overexpression of MYC was progressive, revealing a significant increase in those patients with NDMM, and a more noticeable one in RRMM, as is evident in Figure 1B.

As the activity of respiratory enzymes is a well-defined approach for investigating mitochondrial dysfunction [31], we next quantified the expression of the cytochrome c oxidase subunit II (COXII) and the activity of the enzyme COX, which is essential for mitochondrial function. COXII is one of the three mtDNA-encoded subunits of the respiratory complex IV and part of the functional core of the enzyme complex. Quantification of the protein by immunohistochemistry (IHC) in Figure 1C revealed the overexpression of COXII in progressed MM groups (p value < 0.0001). We also confirmed in Figure 1D that COX enzyme activity was significantly higher in the NDMM and RRMM groups than in the MGUS and SMM groups (p value < 0.0001), as revealed by the greater intensity of the stain. As previously reported, there is a clear correlation between COX activity and the protein content of COXII [32]. Given its role as the rate-limiting step of the respiratory chain [33], the overexpression of COXII is an indicator of the high oxidative capacity of the cells.

Additionally, we assessed total mitochondrial mass and membrane potential in CD138 + BMMCs using MitoTracker Green and Red, respectively. Both probes revealed higher staining in patients with NDMM than in patients with a premalignant stage (MGUS), as confirmed in Figure 1E. See Table 1, Table 2 and Table S1, for patient clinic characteristics pertinent to the entire analysis. Overall, these results point to a role for mitochondria in MM, as revealed by an increase in the mitochondrial burden that enhances mitochondrial activity as the disease progresses.

Table 2. Classification of samples included in the study ($N = 110$) according to the analysis performed.

Method	MGUS ($N = 15$)	SMM ($N = 19$)	NDMM ($N = 27$)	RRMM ($N = 22$)
Total samples, N	21	21	42	26
gene expression	9	9	18	11
IHC	4	7	13	11
HE	4	5	5	4
MFC	4	0	6	0

Abbreviations: HE, histoenzymatic; IHC, immunohistochemistry; MFC, multiparametric flow cytometry.

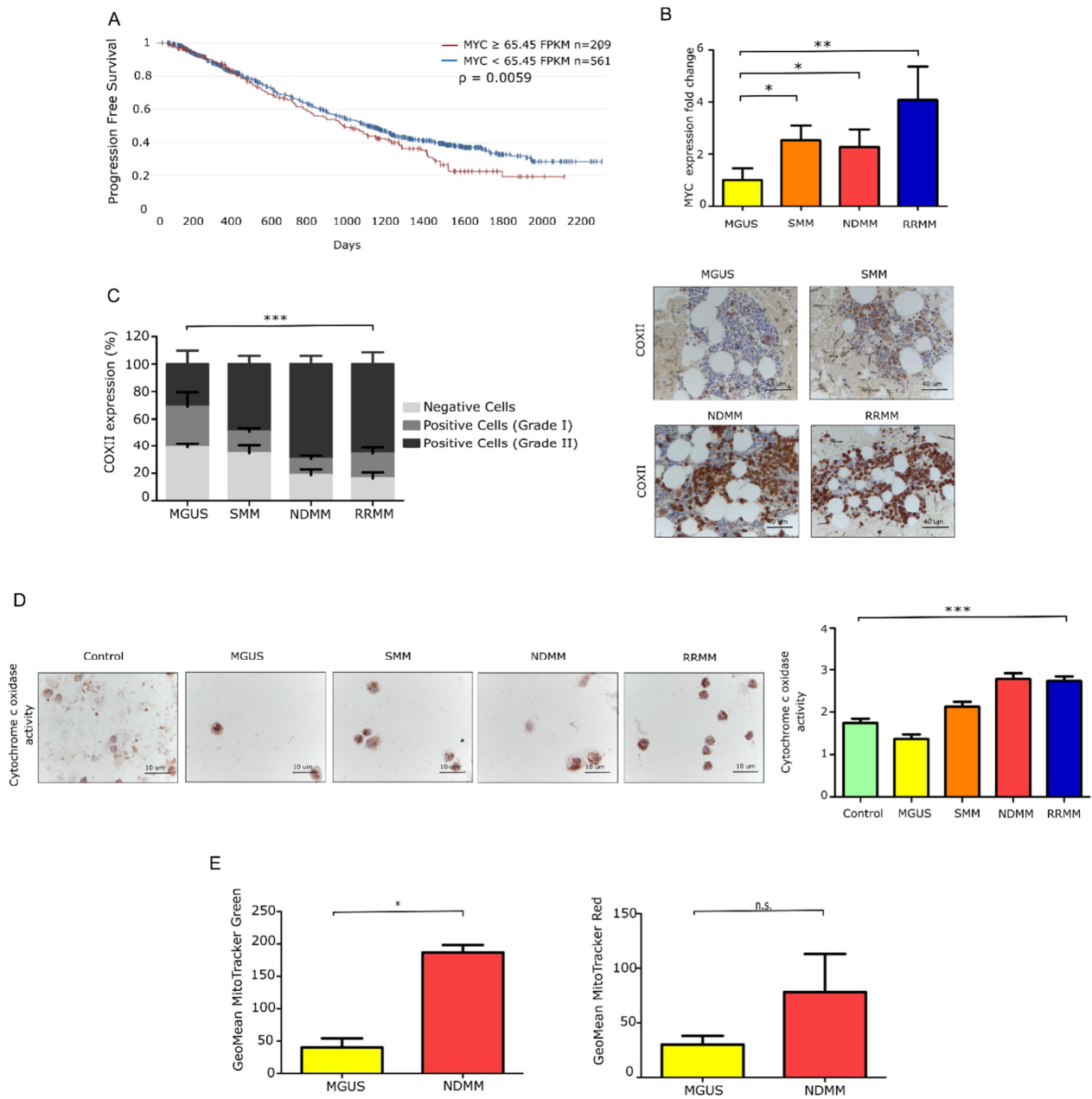


Figure 1. Mitochondrial features in primary MM cells from distinct myeloma entities. **(A)** Progression-free survival (PFS) of MM patients from the CoMMpass study (IA14) stratified according to MYC gene expression. **(B)** Fold-change in gene expression of MYC relative to GUS B expression (MGUS $N = 9$; SMM $N = 9$; NDMM $N = 18$; RRMM $N = 11$). Data are presented as mean values \pm SEM of technical triplicates. **(C)** Intracellular expression of COXII in samples from MM patients ($N = 4$ MGUS, $N = 7$ SMM, $N = 13$ NDMM, and $N = 11$ RRMM). Microscopy analysis of the immunohistochemistry (IHC) slides from bone marrow samples (p value = 0.0001). Representative images addressing differences in COXII expression between patients at different stages of the disease. Scale bar, 40 μ m. Data are presented as mean values \pm SEM. Statistical significance was assessed using two-way ANOVA. **(D)** Histochemical reaction to cytochrome c oxidase enzyme (HE-COX) in donors and patients across the different stages of the disease ($N = 2$ donor, $N = 4$ MGUS, $N = 5$ SMM, $N = 5$ NDMM and $N = 4$ RRMM). Relative HE-COX scores in fresh plasma cells (CD138+) ranging from Grade 0: no stain; Grade 1: low stain; Grade 2: medium stain; Grade 3: high stain; Grade 4: very high stain. Representative images show different intensity stains related to enzyme activity. Data are presented as mean values \pm SEM. **(E)** Mitochondrial mass and membrane potential in MM patients ($N = 3$ MGUS, $N = 3$ NDMM), assessed by flow cytometry. Data represent the geometric mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, n.s. no significance.

3.2. Mitochondrial Inhibition Is Cytotoxic to MM Cells In Vitro and Synergizes with Bortezomib

To determine the most appropriate in vitro model to test the effect of mitochondrial inhibition on MM, we first characterized five MM cell lines according to their mtDNA load and mitochondrial COX activity, as shown in Figure 2A,B. For viability assays, we selected the JJN3 cell line, which displayed the highest mitochondrial burden and activity and also high levels of MYC expression (Figure 2C).

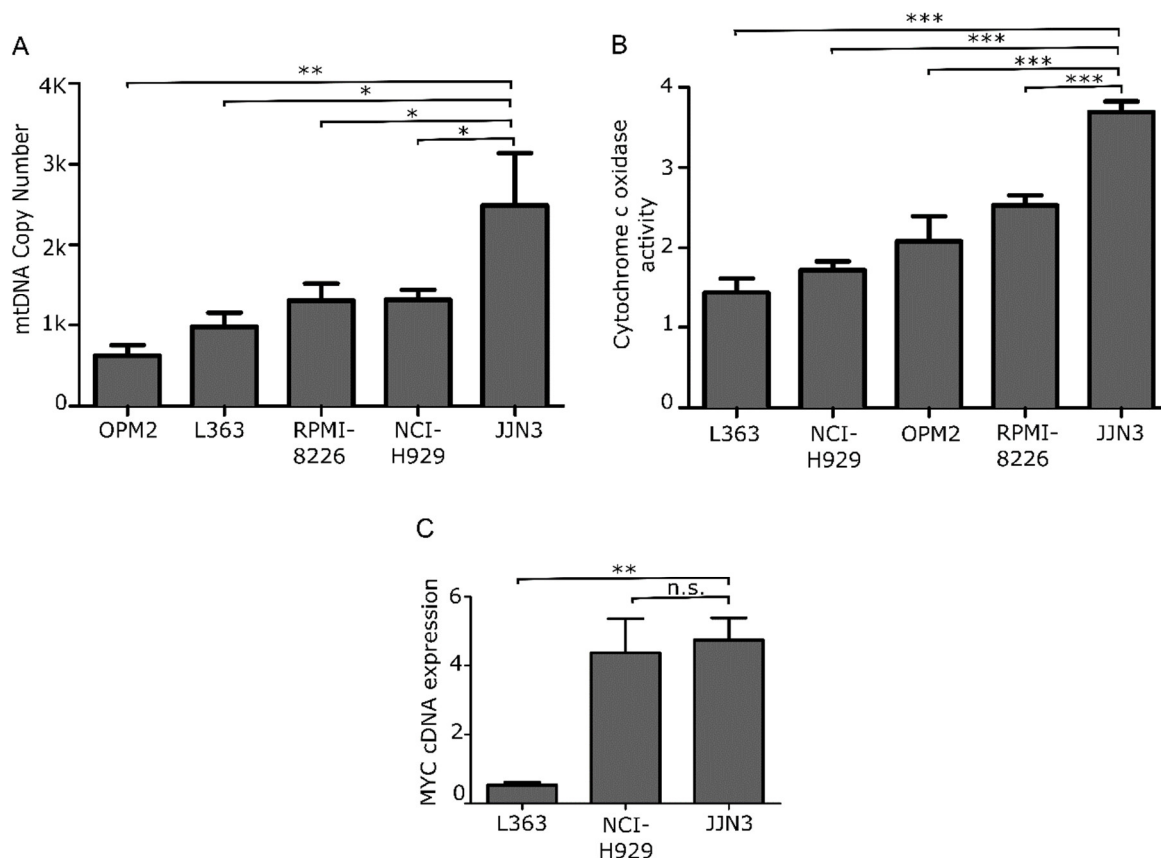


Figure 2. Mitochondrial features in MM cell lines. (A) mtDNA CN analysis and (B) HE-cox assay quantification in 5 MM cell lines. (C) Fold-change gene expression level of MYC in L363, NCI, and JJN3 cell lines relative to GUS B expression. Data are presented as mean values \pm SEM of technical triplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, n.s. no significance.

We next interrogated high mitochondrial activity as a novel vulnerability in c-Myc-driven MM. First, we tested the impact of the mitochondrial inhibitor tigecycline alone or in combination with the frontline drug bortezomib in JJN3 cells, which are bortezomib-sensitive (JJN3 S). Inhibitory assays represented in Figure 3A demonstrated cytotoxic effects of tigecycline in monotherapy ($IC_{50} = 21.3 \mu M$) and in combination with bortezomib, at 48 h. To quantify the effect of the combination, we performed a synergy analysis, applying the Chou–Talalay method. All doses studied showed high combination indexes ($CI < 0.5$). Additionally, we tested the sensitizing effect of tigecycline to bortezomib. A 48-h treatment with tigecycline before a consecutive 48-h treatment with bortezomib highlighted the possibility to also target progressed patients, due to successful sensitization to bortezomib with prior tigecycline treatment as shown in Figure 3B.

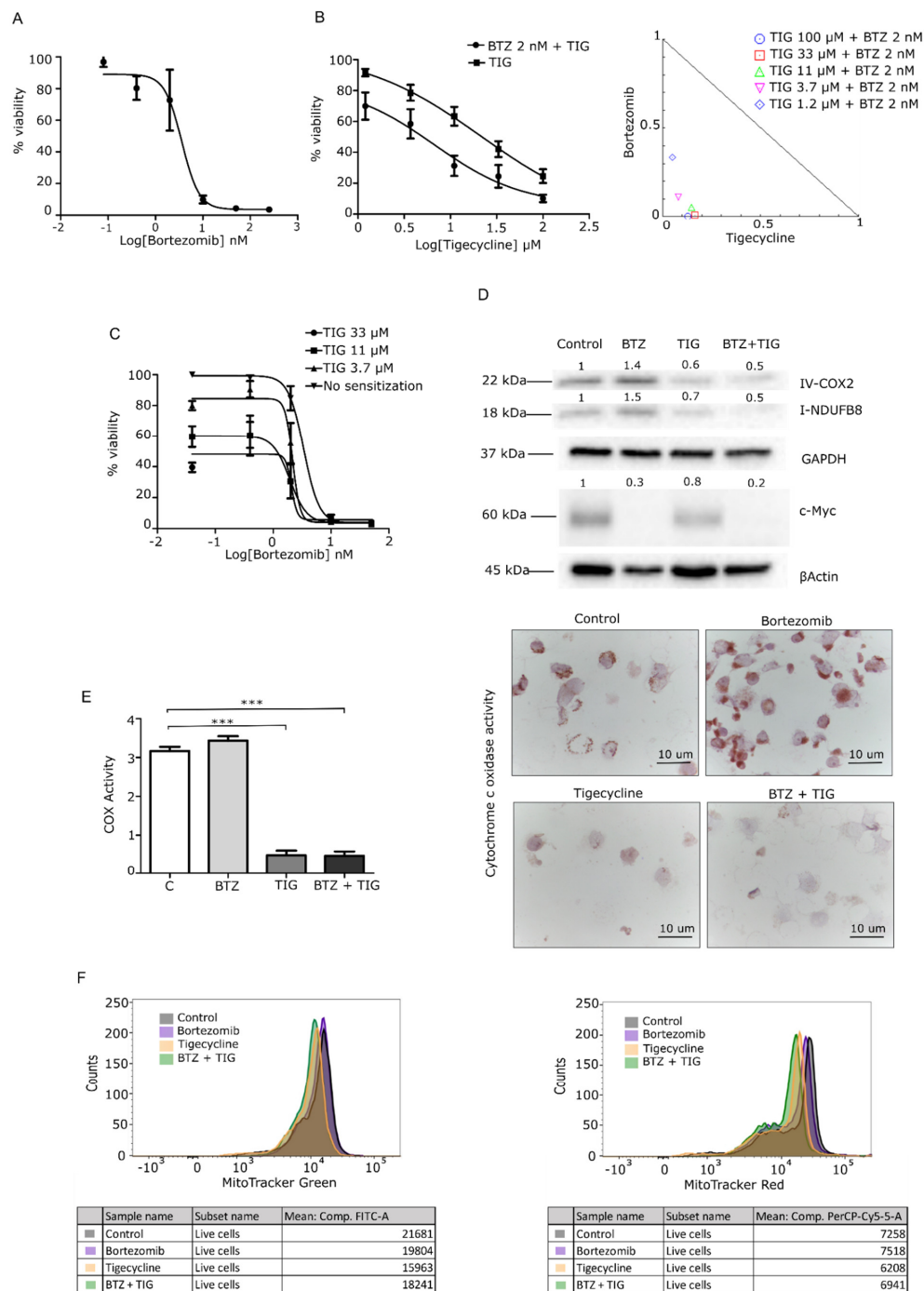


Figure 3. Tigecycline and the combination with bortezomib inhibits cancer cell growth and mitochondrial activity in the JJN3 cell line. (A) Cells were treated with a dose range of 0–250 nM of BTZ, and viability was determined using the calcein cytotoxic assay. (B) Cells were treated with a dose range of 0–100 μ M of TIG with/without 2 nM BTZ, and viability was determined using the calcein cytotoxicity assay. TIG showed an IC₅₀ of 21.3 μ M in JJN3 cells, and the combination decreased threefold the IC₅₀ value (6.6 μ M). Isobologram plot of the combination; dots indicate the combinatory index (CI) of each combinatory dose. (C) IC₅₀ curve after treating cells for 48 h with TIG for consecutive 48 h with bortezomib. Data are normalized to the negative control (DMSO) and presented as mean values \pm SEM of technical triplicates. (D–F) molecular validation of mitochondrial inhibition of JJN3 cells treated with 3.7 μ M TIG, 2 nM BTZ, or both (combination). All of the drug treatments were for 48 h; *N* = 1 independent biological repeat. (D) WB of respiratory chain complexes I and IV and c-Myc. (E) HE-COX analysis in >10 cells per sample. (F) Multiparametric flow cytometry (MFC) analysis of MitoTracker green (left, mitochondrial mass) and Red (right, mitochondrial membrane potential). Representative histograms show cell counts for each probe on the different treatment conditions. *** *p* < 0.0001.

To identify the mechanism of action of mitochondrial inhibition by tigecycline, we determined the protein levels of MYC and complexes of the respiratory chain. Western blot (WB) analysis, represented in Figure 3C, revealed a remarkable decrease in the levels of complex I and IV subunits upon exposure to tigecycline. Hence, the combination with bortezomib showed a similar reduction of the complexes' expression and additional reduction of c-Myc expression.

To corroborate the finding that a reduction in complex IV abundance was concomitant with a reduction in enzyme activity, we performed a histoenzymatic assay of cytochrome c oxidase (HE-COX). Interestingly, we observed that tigecycline alone or in combination with bortezomib led to a loss of COX activity, as shown in Figure 3D.

Then, we investigated mitochondrial mass and membrane potential, two parameters of mitochondrial status. Mean fluorescence intensity showed a decrease in both parameters in those cells treated with tigecycline and the combination, as represented in Figure 3E. By contrast, the fluorescence was essentially unchanged in the bortezomib-treated (Figure 3E) and carfilzomib-treated (Figure S1A) groups. Overall, these data indicate that bortezomib reduces c-Myc, while tigecycline reduces mitochondrial activity, and the combination triggers both c-Myc and mitochondrial activity reduction.

Additionally, we assessed the mitochondrial inhibitory effect of tigecycline on the resistant JJN3 cell line (JJN3 BR). We found a cytotoxic effect using similar doses as those employed in the sensible counterpart (Figure S2A). Moreover, the assessment of mitochondrial features of JJN3 BR cells exposed to tigecycline or the combination with bortezomib revealed also the same trends found with JJN3, as the complexes of the respiratory chain, the cox activity, and the mitochondrial membrane potential appeared reduced, as shown in Figure S2C.

To confirm that mitochondrial activity blockade is an alternative to inhibit a c-Myc-driven mechanism in an indirect manner, and thereby a novel vulnerability, we examined the effects of an alternative c-Myc indirect inhibition independent of mitochondria by the use of JQ1, a bromodomain BRD4 inhibitor that reduces c-Myc levels. The efficacy of JQ1 in monotherapy in JJN3 S and JJN3 BR cells was confirmed by a similar decrease of viability (Figure S3A). Moreover, the cytotoxicity of JQ1 was enhanced when combined with bortezomib (Figure S3B). WB confirmed a decrease in c-Myc levels in cells treated with bortezomib, JQ1, and bortezomib + JQ1. Complex I and IV of OXPHOS expression were not reduced in JQ1-treated cells, nor in the combination with the bortezomib group. Moreover, HE-COX and MitoTracker Red staining demonstrated no changes in mitochondrial activity, suggesting that mitochondria regulation is a vulnerability for MYC, however, short-term direct inhibition of MYC does not control the reprogrammed mitochondrial activity (Figure S3C).

3.3. Tigecycline Is Active against Primary Myeloma Cells *In Vitro* and in a Murine MM Model

We tested the efficacy of tigecycline alone or in combination with bortezomib on primary BMMCs from patients. Details of the patient characteristics, sample analysis performed, and patient therapy regimens are summarized in Table 1, Table 2 and Table S1, respectively. We found that CD38+/CD138+ plasma cells from patients with NDMM had reduced viability with tigecycline and its combination with bortezomib compared to no treatment condition. Reduction of viability by tigecycline correlated with a decrease in mitochondrial activity analyzed by MitoTracker Red staining, as shown in Figure 4A,B. Overall, these results show that MM primary cells are sensitive to tigecycline, which kills the malignant cells by ablating a molecular mechanism of c-Myc oncogenesis, the mitochondrial activity pathway that is implicated on MM progression.

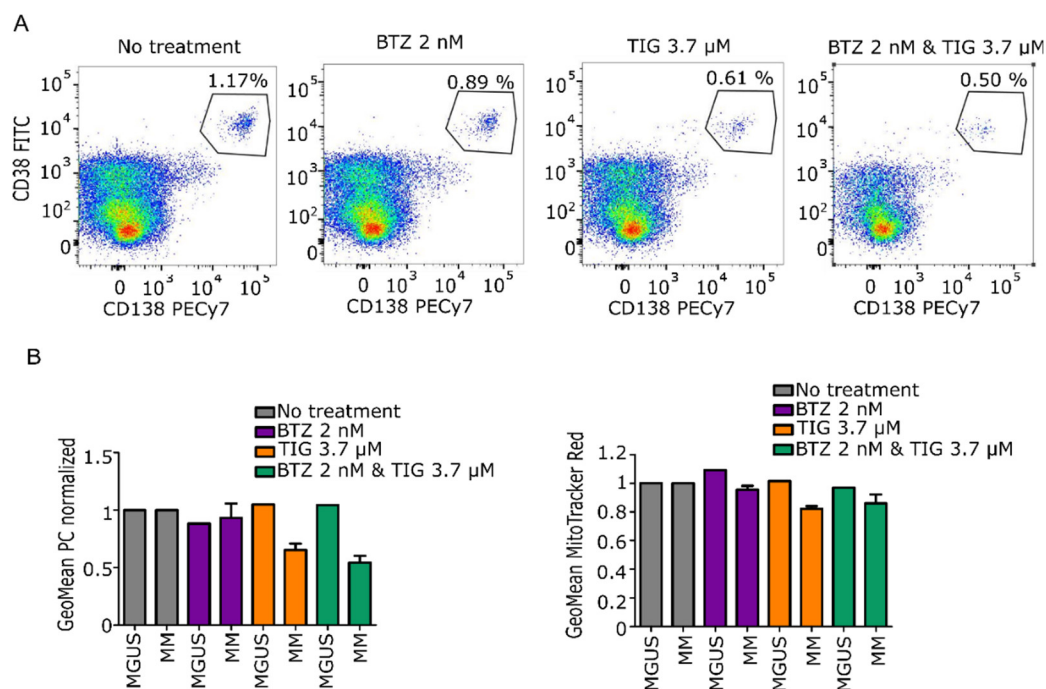
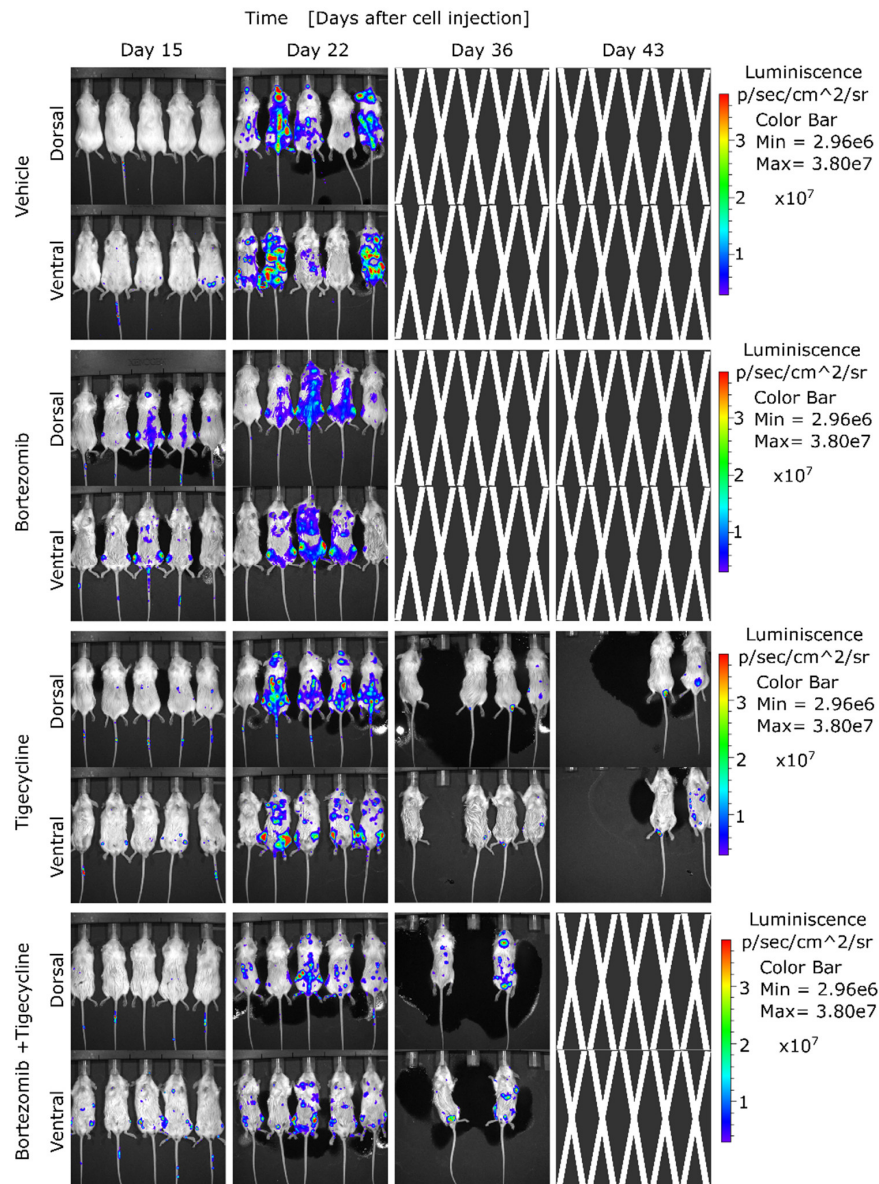


Figure 4. Tigecycline and the combination with bortezomib inhibits primary MM cell proliferation compared to premalignant entity MGUS. **(A)** Representative dot plots showing changes in the plasma cell population upon exposure to treatments. Numbers represent the proportion of CD38⁺ and CD138⁺ cells population. **(B) Left:** Bar chart reporting the mean of positive CD38⁺/CD138⁺ cells \pm SEM population normalized against no treatment. **Right:** Bar chart reporting mean of MitoTracker Red expression \pm SEM normalized against no treatment (MGUS $N = 1$; NDMM $N = 3$).

Given these *in vitro* findings, we investigated whether tigecycline treatment alone or in combination with bortezomib could be effective in an *in vivo* animal model representing high mitochondrial activity. To determine the therapeutic effect of tigecycline *in vivo*, we assessed its antimyeloma efficacy in a murine xenograft model, as previously described [34]. Xenografted mice with the bioluminescent cell line JJN3-ffLuc-GFP, which recapitulates the aggressiveness of the disease and the elevated mitochondrial activity, were treated starting on day four after intravenous engraftment. We found that tigecycline treatment significantly decreased the burden of the disease measured by serial, noninvasive bioluminescent imaging, as shown in Figure 5A. In agreement with this, we found that the survival of animals treated with tigecycline ($p = 0.0003$) and the combination of tigecycline and bortezomib ($p = 0.0048$) was significantly greater than survival obtained in the control group (Figure 5B). These results demonstrate that tigecycline, alone or in combination with low doses of bortezomib, enhances the survival of MM-engrafted mice, indicating that tigecycline may be valuable for MM patients presenting signs of high mitochondrial activity at diagnosis and to prevent the metabolic reprogramming, in part, triggered by proteasome inhibitor treatments that contribute to cell malignancy.

A



B

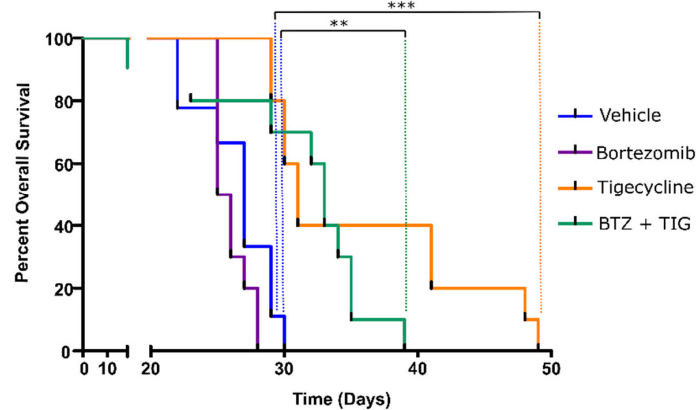


Figure 5. Tigecycline and the combination with bortezomib inhibits cancer cell growth in a MM-xenograft model. **(A)** Bioluminescence images were acquired using an in vivo imaging system. **(B)** Kaplan–Meier survival analysis of mice after the various treatments. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

4. Discussion

Our data show that mitochondrial activity increases in primary MM cells as the disease progresses. Mitochondrial features allow us to characterize patient samples at different stages of the disease and appeared to be related to MYC-driven malignancy, suggesting a novel indirect target of MYC to overcome MM proliferation.

Malignant plasma cells exhibit an erratic behavior determined by mitochondrial metabolism, a well-characterized biological mechanism in the context of apoptosis [24]. The bone marrow microenvironment has been shown to sustain MM cells via intercellular mitochondrial transfer, which stimulates OXPHOS and cancer progression [35].

Similarly to our findings, the observation of MYC overexpression across the massive RNAseq analysis and the correlation with patient poor prognosis was previously reported with a decreased in the overall survival in a cohort of MM patients [9]. As MYC has the capacity to regulate mitochondrial biogenesis, we found that mitochondrial mass, and consequent mitochondrial membrane potential is augmented in patients showing disease progression. We corroborated these results with COX activity in MM primary cells (CD138 + BMMC) with a histoenzymatic assay commonly used for muscle biopsies [36].

To demonstrate the mitochondrial reprogramming influenced by MYC overexpression in progressed MM cells, and its potential as a therapeutic target, we used the antibiotic tigecycline, which inhibits protein synthesis in both bacterial and mitochondria-encoded proteins, due to the similarity of mitochondrial and bacterial ribosomes [37]. Previous studies have demonstrated the therapeutic efficacy of tigecycline against some cancers, such as B-cell malignancies [37], primary acute myeloid leukemia [38,39], and myeloma [40]. Using an in vitro model of progressed MM with high mtDNA, high MYC expression, high mitochondrial activity, and ex vivo primary MM cells (CD138 + BMMCs), we confirmed the cytotoxic effect of tigecycline. Moreover, additional results were reported from in vivo experiments, as tigecycline significantly delayed disease progression [40]. Additionally, the in vitro MM bortezomib resistance (BR) model demonstrated a similar sensitivity to tigecycline, as seen in the bortezomib-sensitive counterparts. To explore the therapeutic options for MM, we studied the tigecycline and bortezomib combination, finding synergism in the combination against bortezomib-sensitive cells with low doses of tigecycline (3.7 μ M) and bortezomib (2 nM). Thus, tigecycline and other mitochondrial inhibitors could be useful in metabolically reprogrammed malignancies. For instance, the Bcl-2 inhibitor venetoclax has been shown to inhibit mitochondrial respiration [41], although it appears to have higher cytotoxicity in myeloma plasma cells with reduced mitochondrial respiration. The increased OXPHOS in MM would be a drawback for venetoclax treatment, but the addition of tigecycline to a venetoclax regimen could be a therapeutic opportunity in MM or other B-cell malignancies, especially with a MYC contribution [42]. Tigecycline elicited its effects on mitochondrial activity related to MYC overexpression, consistent with the findings of other authors [43].

MYC is a master proto-oncogene with high implication in myeloma, accordingly 20–50% of patients with MM show MYC translocations and 15–20% show amplifications of the gene [44,45]. MYC regulates a plethora of biological functions, including the stimulation of mitochondrial biogenesis by regulator genes, lately contributing to mitochondrial mass gain [46]. However, the same mitochondrial reprogramming driven by MYC renders novel vulnerabilities, as revealed by synthetic lethality [12]. We stated the efficacy of MYC abrogation in MM cells using JQ1 and tigecycline. Our data suggest that elevation in mitochondrial biogenesis and consequent mitochondrial activity in MM is a malignancy mechanism linked to MYC. Accordingly, the mitochondrial machinery could be a potential indirect target of “undruggable” MYC through effective alternative targets of common antibiotics [47] such as tigecycline [48] and clarithromycin, among others [49].

In the light of the anticancer potential of mitochondrial inhibitors targeting molecular mechanisms of MYC, tigecycline warrants further development, given its potentially low on-target toxicity, avoiding proteasome inhibitors resistances and/or MM relapse.

5. Conclusions

In summary, our results demonstrate that elevation of mitochondrial activity occurs in MM patients as the disease progresses, causing a noticeable enhancement in those patients that relapse. We provided a novel alternative for MYC inhibition by targeting mitochondrial activity, as an indirect mechanism to avoid MM proliferation, with the mitochondrial inhibitor tigecycline. Importantly, the tigecycline efficacy alone or in combination with bortezomib *ex vivo* and *in vivo* reduces c-Myc-driven MM vulnerabilities, which makes tigecycline attractive for MM therapy.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13071662/s1>, Table S1: Patient treatment regimens. Table S2: Antibodies used for Western blot. Figure S1: Contribution of carfilzomib treatment in mitochondrial activity features. Figure S2: Effect of tigecycline and the combination with bortezomib on JLN3 BR cells. Figure S3: Validation of tigecycline mode of action with JQ1. Figure S4: Uncropped Western blot.

Author Contributions: A.O.-R. and Y.R.-H. contributed to experimental procedures and data analysis and wrote the manuscript. M.L.M. and P.A.-G. contributed to experimental procedures and *in vivo* experiments. A.G.-O. contributed to experimental procedures and flow cytometry. A.V. helped develop the JLN3-Luc-GFP cell line. C.B. and R.M.G.-M. contributed to experimental procedures and data analysis of pathology samples. V.G., L.M., M.V.-E., and A.G. contributed to sample collection and experimental procedures. M.Á.N.-A. contributed to Western blot procedure and analysis. E.L. contributed to Seahorse procedure. M.T.C. contributed to flow cytometry MM patients data collection and analysis. S.B. contributed to the data analysis of massive data. J.M.-L. contributed to the conception and design of the study, and the analysis of the data. M.L. and M.G. contributed to the conception and design of the study, experimental procedures, and data analysis, and wrote the manuscript. All authors contributed to the interpretation of the data, critically reviewed and revised the manuscript, approved the final manuscript for publication, and vouch for data accuracy and completeness. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by project PI 18/00295, PI18/01519 and CP19/00140 from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and cofunded by the European Regional Development Fund, CRIS contra el Cancer Foundation, AECC (INVEST19015GALL) and Madri+d from Comunidad de Madrid YEI (PEJD-2017-PRE/BMD-4835 and PEJD-2019-POST/BMD-14505) and approved by the Ethics Committee of our Institution.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain) (CEIM 20/326). The animal study was performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committees of the Comunidad de Madrid, Spain, under an approved protocol (PROEX 023/17).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The RNA-Seq data from the CoMMpass that were analyzed in this study are publicly available through the Multiple Myeloma Genomics Initiative (<https://research.themmr.org>, accessed on 22 April 2020) with the identifier IA14.

Acknowledgments: We thank all of the patients who participated in the study and their families, as well as the study sub-investigators, research nurses, and coordinators at each study site.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References









1. Rich, R.R.; Fleisher, T.A.; Shearer, W.T.; Schroeder, H.; Frew, A.J.; Weyand, C.M. *Clinical Immunology. Principles and Practice*, 5th ed.; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
2. Lipchick, B.C.; Fink, E.E.; Nikiforov, M.A. Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Pharmacol. Res.* **2016**, *105*, 210–215. [[CrossRef](#)]
3. Misund, K.; Keane, N.; Stein, C.K.; Asmann, Y.W.; Day, G.; Welsh, S.; Van Wier, S.A.; Riggs, D.L.; Ahmann, G.; Chesi, M.; et al. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. *Leukemia* **2020**, *34*, 322–326. [[CrossRef](#)]

4. Maiso, P.; Huynh, D.; Moschetta, M.; Sacco, A.; Aljawai, Y.; Mishima, Y.; Asara, J.M.; Roccaro, A.M.; Kimmelman, A.C.; Ghobrial, I.M. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2071–2082. [[CrossRef](#)]
5. Sriskanthadevan, S.; Jeyaraju, D.V.; Chung, T.E.; Prabha, S.; Xu, W.; Skrtic, M.; Jhas, B.; Hurren, R.; Gronda, M.; Wang, X.; et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* **2015**, *125*, 2120–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Nguyen, L.; Papenhausen, P.; Shao, H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes* **2017**, *8*, 116. [[CrossRef](#)]
7. De Barrios, O.; Meler, A.; Parra, M. MYC's Fine Line Between B Cell Development and Malignancy. *Cells* **2020**, *9*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bloedjes, T.A.; De Wilde, G.; Guikema, J.E.J. Metabolic Effects of Recurrent Genetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Manasanch, E.E. Myc is also the bad guy in myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2016**, *57*, 2485–2486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sekiguchi, N.; Ootsubo, K.; Wagatsuma, M.; Midorikawa, K.; Nagata, A.; Noto, S.; Yamada, K.; Takezako, N. Impact of C-Myc gene-related aberrations in newly diagnosed myeloma with bortezomib/dexamethasone therapy. *Int. J. Hematol.* **2014**, *99*, 288–295. [[CrossRef](#)]
11. Seo, J.H.; Agarwal, E.; Chae, Y.C.; Lee, Y.G.; Garlick, D.S.; Storaci, A.M.; Ferrero, S.; Gaudio, G.; Gianelli, U.; Vaira, V.; et al. Mitochondrial fission factor is a novel Myc-dependent regulator of mitochondrial permeability in cancer. *EBioMedicine* **2019**, *48*, 353–363. [[CrossRef](#)]
12. Hsieh, A.L.; Dang, C.V. MYC, Metabolic Synthetic Lethality, and Cancer. *Recent Results Cancer Res.* **2016**, *207*, 73–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Rizzieri, D.; Paul, B.; Kang, Y. Metabolic alterations and the potential for targeting metabolic pathways in the treatment of multiple myeloma. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2019**, *2019*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Morrish, F.; Hockenbery, D. MYC and Mitochondrial Biogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a014225. [[CrossRef](#)]
15. Zhan, X.; Yu, W.; Franqui-Machin, R.; Bates, M.L.; Nadiminti, K.; Cao, H.; Amendt, B.A.; Jethava, Y.; Frech, I.; Zhan, F.; et al. Alteration of mitochondrial biogenesis promotes disease progression in multiple myeloma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 111213–111224. [[CrossRef](#)]
16. Wallace, D.C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 685–698. [[CrossRef](#)]
17. Zong, W.X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 667–676. [[CrossRef](#)]
18. Kang, M.G.; Kim, Y.N.; Lee, J.H.; Szardenings, M.; Baek, H.J.; Kook, H.; Kim, H.R.; Shin, M.G. Clinicopathological Implications of Mitochondrial Genome Alterations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Ann. Lab. Med.* **2016**, *36*, 101–110. [[CrossRef](#)]
19. Reznik, E.; Miller, M.L.; Senbabaoglu, Y.; Riaz, N.; Sarungbam, J.; Tickoo, S.K.; Al-Ahmadie, H.A.; Lee, W.; Seshan, V.E.; Hakimi, A.A.; et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *eLife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
20. Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. “ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis”—A critical commentary. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45*, 1217–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ashton, T.M.; McKenna, W.G.; Kunz-Schughart, L.A.; Higgins, G.S. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2482–2490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Xiang, Y.; Fang, B.; Liu, Y.; Yan, S.; Cao, D.; Mei, H.; Wang, Q.; Hu, Y.; Guo, T. SR18292 exerts potent antitumor effects in multiple myeloma via inhibition of oxidative phosphorylation. *Life Sci.* **2020**, *256*, 117971. [[CrossRef](#)]
23. Faubert, B.; Solmonson, A.; DeBerardinis, R.J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* **2020**, *368*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dalton, W.S. Targeting the mitochondria: An exciting new approach to myeloma therapy. Commentary re: N. J. Bahlis et al., Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3643–3645. [[PubMed](#)]
25. Dong, Z.; Abbas, M.N.; Kausar, S.; Yang, J.; Li, L.; Tan, L.; Cui, H. Biological Functions and Molecular Mechanisms of Antibiotic Tigecycline in the Treatment of Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3577. [[CrossRef](#)]
26. Andreu, A.L.; Martinez, R.; Marti, R.; Garcia-Arumi, E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion* **2009**, *9*, 242–246. [[CrossRef](#)]
27. Rao, X.; Huang, X.; Zhou, Z.; Lin, X. An improvement of the 2^{-ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* **2013**, *3*, 71–85. [[PubMed](#)]
28. Bae, J.; Song, W.; Smith, R.; Daley, J.; Tai, Y.T.; Anderson, K.C.; Munshi, N.C. A novel immunogenic CS1-specific peptide inducing antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2012**, *157*, 687–701. [[CrossRef](#)]
29. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 440–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. The Multiple Myeloma Genomics Initiative. Available online: <https://research.themmr.org/> (accessed on 22 April 2020).
31. Ross, J.M. Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry. *J. Vis. Exp.* **2011**, *57*, e3266. [[CrossRef](#)]
32. Samelman, T.R.; Shiry, L.J.; Cameron, D.F. Endurance training increases the expression of mitochondrial and nuclear encoded cytochrome c oxidase subunits and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2000**, *83*, 22–27. [[CrossRef](#)]

33. Srinivasan, S.; Avadhani, N.G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1252–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lawson, M.A.; Paton-Hough, J.M.; Evans, H.R.; Walker, R.E.; Harris, W.; Ratnabalan, D.; Snowden, J.A.; Chantry, A.D. NOD/SCID-GAMMA mice are an ideal strain to assess the efficacy of therapeutic agents used in the treatment of myeloma bone disease. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119546. [[CrossRef](#)]
35. Marlein, C.R.; Piddock, R.E.; Mistry, J.J.; Zaitseva, L.; Hellmich, C.; Horton, R.H.; Zhou, Z.; Auger, M.J.; Bowles, K.M.; Rushworth, S.A. CD38-Driven Mitochondrial Trafficking Promotes Bioenergetic Plasticity in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 2285–2297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Karkucinska-Wieckowska, A.; Pronicki, M.; Wieckowski, M.R. Histoenzymatic methods for visualization of the activity of individual mitochondrial respiratory chain complexes in the muscle biopsies from patients with mitochondrial defects. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1241*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Norberg, E.; Lako, A.; Chen, P.H.; Stanley, I.A.; Zhou, F.; Ficarro, S.B.; Chapuy, B.; Chen, L.; Rodig, S.; Shin, D.; et al. Differential contribution of the mitochondrial translation pathway to the survival of diffuse large B-cell lymphoma subsets. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 251–262. [[CrossRef](#)]
38. Skrtic, M.; Srisanthadevan, S.; Jhas, B.; Gebbia, M.; Wang, X.; Wang, Z.; Hurren, R.; Jitkova, Y.; Gronda, M.; Maclean, N.; et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 674–688. [[CrossRef](#)]
39. Kuntz, E.M.; Baquero, P.; Michie, A.M.; Dunn, K.; Tardito, S.; Holyoake, T.L.; Helgason, G.V.; Gottlieb, E. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1234–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ma, R.; Zhang, Y.; Wang, W.; Wu, J.; Yang, Q.; Xu, W.; Jiang, S.; Han, Y.; Yu, K.; Zhang, S. Inhibition of autophagy enhances the antitumour activity of tigecycline in multiple myeloma. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 5955–5963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Roca-Portoles, A.; Rodriguez-Blanco, G.; Sumpton, D.; Cloix, C.; Mullin, M.; Mackay, G.M.; O’Neill, K.; Lemgruber, L.; Luo, X.; Tait, S.W.G. Venetoclax causes metabolic reprogramming independent of BCL-2 inhibition. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ravà, M.; D’Andrea, A.; Nicoli, P.; Gritti, I.; Donati, G.; Doni, M.; Giorgio, M.; Olivero, D.; Amati, B. Therapeutic synergy between tigecycline and venetoclax in a preclinical model of MYC/BCL2 double-hit B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)]
43. Ronca, R.; Ghedini, G.C.; Maccarinelli, F.; Sacco, A.; Locatelli, S.L.; Foglio, E.; Taranto, S.; Grillo, E.; Matarazzo, S.; Castelli, R.; et al. FGF Trapping Inhibits Multiple Myeloma Growth through c-Myc Degradation-Induced Mitochondrial Oxidative Stress. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 2340–2354. [[CrossRef](#)]
44. Walker, B.A.; Wardell, C.P.; Murison, A.; Boyle, E.M.; Begum, D.B.; Dahir, N.M.; Proszek, P.Z.; Melchor, L.; Pawlyn, C.; Kaiser, M.F.; et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Carrasco, D.R.; Tonon, G.; Huang, Y.; Zhang, Y.; Sinha, R.; Feng, B.; Stewart, J.P.; Zhan, F.; Khatry, D.; Protopopova, M.; et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 313–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Li, F.; Wang, Y.; Zeller, K.I.; Potter, J.J.; Wonsey, D.R.; O’Donnell, K.A.; Kim, J.W.; Yustein, J.T.; Lee, L.A.; Dang, C.V. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6225–6234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. D’Andrea, A.; Gritti, I.; Nicoli, P.; Giorgio, M.; Doni, M.; Conti, A.; Bianchi, V.; Casoli, L.; Sabò, A.; Mironov, A.; et al. The mitochondrial translation machinery as a therapeutic target in Myc-driven lymphomas. *Oncotarget* **2016**, *7*, 72415–72430. [[CrossRef](#)]
48. Xu, Z.; Yan, Y.; Li, Z.; Qian, L.; Gong, Z. The Antibiotic Drug Tigecycline: A Focus on its Promising Anticancer Properties. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 473. [[CrossRef](#)]
49. Niesvizky, R.; Jayabalan, D.S.; Christos, P.J.; Furst, J.R.; Naib, T.; Ely, S.; Jalbrzikowski, J.; Pearse, R.N.; Zafar, F.; Pekle, K.; et al. BiRD (Biaxin [clarithromycin]/Revlimid [lenalidomide]/dexamethasone) combination therapy results in high complete- and overall-response rates in treatment-naive symptomatic multiple myeloma. *Blood* **2008**, *111*, 1101–1109. [[CrossRef](#)]

Article

Pathogenetic and Prognostic Implications of Increased Mitochondrial Content in Multiple Myeloma

Yanira Ruiz-Heredia ^{1,2,†}, Alejandra Ortiz-Ruiz ^{1,2,†} , Mehmet K. Samur ³, Vanesa Garrido ^{1,2}, Laura Rufian ², Ricardo Sanchez ^{1,2} , Pedro Aguilar-Garrido ¹, Santiago Barrio ^{1,2} , Miguel A. Martín ^{4,5} , Niccolò Bolli ^{6,7} , Yu-Tzu Tai ³, Raphaël Szalat ³, Mariateresa Fulciniti ³, Nikhil Munshi ³, Joaquín Martínez-López ^{1,2,*} , María Linares ^{1,2,8,‡}  and Miguel Gallardo ^{1,2,‡} 

- ¹ H12O-CNIO Hematological Malignancies Clinical Research Unit, CNIO, 28029 Madrid, Spain; yanira_heredia@altumsequencing.com (Y.R.-H.); maortiz@cnio.es (A.O.-R.); gvaneg@hotmail.com (V.G.); ricardo_sanchez@altumsequencing.com (R.S.); paguilar@cnio.es (P.A.-G.); santiago_barrio@altumsequencing.com (S.B.); mlinares@ucm.es (M.L.); mgallardod@cnio.es (M.G.)
 - ² Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; lrufian.imas12@h12o.es
 - ³ Dana-Farber Cancer Institute, 450 Brookline Avenue, M230 Boston, MA 02215, USA; mehmet_samur@dfci.harvard.edu (M.K.S.); yu-tzu_tai@dfci.harvard.edu (Y.-T.T.); raphaelE_Szalat@dfci.harvard.edu (R.S.); mariateresa_fulciniti@dfci.harvard.edu (M.F.); nikhil_munshi@dfci.harvard.edu (N.M.)
 - ⁴ Instituto de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain; mamcasanueva@h12o.es
 - ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 28029 Madrid, Spain
 - ⁶ Hematology Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, 20122 Milan, Italy; niccolo.bolli@unimi.it
 - ⁷ Department of Oncology and Hemato-Oncology, University of Milan, 20122 Milan, Italy
 - ⁸ Biochemistry and Molecular Biology Department, Pharmacy School, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: jmarti01@med.ucm.es
† Contributed equally as co-first authors.
‡ Contributed equally as co-senior authors.



Citation: Ruiz-Heredia, Y.; Ortiz-Ruiz, A.; Samur, M.K.; Garrido, V.; Rufian, L.; Sanchez, R.; Aguilar-Garrido, P.; Barrio, S.; Martín, M.A.; Bolli, N.; et al. Pathogenetic and Prognostic Implications of

Increased Mitochondrial Content in Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 3189. <https://doi.org/10.3390/cancers13133189>

Academic Editor: Aldo M. Roccaro

Received: 26 May 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 25 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Monoclonal gammopathies comprise a spectrum of disorders defined by the clonal proliferation of plasma cells and include monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smoldering MM (SMM) and multiple myeloma (MM), which can also evolve from MGUS and SMM. We aimed to analyze the impact of mitochondrial DNA copy number (mtDNACN) and also SNVs and INDELS in frequently mutated mitochondrial-related genes on the disease course of monoclonal gammopathies and MM. We confirmed the increased levels of mtDNA in SMM and MM, their gain as the gammopathy progresses and the similarities in the mitochondrial hallmarks between rapidly-progressing SMM and MM. Our data suggest that mitochondria participate in the malignant transformation of monoclonal gammopathies and contribute to disease progression. Our findings support the clinical importance of mtDNACN evaluation and monitoring to guide clinical decision making in patients with SMM.

Abstract: Many studies over the last 20 years have investigated the role of mitochondrial DNA (mtDNA) alterations in carcinogenesis. However, the status of the mtDNACN in MM and its implication in the pathogenesis of the disease remains unclear. We examined changes in plasma cell mtDNACN across different stages of MM by applying RT-PCR and high-throughput sequencing analysis. We observed a significant increase in the average mtDNACN in myeloma cells compared with healthy plasma cells (157 vs. 40 copies; $p = 0.02$). We also found an increase in mtDNACN in SMM and newly diagnosed MM (NDMM) paired samples and in consecutive relapses in the same patient. Survival analysis revealed the negative impact of a high mtDNACN in progression-free survival in NDMM ($p = 0.005$). Additionally, we confirmed the higher expression of mitochondrial biogenesis regulator genes in myeloma cells than in healthy plasma cells and we detected single nucleotide variants in several genes involved in mtDNA replication. Finally, we found that there was molecular similarity between “rapidly-progressing SMM” and MM regarding mtDNACN. Our

data provide evidence that malignant transformation of myeloma cells involves the activation of mitochondrial biogenesis, resulting in increased mtDNA levels, and highlights vulnerabilities and potential therapeutic targets in the treatment of MM. Accordingly, mtDNACN tracking might guide clinical decision-making and management of complex entities such as high-risk SMM.

Keywords: multiple myeloma; smoldering MM; mitochondria DNA copy number; NGS

1. Introduction

Mitochondria are bioenergetic and biosynthetic organelles that control crucial biological pathways such as cell growth, proliferation and apoptosis, among others [1,2]. Recently, many studies have investigated the consequences of mtDNA alterations in cancer, demonstrating that cancer cells exhibit multiple alterations in mitochondrial content, structure, function and activity [3–5]. Mitochondria appear to be essential for tumor formation and growth [6], and dysfunction in mitochondrial processes affects the electron transport chain and promotes tumor metastasis [7]. Indeed, cancer is characterized by altered energy metabolism involving not only genetic alterations in nuclear DNA, but also mtDNA mutations and changes in mtDNACN [6,8,9]. A recent comprehensive study of the mtDNACN in many cancer types revealed that the majority show changes in mtDNA content when compared with adjacent healthy tissue [9], and also that the mtDNACN is significantly associated with patient survival.

The status of the mtDNACN and its implication in the pathogenesis of cancer is gaining traction [10,11]. These parameters remain, however, relatively unexplored in the context of monoclonal gammopathies and MM, partly because of the inherent difficulties of working with myeloma cells *in vitro* and partly because of the death of healthy plasma cells in patients with MM. Nonetheless, mtDNA is known to play defining roles during early and late tumor progression in MM [12]. Moreover, mitochondrial biogenesis and activity is often altered in MM due to aberrant gene expression and mutation of mitochondrial-related genes, ultimately contributing to disease progression and relapse, particularly to bortezomib but also to venetoclax [13–16].

SMM (asymptomatic) is a monoclonal gammopathy with a wide spectrum of progression, and its risk classification has been a major goal in MM research in the last 20 years. Several different models have been tested for predicting progression to active MM—including the Mayo Clinic model, the PETHEMA model and the 20-20-20 model [17]—and novel imaging technologies, such as PET-CT [18], can complement more traditional approaches like fluorescent *in situ* hybridization and peripheral blood plasma cell quantification [19] to aid in prognostication. Nonetheless, cutting-edge molecular technologies (e.g., next-generation sequencing (NGS) and whole-genome sequencing (WGS)) [20] can offer a more complete molecular profile of SMM, which is crucial to determine the prognosis and classification of SMM and high-risk SMM and to guide clinical decision making in the management of the disease.

Here, we evaluated the mtDNACN state in patients with MM across all stages of the disease, and investigated its impact on patient survival. We also traced the time-evolution of mtDNACN over the course of the disease, which may provide new insight into the role of mitochondria in the progression of MM. Finally, we conducted differential gene expression analysis of mitochondrial biogenesis regulator genes and deep-targeted sequencing of nuclear genes involved in mtDNA replication. Our results provide new evidence supporting the hypothesis that mitochondrial gain-of-function in MM, through increased mitochondrial content, contributes to the transformation process. These observations implicate the mtDNACN as a novel biomarker for MM with prognostic potential, including for risk classification of SMM and rapidly-progressing SMM.

2. Materials and Methods

2.1. Mitochondrial DNA Copy Number Determination

mtDNACN changes were studied in 4 healthy donors and in 142 patients with MM across different stages of the disease: 17 with MGUS, 20 with SMM, 79 with NDMM and 26 with relapse MM (RRMM). Clinical data from the global dataset are included in Table 1. Analysis was performed using plasma cells enriched from bone marrow aspirates with anti-CD138+ immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), with >85% purity in all cases. mtDNACN was quantified by RT-PCR using two TaqMan probes targeting nuclear DNA (RNaseP Control Reaction Kit, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) and the mitochondrial gene MT-RNR1 (6FAM-5'-TGCCAGCCACCGCG-3', with 12S forward primers mtF805-New (5'-CCACGGGAAACACGACTGAT-3') and 12S reverse mtR927 (5'-CTATTGACTT GGTTAATCGTGTGA-3')) (Thermo-fisher, Waltham, MA, USA) [21].

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the study ($n = 142$).

		MGUS ($n = 17$)	SMM ($n = 20$)	NDMM ($n = 79$) ^a	RRMM ($n = 26$)
Median age (range), years		71 (48–87)	78.5 (54–87)	72 (62–85)	67.5 (38–87)
Sex (%)	Male	58.8	45	52.9	53.8
	Female	41.2	55	47.1	46.2
PC BM, average % (range)		6.8 (2–17)	23.2 (10–55)	43.9 (10–84)	39.2 (4–88)
PPC MFC %, average (range)		1 (0.1–2.9)	6.1 (0.98–24)	11.2 (0.2–30)	14.8 (0.01–79)
Type of Ig heavy chain (serum)	Non-detected	5.9	0	0	0
	IgG	52.9	60	64.7	69.2
	IgA	35.3	40	23.5	15.4
	IgM	5.9	0	5.9	15.4
	IgD	0	0	0	0
	Biclonal	0	0	0	0
Type of Ig light chain (serum)	Non-detected	5.9	0	0	3.8
	Kappa	52.9	55	76.5	61.5
	Lambda	41.2	45	23.5	30.8
	Biclonal	0	0	0	3.8
Serum M-spike, ≥ 3 gr/dL (%)		0	10	82.4	23.1
Urine M-spike, detected (%)		20	29.4	70.6	53.8
	Kappa (%)	≥ 19.4 mg/L	57.1	66.7	100
	Lambda (%)	≥ 26.3 mg/L	50	41.7	33.3
Free kappa/lambda ratio (%)		< 0.26 mg/L	14.3	23.1	0
		$\geq 0.26 < 1.65$ mg/L	42.9	38.5	22.2
		≥ 1.65 mg/L	42.9	38.5	77.8
Creatinine (%)	≥ 1.3 mg/dL	29.4	25	47.1	19.2
Serum calcium (%)	≥ 11 mg/dL	0	0	11.1	11.5
LDH (%)	≥ 225 U/I	5.9	14	11.8	38.5
Albumina (%)	≤ 3 g/dL	0	5	11.8	3.8
Immunoparesis, yes (%)		18.8	20	23.5	80.8
Refractory, yes (%)		NA	NA	5.9	40
Type of prior treatment (%)	With PI	NA	0	5.9	42.3
	Without PI	NA	100	94.1	57.7
Type of following treatment (%)	With PI	NA	25	88.2	42.3
	Without PI	NA	75	11.8	57.7
Best response categories * (%)	VGPR	0	0	17.6	0
	PR	0	30	58.8	34.6
	CR	0	0	23.5	19.2
	CR MRD+	0	0	0	0
	CR MRD-	0	0	0	0
	SD	0	5	0	34.6
	NA	100	65	0	11.5
Performed analysis (methods)	Samples, n	26	39	107	81
	WGS	0	10	10	0
	WES	0	0	0	44
	mtDNA CN	17	20	79	26
	Gene expression	9	9	18	11

Percentage frequencies of clinical parameters from patients. Abbreviations: BM, bone marrow; CR, complete response; Ig, immunoglobulin; LDH, lactate dehydrogenase; NDMM, newly-diagnosed multiple myeloma; MFC: multiparametric flow cytometry; MGUS, monoclonal gammopathy of uncertain significance; MRD-, minimal residual disease negative; MRD+, minimal residual disease positive; mtDNACN, mitochondrial DNA copy number; NA, not applicable; PC, plasma cell; PI, proteasome inhibitors; PPC: polyclonal plasma cell; PR, partial response; RRMM, relapse multiple myeloma; SMM, smoldering multiple myeloma; SD, stable disease; VGPR, very good partial response; WES, whole-exome sequencing; WGS, whole-genome sequencing. * Objective response was assessed at the start of each cycle and confirmed by the physician using IMWG criteria. ^a MM patients comprised newly-diagnosed and follow-up patients.

2.2. Deep Targeted Sequencing

Deep targeted sequencing was performed in 13 of the 142 samples with available DNA and mtDNACN quantification (4 MGUS, 1 SMM, 5 NDMM and 3 RRMM). The panel contained the following 12 genes involved in mtDNA replication and frequently mutated in mitochondrial-related diseases: *POLG*, *POLG2*, *MPV17*, *RRM2B*, *DGUOK*, *OPA1*, *TK2*, *TWINKLE*, *SLC25A4*, *SUCLA2*, *SUCLG1* and *MFN2*. Libraries were sequenced on the Ion Proton platform (Life Technologies, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The average coverage depth was 2000× and the minimum coverage of the detected variants was 20×. Single nucleotide variants were called and annotated using Ion Reporter software (v5.0, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

2.3. Whole-Genome and Whole-Exome Sequencing

Changes in mtDNACN in 10 paired samples from patients with SMM progressing to NDMM were examined by WGS. DNA was extracted from 20 samples of CD138+ myeloma cells purified from bone marrow, and only samples with >90% plasma cells were selected. Paired-end sequencing (100 bp) on the HiSeq2000 sequencing platform (Illumina, San Diego, CA, USA) was performed to an average depth of 38.7×. Sequence files are available at the European Genome-phenome archive under the accession code EGAD00001001898.

Additionally, changes in mtDNACN were evaluated in sequential samples from the same patient, at the time of diagnosis and relapse, by whole-exome sequencing (21 patients, 44 samples). DNA was isolated from CD138+ myeloma cells purified from bone marrow and constitutional control DNA originated from peripheral blood mononuclear cells. Genomic libraries were generated using the Agilent SureSelect Human Exon Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; G3362) and were analyzed on the Illumina HiSeq2000 sequencing platform. Paired 75-bp sequences were read with an average depth of 236×. The data have been deposited in the European Genome-phenome Archive repository under the accession code kEGAD00001000339.

mtDNACN was studied from both NGS datasets using FastMitocalc (ultra-fast version of mitoCalc; <https://lgsun.irp.nia.nih.gov/hsgu/software/mitoAnalyzer/index.html>; accessed on 28 May 2019) [22] and Samtools (version 0.1.19; <http://samtools.sourceforge.net>; accessed on 10 April 2019) [23] software. Briefly, mtDNACN was calculated after extracting reads aligning to the mitochondrial genome from bam files. Then, copy number variation was calculated by comparing the number of reads aligning to chromosome 10, one of the most stable chromosomes in MM, with the number of reads aligning to an mtDNA reference genome.

$$mtDNA\ copy\ number = \frac{mtDNA\ average\ coverage}{autosomal\ DNA\ average\ coverage} \times 2 \quad (1)$$

2.4. RNA Expression Analysis

We extracted RNA and DNA from purified plasma cells (CD138+) using the All-PrepDNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Gene expression was studied from extracted RNA processed into cDNA to quantify the levels of Tu translation elongation factor, mitochondrial (*TUFM*) (ThermoFisher Scientific Waltham, MA, USA) and mitochondrial transcription factor A (*TFAM*) (ThermoFisher Scientific). Beta-D-glucuronidase (*GUSB*, ThermoFisher Scientific) was used as a housekeeping gene. This dataset included 47 samples from patients of the Hospital 12 de Octubre (Madrid) that were profiled using TaqMan probes: 9 MGUS, 9 SMM, 18 NDMM and 11 RRMM. qPCR was performed on an ABI PRISM 7900HT instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with TaqMan gene expression assays (Life Technologies) in triplicate using SDS 2.2 software (Applied Biosystems). The relative level of targets was determined using the comparative Ct method [24].

We also analyzed RNA-seq data from 770 patients with NDMM available at the CoMMpass repository (<https://research.themmr.org> and www.themmr.org; both ac-

cessed on 22 April 2020) [25]. The data were generated as part of the publicly available Multiple Myeloma Research Foundation Personalized Medicine Initiatives with the identifier IA14, under “Code availability”. A molecular gene view on the entire dataset was run to study the expression of genes involved in mitochondrial activity: *TUFM* and cytochrome c oxidase II (*COXII*). Kaplan–Meier curves of progression-free survival (PFS) were plotted with balanced stratification of high and low expression of each gene studied.

We also checked differential gene expression of defined pathways at the Molecular Signatures Database (MSigDB), including the mitochondrial respiratory chain pathway (involving 24 genes: *ND1*, *OXA1L*, *NDUFA2*, *NDUFB6*, *UQCRC1*, *NDUFA9*, *NDUFA6*, *NDUFAB1*, *NDUFA13*, *BCS1L*, *NDUFA1*, *NDUFS7*, *SDHA*, *NNT*, *NDUFS4*, *UQCRH*, *NDUFV1*, *NDUFS8*, *NDUFS3*, *SURF1*, *NDUFS2*, *NDUFS1*, *UQCRB*, *COX15*) and the cytochrome c oxidase activity pathway (13 genes: *COX11*, *COX7A1*, *COX10*, *COX7B*, *COX8A*, *COX4I2*, *COX4I1*, *CYB5A*, *COX7A2L*, *COX5A*, *COX5B*, *SURF1*, *COX15*).

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Software (GraphPad Prism, version 6.0, La Jolla, CA, USA). All data are presented as the mean \pm SEM and are representative of three independent experimental replicates ($n = 3$). Normally distributed data were analyzed using the unpaired Student’s *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) Kruskal–Wallis test. The Mann–Whitney test was performed when data did not pass normality. *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Patients with Newly Diagnosed MM and Relapsed Patients Have an Increased Mitochondrial DNA Copy Number Associated with Worse Prognosis

We found that the average mtDNACN was higher in myeloma cells than in healthy plasma cells across the various stages of disease (153 vs. 40 copies; $p = 0.0001$), but no significant differences were observed in mtDNACN between the MGUS, SMM and NDMM subgroups (Figure 1A). A wide range of mtDNACN was detected within each group of patients, particularly for the NDMM subgroup (157 ± 139 copies, Figure 1A). Clinical data from the dataset are included in Table 1. Multiple variables could contribute to this increase in mitochondrial load, including the aberrant expression of mitochondrial genes related to biogenesis or mtDNA replication. Mutational screening of the nuclear genes responsible for mtDNA replication in a small subset of patients ($n = 12$) showed the presence of two mutations in the polymerase gamma gene (*POLG*); a missense variant in a patient with SMM (Ser933Gly, 50% variant read frequency (VRF), 57.1 copies of mtDNA); and a nonsense variant in a patient with RRMM (Glu538* 32% VRF, 214 copies of mtDNA). A third mutation was detected in *POLG2* in a patient with RRMM (Glu67Gln, 37% VRF, 191 mtDNA copies). The former two mutations were predicted to be deleterious by *in silico* SIFT and PolyPhen analysis (Table 2).

We next evaluated the impact of high mtDNACN on patient outcome in 69 of the 78 patients with NDMM and in available survival data. As shown in Figure 1B, the 11 patients with >400 mtDNA copies (85th percentile) had significantly shorter PFS than the remaining 58 patients (21.6 vs. 29.4 months; hazard ratio (HR) 3.78; 95% confidence interval 1.49–9.63, $p = 0.005$).

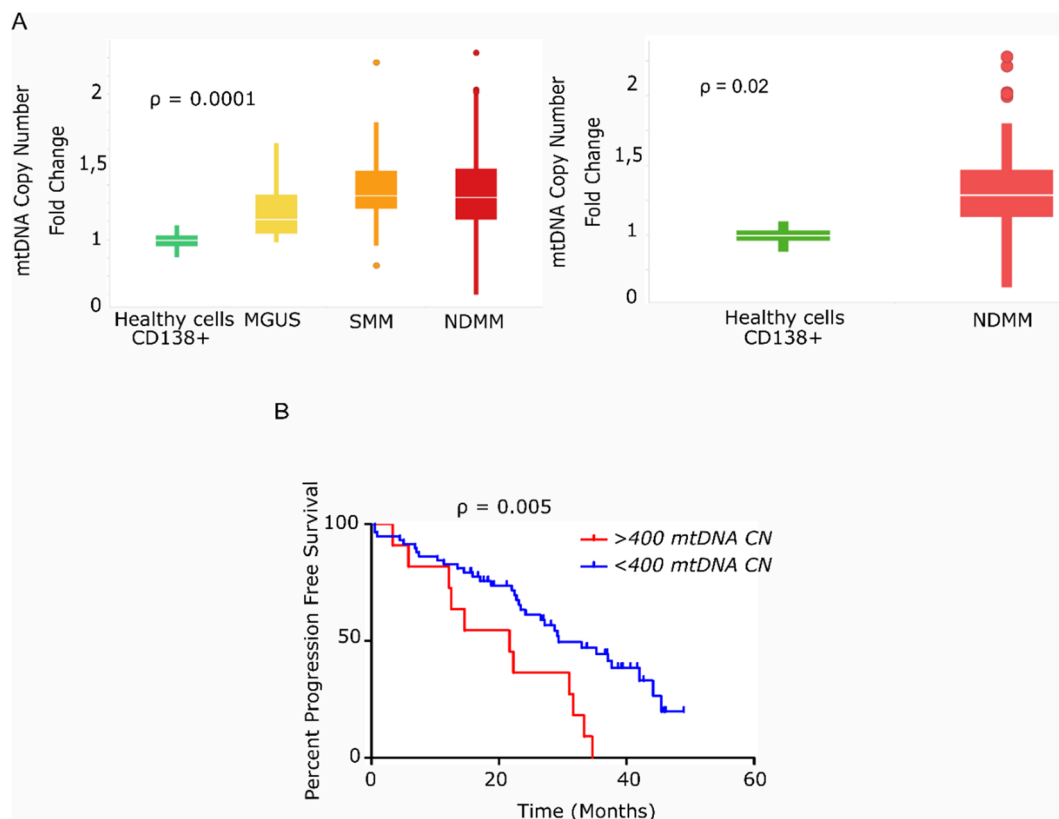


Figure 1. Primary multiple myeloma cells exhibit differences in mitochondrial DNA copy number, which correlates with survival. **(A)** Box-plots of mtDNACN values estimated from next-generation sequencing data ($n = 142$). MM/ healthy donors mtDNACN fold-change (153 vs. 40 copies), $p = 0.0001$ (ANOVA Kruskal–Wallis test). Average mtDNACN of MM cells from patients with NDMM and healthy plasma cells (157 vs. 40 copies), $p = 0.02$ (Mann–Whitney test). Data are presented as mean values \pm SD. **(B)** Kaplan–Meier curves of progression-free survival (PFS) in patients with MM. The red curve corresponds to patients with >400 mtDNA copies ($n = 11$). The blue curve corresponds to patients with <400 mtDNA copies ($n = 58$) ($p = 0.005$).

Table 2. Mutations responsible for mtDNA replication in a small subset of patients ($n = 12$).

Coordinates	Codons	Protein	Substitution	Region	dbSNP ID	SNP Type	Mutated Sample	Prediction
15,89864181,1,T/C	AGT-gGT	POLG	S933G	EXON CDS	Novel	Nonsynonymous	SMM	DAMAGING
15,89869943,1,C/A	GAG-tAG	POLG	E538X	EXON CDS	rs138413938:A	Nonsynonymous	RRMM	Damaging due to stop
17,62492888,1,C/G	GAG-cAG	POLG2	E67Q	EXON CDS	Novel	Nonsynonymous	RRMM	TOLERATED

3.2. Mitochondrial DNA Copy Number Increases with the Progression of MM Disease

Evaluation of mtDNACN from WGS data in paired SMM–NDMM samples from the same patient showed that 8/10 patients had an increase in the mtDNACN with progression of the disease. Of note, almost identical mtDNA signatures were found in rapidly-progressing SMM and NDMM (Figure 2A). The same finding was observed for mtDNACN evaluated by whole-exome sequencing (WES) from consecutive relapsed samples from the same patients, with an increase in mtDNACN in 17/21 patients (80%), including those patients with three sequential relapses (Figure 2B).

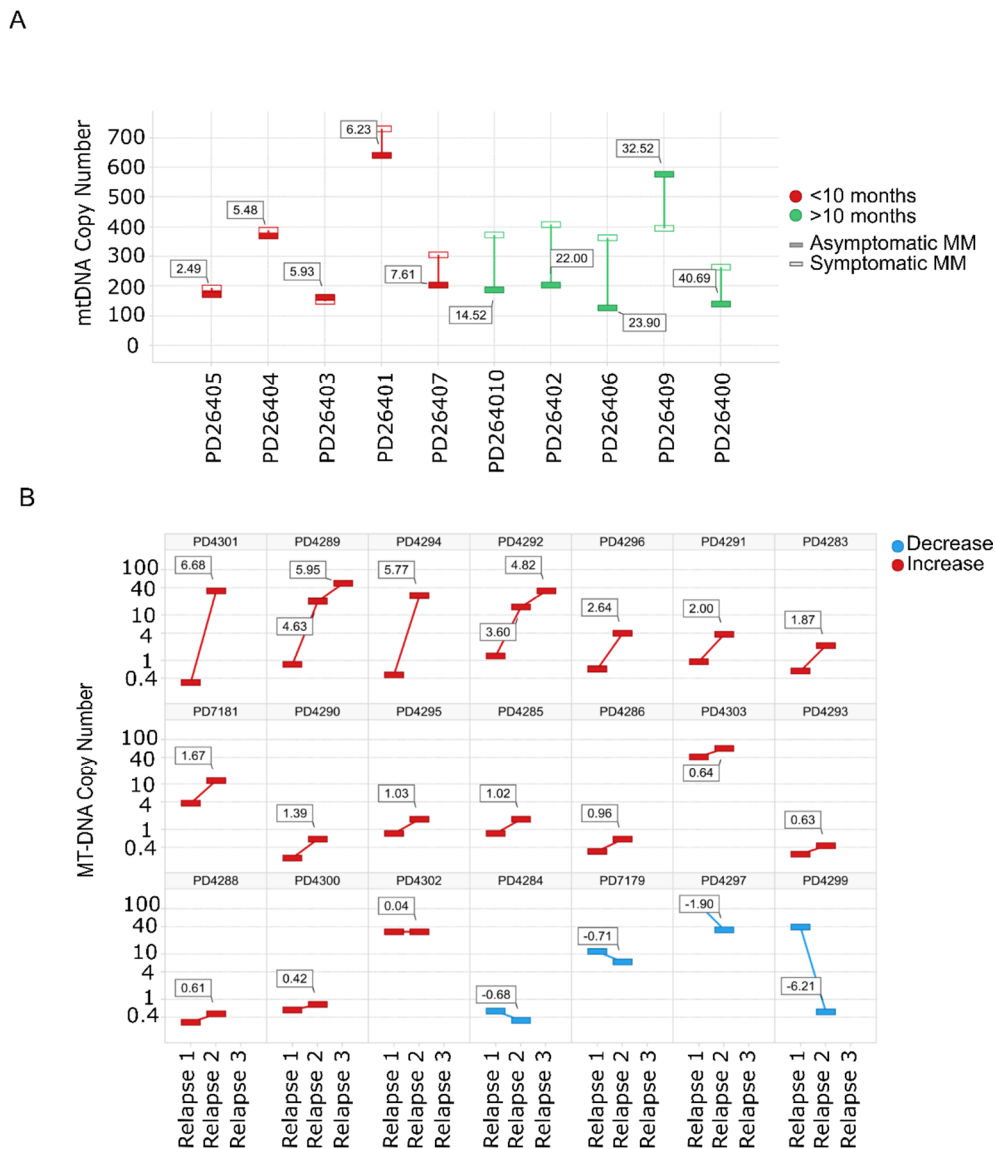


Figure 2. Mitochondrial DNA copy number increases with the progression of the disease. **(A)** mtDNACN calculated from WGS data from paired samples of 10 patients with SMM evolving to MM. Green bars correspond to patients with increased mtDNACN and red bars correspond to decreased mtDNACN, $p < 0.05$ (Mann–Whitney). **(B)** Changes in consecutive relapse patients were assessed from WES data of 21 patients ($n = 44$ samples), $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis). Red bars correspond to the increase between the first and second or second and third relapses, whereas blue bars correspond to a decrease.

3.3. Mitochondrial Biogenesis Regulator Genes Are Overexpressed in Advance States of MM with Implications for Prognosis

To elucidate whether the increase in mtDNACN was correlated with the expression of mitochondrial biogenesis regulators, we measured the levels of *TUFM* and *TFAM* by quantitative PCR in the different states of monoclonal gammopathies. The results showed that the expression of *TUFM* and *TFAM* was significantly higher in patients with RRMM than in patients with NDMM ($p = 0.01$ for both genes). Moreover, analysis of variance revealed significant differences between all groups for *TUFM* ($p = 0.0059$) and *TFAM* ($p = 0.006$) (Figure 3A).

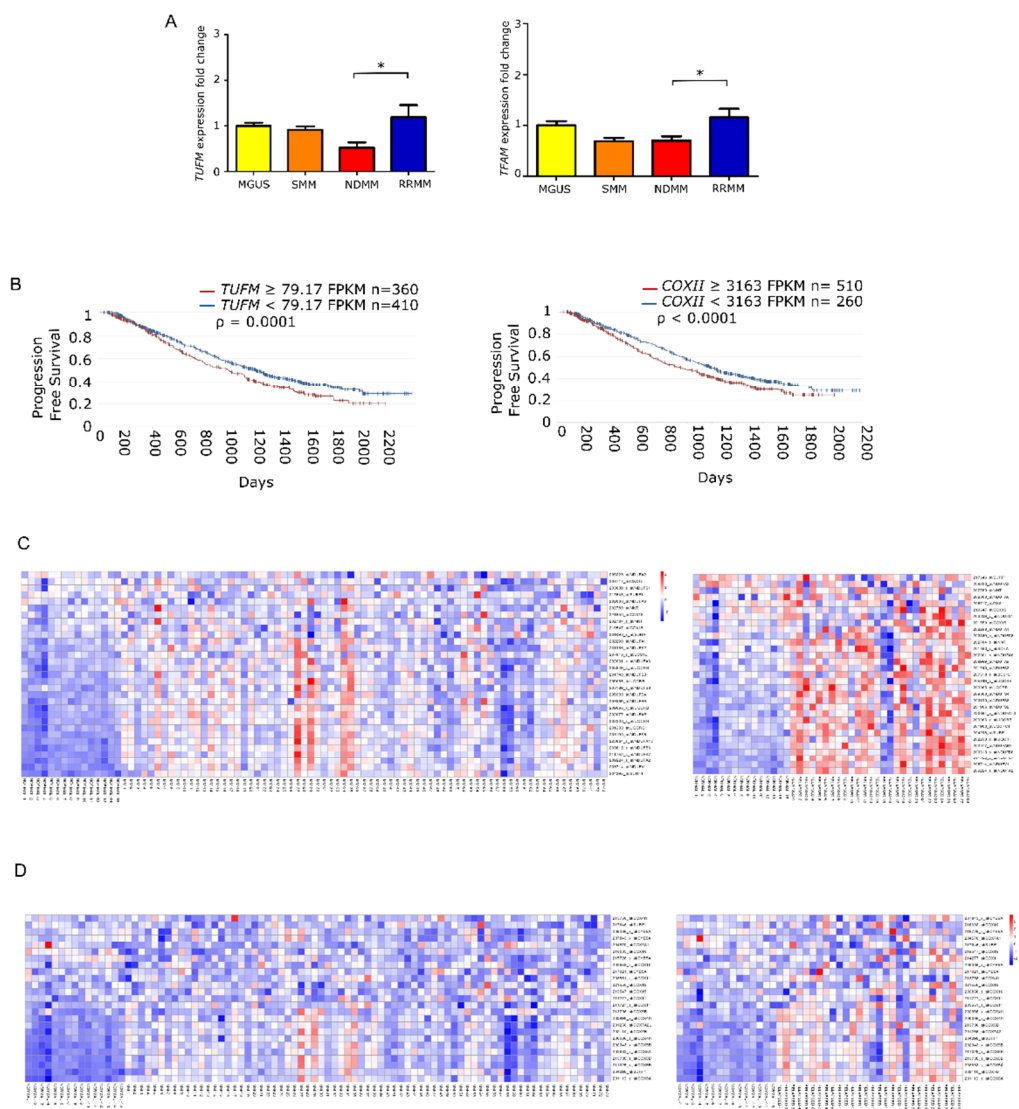


Figure 3. Mitochondrial gene expression is enhanced in late stage multiple myeloma. **(A)** Fold-change in gene expression of *TUFM* and *TFAM* relative to *GUSB* in patients (MGUS $n = 9$; SMM $n = 9$; NDMM $n = 18$; RRMM $n = 11$). Data are presented as mean values \pm SEM of technical triplicates. **(B)** High level of mitochondria-related genes identified by RNAseq analysis from the CoMMpass study (IA14); *TUFM* and *COXII* overexpression associate with shorter progression-free survival. **(C,D)** Heatmaps of canEvolve database analysis. **(C)** Gene-set enrichment analysis of the mitochondrial respiratory chain pathway; normal vs. NDMM, normal vs. RRMM. **(D)** Gene-set enrichment analysis of the cytochrome c oxidase activity pathway; normal vs. NDMM, normal vs. RRMM. * $p < 0.05$.

Following the same rationale as for mtDNACN, we evaluated whether the overexpression of those genes had any impact on patient PFS. To do this, we used the available RNA-seq data from the CoMMpass database, which corresponded to 770 patients with NDMM. We found that PFS was significantly shorter in those patients with overexpression in genes involved in mitochondrial biogenesis, including *TUFM* (HR 1.27) and *COXII* (HR 1.28) (Figure 3B). Additionally, we assessed the differential gene expression of MSigDB-defined pathways. The mitochondrial respiratory chain pathway (involving 31 genes) showed statistical differences between patients with NDMM and RRMM compared with healthy donors. The cytochrome c oxidase activity pathway (13 genes) showed the same trend (Figure 3C).

4. Discussion

Here, we report that elevated mtDNACN, which reflects the abundance of mitochondria, is an additional feature of MM. Our data provide evidence that the malignant transformation of myeloma cells is coupled to the activation of mitochondrial biogenesis, resulting in increased mtDNA levels [3–5] and mtDNACN changes [6,8,9]. Indeed, mtDNA can define early and late tumor progression in MM [12].

Monoclonal gammopathies, including MGUS, SMM and MM, are a group of disorders that share a common feature of clonal plasma cell proliferation. MGUS and SMM can evolve to MM through molecular mechanisms that are not fully understood. The biology of myelomagenesis establishes the basis of post-germinal center B-cell evolution to MGUS, SMM and, ultimately, MM. The most accepted theory postulates the existence of primary genetic events, such as IgH translocations, hyperdiploidy and cyclin D dysregulation [26], that trigger monoclonal gammopathies. There are also secondary genetic events that seem to be acquired for the progression of SMM to MM, including mutations in NRAS, KRAS, BRAF or NFKB pathways, loss-of-function of p53, PTEN or RB, and other genetic events, such as secondary translocations, miRNA changes and MYC upregulation [27]. All of these chromosomal/genetic abnormalities are linked to multiple phenotypic features, including osteoclast activation and osteoblast inhibition [28], homing of MM cells to the bone marrow niche and immune evasion.

Mitochondrial biogenesis is regulated by myriad molecules, with several implicated in MM disease. For instance, p53 can influence mitochondrial function and governs apoptosis [29]. Also, Myc is implicated in both mitochondrial biogenesis and MM, being commonly overexpressed and associated with its progression. MYC regulates several mitochondrial genes such as COX, POLG and TFAM, which are also altered in patients along MM progression [13,30,31]. We show that elevation of mtDNACN along MM progression correlates with increased expression of genes involved in mitochondrial biology (e.g., TUFM and TFAM). Mitochondrial biogenesis and activity is altered by aberrant gene expression and mutation of mitochondrial-related genes in MM disease and progression, and contributes to relapse [13–16]. Indeed, we found the presence of pathogenic mutations in genes involved in mtDNA replication, such as POLG and POLG2, which dysregulate mitochondrial biogenesis and could contribute to mtDNA increases [32].

Mitochondrial biogenesis is increased as a consequence of molecular dysregulation of myelomagenesis events, with a concomitant increase of mtDNACN. We recently described an increase in mitochondrial activity during the progression of monoclonal gammopathies [13], and established mitochondria as a novel therapeutic target of the disease to override the resistance to frontline treatments [13]. Ortiz-Ruiz et al. described the gain of mitochondrial content and its consequent increase of OXPHOS due to MYC dysregulation that leads to an increase of mitochondrial biogenesis in vitro, which was also confirmed in the current article in clinical patients. Lack of response to treatments triggered by mitochondrial dysregulation could explain the poor prognosis of patients with an increase in mtDNACN or in mitochondrial biogenesis gene expression [13]. Thus, Ortiz-Ruiz et al. described mechanistically some of the findings of the clinical data showed in the current article.

Within non-myeloma monoclonal gammopathies, SMM is especially challenging in terms of clinical management due to the wide variability in its progression and its risk classification is an important clinical aspiration (e.g., the Mayo Clinic model [17]). While critical advances have been made in the knowledge of SMM, it remains crucial to fully understand and determine the prognosis and classification of SMM and high-risk SMM in order to guide decision making in the management of the disease. Our findings suggest the use of mtDNACN monitoring in monoclonal gammopathies, especially in SMM. Although risk factors have now been defined by the International Myeloma Working Group, controversy exists around the definition of high-risk SMM and its management. Our data support the implementation of mtDNACN analysis, a technique available in

the clinic for multiple mitochondrial diseases, in monoclonal gammopathies, especially in SMM and MM.

5. Conclusions

Our results demonstrate that elevation of mtDNA content occurs in monoclonal gammopathies (MGUS and SMM) and MM as the disease progresses, and it is notably enhanced in those patients who relapse. Increases in mtDNACN might be linked to aberrant genetic events, such as *POLG* mutations or *MYC* upregulation, as we recently described [13], or to other genetic events triggering an increase of mitochondrial gene expression (e.g., *TFAM*, *TUFM*), load and activity, contributing to poor prognosis and treatment resistance. Additionally, our data provide novel insights into patients with rapidly-progressing SMM and those who relapse, and the potential value of mtDNACN status and evolution for classifying and supporting clinical decisions for these patients. Further analysis in mitochondrial content and activity and confirmative studies with additional samples should be pursued to unravel the role of mitochondria in monoclonal gammopathies.

Author Contributions: Y.R.-H. and A.O.-R. contributed to experimental procedures and data analysis and wrote the manuscript. M.K.S. contributed to massive data sequencing procedures and analysis. V.G. and L.R. contributed to sample collection and experimental procedures. R.S. (Ricardo Sanchez) contributed to massive data analysis. P.A.-G. and M.A.M. contributed to qRT-PCR experiments. S.B. contributed to repository data analysis. N.B., Y.-T.T., R.S. (Raphaël Szalat), M.F. and N.M. contributed to supervision of the experiments, data analysis and manuscript revision. J.M.-L. contributed to the conception and design of the study, economical support and the analysis of the data. M.L. and M.G. contributed to the conception and design of the study, experimental procedures, data analysis and economical support and wrote the manuscript. All authors contributed to the interpretation of the data, critically reviewed and revised the manuscript, approved the final manuscript for publication, and vouch for data accuracy and completeness. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CRIS contra el Cancer Foundation, Miguel Servet (CP19/00140), AECC (INVE19015GALL & IDEAS20014LINA), ISCIII AES (PI18/00295 & PI18/01519), Madrid + d from Comunidad de Madrid YEI (PEJD-2017-PRE/BMD-4835 and PEJD-2019-POST/BMD-14505) and N.B. is funded by the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement no. 817997).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain) (last update: 20/326, 2 June 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The RNA-seq data from the CoMMpass that were analyzed in this study are publicly available through the Multiple Myeloma Genomics Initiative (<https://research.themmr.org>; accessed on 22 April 2020) with the identifier IA14.

Acknowledgments: We thank all of the patients who participated in the study and their families, as well as the study sub-investigators, research nurses and coordinators at each study site.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rich, R.R.; Fleisher, T.A.; Shearer, W.T.; Schroeder, H.; Frew, A.J.; Weyand, C.M. *Clinical Immunology. Principles and Practice*, 5th ed.; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
2. Lipchick, B.C.; Fink, E.E.; Nikiforov, M.A. Oxidative stress and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Pharmacol. Res.* **2016**, *105*, 210–215. [[CrossRef](#)]
3. Misund, K.; Keane, N.; Stein, C.K.; Asmann, Y.W.; Day, G.; Welsh, S.; Van Wier, S.A.; Riggs, D.L.; Ahmann, G.; Chesi, M.; et al. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. *Leukemia* **2020**, *34*, 322–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Maiso, P.; Huynh, D.; Moschetta, M.; Sacco, A.; Aljawai, Y.; Mishima, Y.; Asara, J.M.; Roccaro, A.M.; Kimmelman, A.C.; Ghobrial, I.M. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2071–2082. [[CrossRef](#)]
5. Sriskanthadevan, S.; Jeyaraju, D.V.; Chung, T.E.; Prabha, S.; Xu, W.; Skrtic, M.; Jhas, B.; Hurren, R.; Gronda, M.; Wang, X.; et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. *Blood* **2015**, *125*, 2120–2130. [[CrossRef](#)]
6. Nguyen, L.; Papenhausen, P.; Shao, H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes* **2017**, *8*, 116. [[CrossRef](#)]
7. De Barrios, O.; Meler, A.; Parra, M. MYC's Fine Line Between B Cell Development and Malignancy. *Cells* **2020**, *9*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bloedjes, T.A.; De Wilde, G.; Guikema, J.E.J. Metabolic Effects of Recurrent Genetic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Manasanch, E.E. Myc is also the bad guy in myeloma. *Leuk. Lymphoma* **2016**, *57*, 2485–2486. [[CrossRef](#)]
10. Reznik, E.; Miller, M.L.; Senbabaoglu, Y.; Riaz, N.; Sarungbam, J.; Tickoo, S.K.; Al-Ahmadie, H.A.; Lee, W.; Seshan, V.E.; Hakimi, A.A.; et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
11. Yuan, Y.; Ju, Y.S.; Kim, Y.; Li, J.; Wang, Y.; Yoon, C.J.; Yang, Y.; Martincorena, I.; Creighton, C.J.; Weinstein, J.N.; et al. Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nat. Genet.* **2020**, *52*, 342–352. [[CrossRef](#)]
12. Lee, W.T.; Cain, J.E.; Cuddihy, A.; Johnson, J.; Dickinson, A.; Yeung, K.Y.; Kumar, B.; Johns, T.G.; Watkins, D.N.; Spencer, A.; et al. Mitochondrial DNA plasticity is an essential inducer of tumorigenesis. *Cell Death Discov.* **2016**, *2*, 16016. [[CrossRef](#)]
13. Ortiz-Ruiz, A.; Ruiz-Heredia, Y.; Morales, M.L.; Aguilar-Garrido, P.; García-Ortiz, A.; Valeri, A.; Bárcena, C.; García-Martin, R.M.; Garrido, V.; Moreno, L.; et al. Myc-Related Mitochondrial Activity as a Novel Target for Multiple Myeloma. *Cancers* **2021**, *13*, 1662. [[CrossRef](#)]
14. Hoang, P.H.; Cornish, A.J.; Chubb, D.; Jackson, G.; Kaiser, M.; Houlston, R.S. Impact of mitochondrial DNA mutations in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bajpai, R.; Sharma, A.; Achreja, A.; Edgar, C.L.; Wei, C.; Siddiqua, A.A.; Gupta, V.A.; Matulis, S.M.; McBrayer, S.K.; Mittal, A.; et al. Electron transport chain activity is a predictor and target for venetoclax sensitivity in multiple myeloma. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chauhan, D.; Li, G.; Podar, K.; Hideshima, T.; Mitsiades, C.; Schlossman, R.; Munshi, N.; Richardson, P.; Cotter, F.E.; Anderson, K.C. Targeting mitochondria to overcome conventional and bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* **2004**, *104*, 2458–2466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kyle, R.A.; Remstein, E.D.; Therneau, T.M.; Dispenzieri, A.; Kurtin, P.J.; Hodnefield, J.M.; Larson, D.R.; Plevak, M.F.; Jelinek, D.F.; Fonseca, R.; et al. Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 2582–2590. [[CrossRef](#)]
18. Zamagni, E.; Nanni, C.; Gay, F.; Pezzi, A.; Patriarca, F.; Bellò, M.; Rambaldi, I.; Tacchetti, P.; Hillengass, J.; Gamberi, B.; et al. 18F-FDG PET/CT focal, but not osteolytic, lesions predict the progression of smoldering myeloma to active disease. *Leukemia* **2016**, *30*, 417–422. [[CrossRef](#)]
19. Neben, K.; Jauch, A.; Hielscher, T.; Hillengass, J.; Lehnert, N.; Seckinger, A.; Granzow, M.; Raab, M.S.; Ho, A.D.; Goldschmidt, H.; et al. Progression in Smoldering Myeloma Is Independently Determined by the Chromosomal Abnormalities del(17p), t(4;14), Gain 1q, Hyperdiploidy, and Tumor Load. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4325–4332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Maura, F.; Bolli, N.; Angelopoulos, N.; Dawson, K.J.; Leongamornlert, D.; Martincorena, I.; Mitchell, T.J.; Fullam, A.; Gonzalez, S.; Szalat, R.; et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat. Commun.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Andreu, A.L.; Martinez, R.; Marti, R.; Garcia-Arumi, E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: Pre-analytical factors. *Mitochondrion* **2009**, *9*, 242–246. [[CrossRef](#)]
22. Qian, Y.; Butler, T.J.; Opsahl-Ong, K.; Giroux, N.S.; Sidore, C.; Nagaraja, R.; Cucca, F.; Ferrucci, L.; Abecasis, G.R.; Schlessinger, D.; et al. fastMitoCalc: An ultra-fast program to estimate mitochondrial DNA copy number from whole-genome sequences. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 1399–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rao, X.; Huang, X.; Zhou, Z.; Lin, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.* **2013**, *3*, 71–85.
25. The Multiple Myeloma Genomics Initiative. Available online: <https://research.themmr.org/> (accessed on 22 April 2020).
26. Bergsagel, P.L.; Kuehl, W.M.; Zhan, F.; Sawyer, J.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. Cyclin D dysregulation: An early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* **2005**, *106*, 296–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chapman, M.A.; Lawrence, M.S.; Keats, J.J.; Cibulskis, K.; Sougnez, C.; Schinzel, A.C.; Harview, C.L.; Brunet, J.-P.; Ahmann, G.J.; Adli, M.; et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **2011**, *471*, 467–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tian, E.; Zhan, F.; Walker, R.; Rasmussen, E.; Ma, Y.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J.D. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 2483–2494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
29. Mihara, M.; Erster, S.; Zaika, A.; Petrenko, O.; Chittenden, T.; Pancoska, P.; Moll, U.M. p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 577–590. [[CrossRef](#)]
 30. Li, F.; Wang, Y.; Zeller, K.I.; Potter, J.J.; Wonsey, D.R.; O'Donnell, K.A.; Kim, J.-W.; Yustein, J.T.; Lee, L.A.; Dang, C.V. Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 6225–6234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Seo, J.H.; Agarwal, E.; Chae, Y.C.; Lee, Y.G.; Garlick, D.S.; Storaci, A.M.; Ferrero, S.; Gaudioso, G.; Gianelli, U.; Vaira, V.; et al. Mitochondrial fission factor is a novel Myc-dependent regulator of mitochondrial permeability in cancer. *EBioMedicine* **2019**, *48*, 353–363. [[CrossRef](#)]
 32. Kauppila, T.E.S.; Kauppila, J.H.K.; Larsson, N.-G. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 57–71. [[CrossRef](#)]