



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Microambiente en mieloma múltiple. Papel de las células madre mesenquimales en la progresión del tumor.**

**Multiple Myelome Microenvironment. Role of Mesenchymal Stem cells in tumor progression.**

**Autora: Daniela Melnic Melnic**

**Directora: Prof<sup>a</sup> Dra. Flor María Pérez Campo**

**Santander, Mayo 2023**

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>GLOSARIO.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
4.1	EPIDEMIOLOGÍA DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....	11
4.2	CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....	12
4.3	TRATAMIENTOS.....	12
<b>5</b>	<b>PAPEL DEL MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA EN EL DESARROLLO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....</b>	<b>14</b>
5.1	INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MIELOMA MÚLTIPLE CON LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	15
5.1.1	<i>Definición Células Madre Mesenquimales.....</i>	<i>15</i>
5.1.2	<i>Interacción MM/CMMs a través de moléculas de adhesión y moléculas solubles.....</i>	<i>16</i>
5.1.3	<i>Interacción MM/CMMs a través de Vesículas Extracelulares.....</i>	<i>18</i>
5.2	ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN MIELOMA MÚLTIPLE.....	19
5.2.1	<i>Evolución de las células madre mesenquimales de individuos sanos a MM: causa o consecuencia.....</i>	<i>20</i>
<b>6</b>	<b>PAPEL DE LAS CMMS EN LA PROGRESIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE.....</b>	<b>22</b>
6.1	PAPEL DE LAS CMMS EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL MM. ....	22
6.2	PAPEL DE LAS CMMS EN LA DISEMINACIÓN Y HOMING DE LAS CÉLULAS DEL MM. ....	25
6.3	PAPEL DE LAS CMMS EN LA AFECTACIÓN ÓSEA.....	26
6.3.1	<i>Interacción de las células del MM con osteoclastos.....</i>	<i>27</i>
6.3.2	<i>Interacción de las células del MM con los osteoblastos.....</i>	<i>29</i>
<b>7</b>	<b>FACTORES DEL MICROAMBIENTE QUE FAVORECEN LA RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS.....</b>	<b>31</b>

<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>40</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>

## **1 GLOSARIO.**

A1/BFL1: The Bcl-2-related protein A1

APAF-1: Apoptotic protease activating factor-1

Apo2L/TRAIL: Apo2 ligand / TNF-Related apoptosis inducing ligand

APRIL: A proliferation-inducing ligand

ASCT: Autologous stem cells transplantation o trasplante autólogo de células madre

AXII: Annexin II

AXIIR: Annexin II Receptor

BAFF: B-cell activating factor

Bcl-2: B cell Lymphoma 2

bFGF: Corning basic Fibroblast Growth Factor

BMPs: Bone morphogenetic proteins

CAM-DR: Cell adhesion-mediated drug resistance

CAMs: Cell Adhesion Molecules

CCR1: C-C Motif Chemokine Receptor 1

CCR5: C-C Motif Chemokine Receptor 5

CCR8: C-C Motif Chemokine Receptor 8

CDC25A: Cell division cycle 25 homolog A

CDK: Cyclin-dependent kinase

CDK2: Cyclin-dependent kinase 2

C-FLIP: Cellular FLICE inhibitory protein

cIAP2: Cellular inhibitor of apoptosis 2

CMMs: Células Madre Mesenquimales

CTLA-4: Cytotoxic T – Lymphocyte Antigen 4

DKK1: Dickkopf-1

DLX5: Distal-less homeobox 5

DS-CMMs: CMMs derivadas de donantes sanos

EGF: Epidermal growth factor

EM-DR: Environmental-mediated drug resistance

FAK: Focal Adhesion Kinase

FN: Fibronectina

G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor

Gas6: Growth arrest-specific gene 6

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

HGF: Hepatocyte growth factor

HSC: Células Madre Hematopoyéticas o Hematopoyetic Stem Cells

HSP: Heat Shock Protein

HSP-27: Heat Shock Protein 27

HSP-70: Heat Shock Protein 70

HSP-90: Heat Shock Protein 90

IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis

ICAM: Intercelular Adhesion Molecule

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IGF1: Insulin-like growth factor-1

iHDACs: Histone deacetylase inhibitors

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta

IL-10: Interleucina 10

IL-11: Interleucina 11

IL-17: Interleucina 17

IL-3: Interleucina 3

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

IMiDs: Fármacos inmunomoduladores o immunomodulatory drugs

IMWG: Grupo Internacional del Trabajo del Mieloma o International Mielome Working Group

LFA-1: Leukocyte Function associate Antigen 1

mAbs: Anticuerpos monoclonales o monoclonal antibodies

Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1, CCL2

MIP-1 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$

miR-15a: microRNA 15a

miRNA: microRNAs

MM: Mieloma Múltiple

MM-CMMs: Células madre mesenquimales derivadas de pacientes con MM

MMP1: Metaloproteinasa de la matriz 1

MMP14 (MT1-MMP): Metaloproteinasa 14

MMP9: Metaloproteinasa 9

MMPs: Metaloproteasas

MO: Médula ósea

MOMP: Mitochondrial Outer Membrana Permeabilization

MRD: Enfermedad residual mínima

mRNA: RNAs mensajeros

MUC-1: mucin 1, cell Surface-associated

OPG: osteoprotegerina

OPN: osteopontina

PDGF: Platelet derived growth factor

PGE2: prostaglandina E2

PIs: inhibidores del proteosoma o proteasome inhibitors

RAFTK: Protein Tyrosin Kinase 2 beta (PTK2B)

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B ligand

Rb: Proteína del retinoblastoma

Ror2: Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2

SHP2: Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11, PTPN11

SDF1 $\alpha$  (CXCL12): Stromal-cell derived factor-1

SFM-DR: Soluble factors-mediated drug resistance

sFRP-2: Secreted frizzled-related protein 2

sFRP-3: Secreted frizzled-related protein 3

TGF $\beta$ : Transforming growth factor

TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor

VCAM-1: Vascular adhesion molecule

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEs: Vesículas Extracelulares

VLA-4: Very Late Antigen 4;  $\alpha$ 4 $\beta$ 1

VLA-5: Very Late Antigen 5, CD49;  $\alpha$ 5 $\beta$ 1

## 2 RESUMEN.

### RESUMEN

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia maligna conformada por células plasmáticas derivadas de un mismo clon que se caracterizan por la secreción de una inmunoglobulina monoclonal, el componente M. Estas células residen en la médula ósea y a medida que avanza la enfermedad se encuentran en otras localizaciones extramedulares que dan lugar a las manifestaciones clínicas conocidas por el acrónimo CRAB. Esta entidad constituye el 0,9% de todos los casos de cáncer diagnosticados, la incidencia se encuentra en aumento, aunque la mortalidad está en descenso por el avance científico en las dianas terapéuticas. El microambiente tiene un papel muy importante a nivel de la progresión tumoral de esta enfermedad, concretamente en este trabajo se lleva a cabo una revisión bibliográfica donde nos centraremos en el papel de las células madre mesenquimales (CMMs), las cuales interactúan con las células del MM a través de adhesiones celulares, moléculas solubles y vesículas extracelulares que favorecen a la proliferación, la diseminación, la afectación ósea y la resistencia a los tratamientos. Estas interacciones son críticas para el desarrollo y evolución de la enfermedad.

**Palabras clave:** Mieloma múltiple, células madre mesenquimales, microambiente, progresión tumoral

### ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is a malignant neoplasm made up of plasma cells derived from the same clone characterized by the secretion of a monoclonal immunoglobulin, the M component. These cells reside in the bone marrow and as the disease progresses they are found in other extramedullary locations giving rise to the clinical manifestations known by the acronym CRAB. This entity constitutes 0.9% of all diagnosed cases of cancer, the incidence is increasing, although mortality is decreasing due to scientific advances in therapeutic targets. The microenvironment plays a very important role in the tumor progression of this disease, specifically in this work we carry out a literature review where we will focus on the role of mesenchymal stem cells (MSCs), which interact with MM cells through cell adhesions, soluble molecules and extracellular vesicles that favor proliferation, dissemination, bone involvement and resistance to treatments. These interactions are critical for the development and progression of the disease.

**Key words:** multiple myeloma, mesenchymal stem cells, microenvironment, tumor progression

### 3 OBJETIVOS Y METODOLOGÍA.

El objetivo principal de este trabajo es explicar el papel de las células madre mesenquimales (CMMs) en relación con el mieloma múltiple (MM), es decir, en la proliferación de las células tumorales, su diseminación, la afectación ósea y resistencia a los tratamientos. Para poder realizar esto en primer lugar se ha expuesto qué es el MM, como se define y la evolución de esta enfermedad. A continuación, se ha definido a las CMMs y cómo es su relación con las células del MM.

Para poder realizar esto se ha llevado a cabo una revisión sistemática sobre los aspectos más importantes de las CMMs con respecto al MM, primero, la conexión que existen entre ambas por vías directas e indirectas, a continuación, de forma más específica su actuación a nivel de la proliferación, diseminación y *homing* para finalizar con su papel en la afectación ósea y en la resistencia a los tratamientos. Existen numerosos artículos acerca esta correlación.

Se han revisado múltiples artículos que se encuentran referenciados en el texto e incluidos en la bibliografía. Todos los artículos consultados están disponibles en PubMed.

## 4 INTRODUCCIÓN.

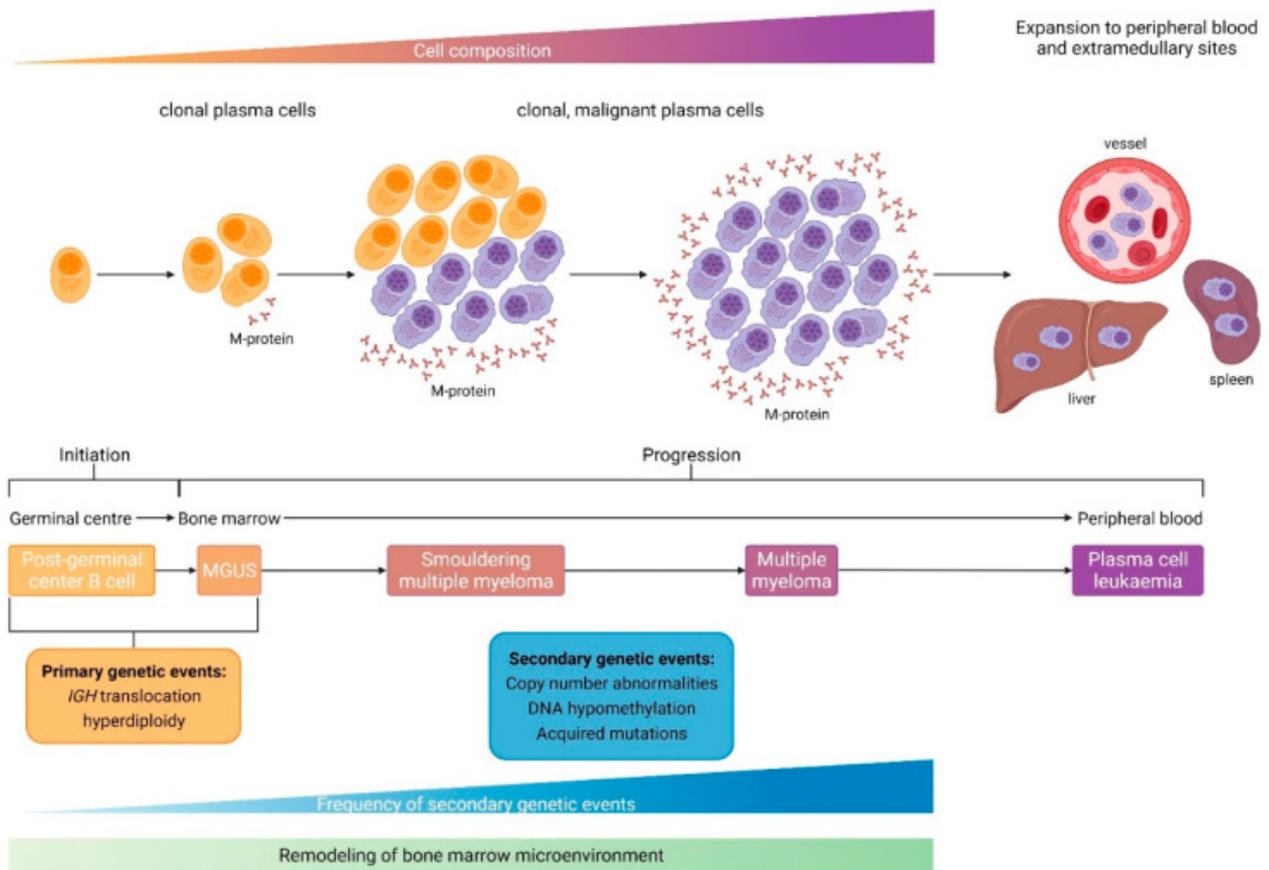
El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia maligna conformada por células plasmáticas derivadas de un mismo clon. En la mayor parte de los pacientes, esta enfermedad se caracteriza por la secreción de una inmunoglobulina monoclonal, también conocida como componente M, producida por las células plasmáticas neoplásicas del MM (1). Las células del MM residen a nivel de la médula ósea (MO), pero a medida que avanza la enfermedad se pueden encontrar en otras localizaciones extramedulares como la sangre periférica, tejidos blandos y varios órganos (2).

Las manifestaciones clínicas típicas son conocidas por el acrónimo CRAB y son consecuencia del componente monoclonal, la presencia de las células plasmáticas malignas y las citocinas secretadas por estas mismas. El acrónimo CRAB se traduce en: (C) Calcio elevado o hipercalcemia, (R) procede de “Renal failure” o fallo renal, (A) de Anemia y (B) de “Bone lesions” o afectación ósea.

Esta patología puede darse *de novo* o como evolución de una Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto (GMSI). El riesgo de progresión de una GMSI a un MM es de 1% por año. La GMSI se caracteriza por infiltración en la médula ósea de las células plasmáticas (<10%), componente de proteína M 30g/L y ausencia de las manifestaciones clínicas del mieloma múltiple (CRAB). Si la GMSI avanza y el componente M es >30g/L (o componente-M urinario ≥ 500 mg/24h) y/o la infiltración celular en la médula ósea es entre 10-60 % en ausencia de otros criterios de mieloma, se considera Mieloma Smoldering (quiescente) y su riesgo de progresión de Mieloma Smoldering a MM es de 50% a los 5 años (3).

Las células plasmáticas provienen de las células madre hematopoyéticas (HSC o Hematopoyetic Stem Cells) que a nivel de la médula ósea sufren una serie de procesos de diferenciación dando lugar a las células B. En la superficie de estas células B se encuentra el complejo IgH-IgL a través del cual se produce su migración a los órganos linfoides secundarios. Allí se producirán una serie de interacciones que finalmente darán lugar a las células plasmáticas capaces de producir anticuerpos específicos frente a los diferentes antígenos (4).

La evolución de estos estadios previos hacia MM (**Figura 1**) es un proceso complejo que actualmente se desconoce en su totalidad. Se cree que consiste en diversos pasos que involucran cambios genéticos en la célula tumoral, sumados a la existencia de un microambiente óptimo que favorecería que ocurriesen estos cambios (1). Este proceso podría darse como consecuencia de una expansión clonal de la célula B madura que ha pasado por el centro germinal o de una serie de eventos genéticos en las células plasmáticas, produciéndose un evento genético primario (translocaciones IgH o hiperploidias) que es seguido por acumulación de múltiples eventos genéticos secundarios (mutaciones, cambios epigenéticos, etc.) (3).



**Figura 1. El desarrollo de las gammopatías monoclonales.** El mieloma múltiple deriva del resultado de un proceso complejo y múltiples pasos y cambios en la médula ósea y puede ser derivado de la gammapatía monoclonal de significado incierto y el mieloma smoldering. Tomado de: *Targeting the Microenvironment for Treating Multiple Myeloma* Por Neumeister P et al, 2022. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23.

#### 4.1 Epidemiología del Mieloma Múltiple.

Aunque el MM es un cáncer relativamente poco común, su incidencia va en aumento. De acuerdo con las últimas estadísticas de Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) se ha estimado 160.000 casos de MM a nivel global en 2018, siendo estos el 0,9% de todos los casos de cáncer diagnosticados. Aproximadamente, 90.000 casos fueron hombres y 70.000 mujeres, siendo la incidencia estandarizada de MM de 2,1/100.000 y 1,4/100.000 respectivamente (5). Esta neoplasia es más común y está en aumento en los países más desarrollados destacándose Australia, países de Europa occidental y EE. UU. (6).

En cuanto a la mortalidad, en 2018, se estima que 106.000 personas fallecieron por MM, siendo esto el 1,1% de todas las muertes por cáncer. De entre estos 59.000 fueron hombres y 47.000 mujeres, siendo la incidencia estandarizada para ambos sexos de 1,3/100.000 y 0,9/100.000 respectivamente (5).

Es importante señalar que a pesar de que la incidencia está aumentando en las últimas décadas, la mortalidad está disminuyendo debido al aumento de la supervivencia por el avance científico en las dianas terapéuticas (6). La supervivencia varía en función del estadio en el momento del diagnóstico, en los casos en los que el MM se encuentra localizado es de 74,8% a los 5 años (solamente se da en un 5% de los casos) y en los que la enfermedad es sistémica es de 52,9% a los 5 años (el 95% de los casos) (6). La edad media al diagnóstico es a los 69 años, el 60% se da por encima de los 65 años y menos del 15% se diagnostica antes de los 55 (7). También cabe destacar que es 1,5 veces más frecuente en hombres que en mujeres (8).

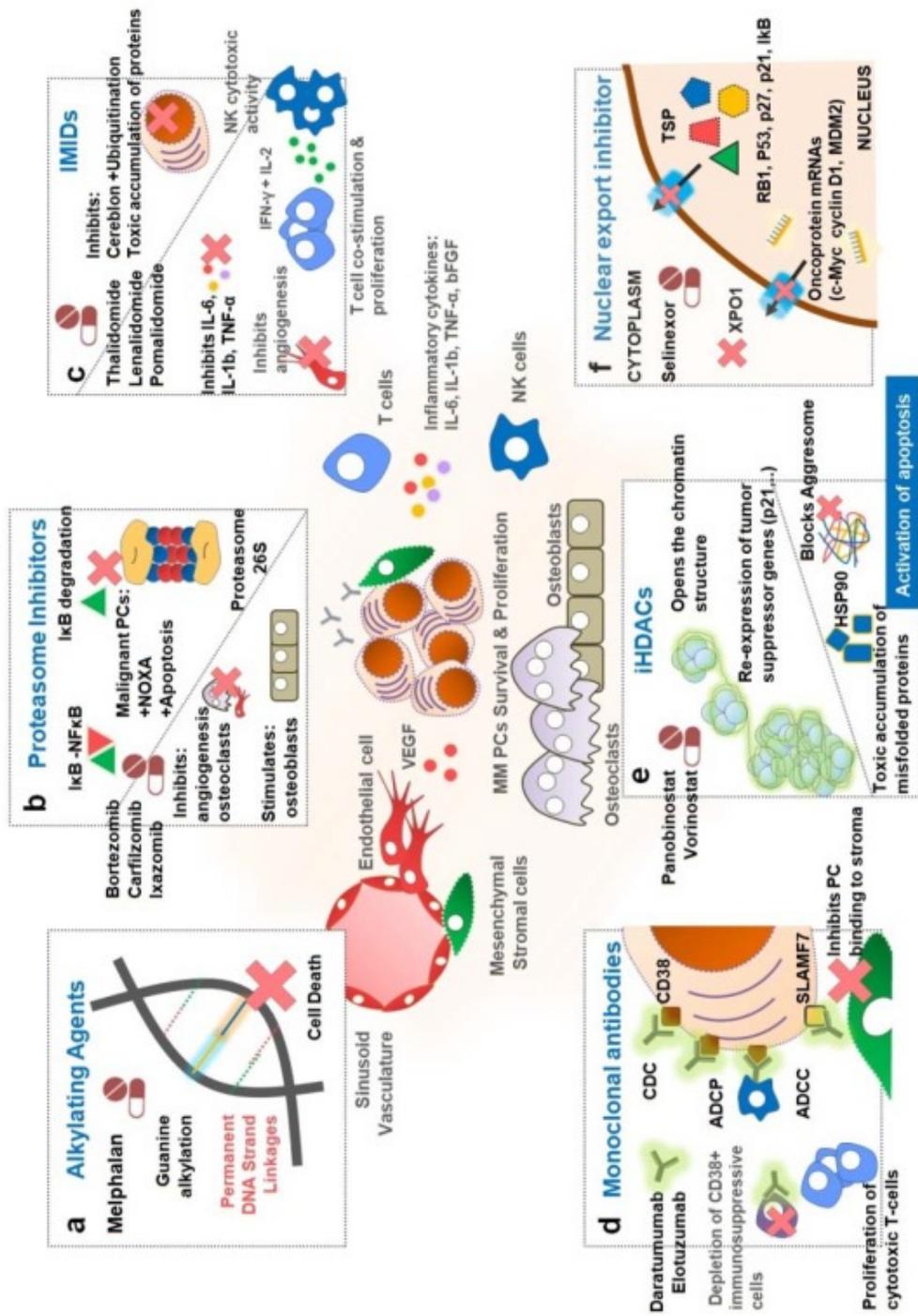
## 4.2 Criterios para el diagnóstico del Mieloma Múltiple.

Los criterios diagnósticos para el MM se rigen por los criterios del Grupo Internacional del Trabajo del Mieloma (IMWG: International Mielome Working Group) y se basan en los niveles del componente monoclonal, plasmocitosis clonal de la médula ósea, biomarcadores y evidencia de daño orgánico (CRAB). Para establecer un diagnóstico de MM debe existir infiltración de las células plasmáticas en la médula ósea >10% o biopsia con plasmocitoma y uno o más de los siguientes eventos (9):

- Cualquiera de los eventos definatorios de mieloma:
  - Evidencia de daño orgánico por el proceso:
    - Hipercalcemia >11mg/dl o 1mg/dl por encima del límite normal.
    - Insuficiencia renal: CCr < 40ml/min o Cr sérica >2mg/dl
    - Anemia: Hb <10g/dl o 2g/dl por debajo del límite normal
    - Lesiones óseas: una o más en Radiografía, TC o PET-TC
  - Uno o más de los siguientes biomarcadores de malignidad:
    - Infiltración de las células plasmáticas en la médula ósea >60%
    - Relación cadenas ligeras implicadas/no implicadas  $\geq$  100 (implicadas debe ser  $\geq$  100mg/l)
    - Más de una lesión focal de al menos 5mm en RM.

## 4.3 Tratamientos.

El tratamiento del MM ha sufrido varios cambios a lo largo de la última década ya que ha habido muchos avances en la comprensión de la enfermedad, y la accesibilidad a nuevos tratamientos. Los tratamientos actuales incluyen la combinación de diferentes fármacos con distintos mecanismos de acción. Dentro de estos fármacos se encuentran los corticoesteroides, los agentes alquilantes, las antraciclinas, los inhibidores del proteosoma (PIs o proteasome inhibitors), fármacos inmunomoduladores (IMiDs o immunomodulatory drugs), inhibidores de histona deacetilasas (iHDACs o histone deacetylase inhibitors), anticuerpos monoclonales (mAbs o monoclonal antibodies), inhibidores de la exportación nuclear (nuclear export inhibitor) y quimioterapia a altas dosis con trasplante autólogo de células madre (ASCT o autologous stem cells transplantation) (10,11) (**Figura 2**).



**Figura 2. Opciones terapéuticas en el MM.** Los tratamientos utilizados en el MM incluyen corticoesteroides, agentes alquilantes, inhibidores del proteosoma (Pis), tratamiento inmunomodulador (IMiDs), anticuerpos monoclonales, inhibidores de la histona deacetilasa (histone deacetylase inhibitors; iHDACs) y el inhibidor de la exportación nuclear (nuclear export inhibitor). Tomado de: Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance Por Vanessa Pinto et al, 2020. Cancers.

El principal objetivo del tratamiento del MM es controlar la progresión de la enfermedad, disminuir las complicaciones derivadas del MM y aumentar la supervivencia (12). El tratamiento tiene tres fases, la inducción, la consolidación y el mantenimiento.

La elección del tratamiento va a depender del tipo de paciente, la edad y comorbilidades asociadas. Actualmente la terapia de inducción es una triple combinación de bortezomib, lenalidomida y dexametasoma (11). Después de la primera respuesta se sigue con la terapia de consolidación. Dependiendo del tipo de paciente, edad y comorbilidades asociadas se tratará con dosis altas de melphalan y ASCT en aquellos pacientes que sean aptos para trasplante o se consolida/mantiene el tratamiento con bortezomib o lenalidomida en los que no (11).

En caso de recurrencia de la enfermedad existen otros fármacos como Selinexor, un inhibidor de la exportación nuclear, panobinostat, un iHDACs y belantamab, un mAbs, que se utilizan habitualmente en esos casos (12).

## **5 PAPEL DEL MICROAMBIENTE DE LA MÉDULA ÓSEA EN EL DESARROLLO DEL MIELOMA MÚLTIPLE.**

En 1889, Stephen Paget introdujo la hipótesis de “semilla y suelo”, también llamado “seed and soil”. En esta, Paget sugería que las células tumorales (semilla; “seed”) crecían preferentemente en un microambiente selectivo (suelo; “soil”). Esto se formuló en base a cómo las células tumorales establecían las metástasis. Cuando las células de un tumor abandonan su nicho y pasan al torrente circulatorio pueden llegar potencialmente a cualquier órgano y establecer metástasis, sin embargo, las metástasis ocurren preferentemente en determinados tejidos u órganos donde el microambiente es más favorable para el desarrollo del tumor o, en el ejemplo de Paget, donde el suelo es más fértil para que la semilla germine. En cuanto al MM podemos aplicar también esta teoría ya que como hemos comentado previamente, para que surja la enfermedad se tienen que producir una serie de cambios genéticos que dan lugar a la célula plasmática maligna, pero también se tiene que dar simultáneamente que dicha célula se encuentre en un microambiente que facilite su supervivencia (13). Por tanto, el MM se caracteriza por una interacción compleja y bidireccional entre las células tumorales y el microambiente, que desempeña un papel muy importante tanto en la patogenia, como en la progresión, proliferación, diseminación y resistencia a los tratamientos (14).

El nicho hematopoyético es un microambiente específico de la médula ósea (MO) que está compuesto por un elementos celulares y no celulares. Dentro de los elementos celulares distinguimos células hematopoyéticas; células mieloides, linfocitos T, linfocitos B, células natural killer y osteoclastos, así como células no hematopoyéticas como células madre mesenquimales, fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales. Por otra parte, dentro de los elementos no celulares del nicho hay que mencionar la matriz extracelular, citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas y vesículas extracelulares (15). Además, el nicho está muy vascularizado por diferentes tipos de arteriolas, capilares y sinusoides

(3). Las células del MM que llegan a la médula ósea tendrán que interactuar con los elementos celulares y no celulares de ese microambiente, bien a través de contacto directo con dichos elementos o comunicándose a través de moléculas solubles. Estas interacciones son las que van a condicionar que el tumor progrese. En las siguientes secciones nos referiremos específicamente a estas interacciones.

## **5.1 Interacción de las células del Mieloma Múltiple con las Células Madre Mesenquimales.**

### *5.1.1 Definición Células Madre Mesenquimales.*

Las células madre mesenquimales (CMMs) fueron descritas por primera vez por Friedenstein et al. en 1968 como células de la médula ósea con apariencia similar a los fibroblastos y capaces de diferenciarse en osteocitos, condrocitos, adipocitos, tenocitos y miocitos, entre otros tipos celulares (16).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular ha sugerido una serie de criterios básicos mínimos para definir las CMMs:

- a) Adherencia al plástico bajo condiciones estándar de cultivo.
- b) Expresión de marcadores de superficie como CD105, CD90, CD73 ( $\geq 95\%$ ) y ausencia de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79- $\alpha$ /CD-19 y HLA-DR ( $\leq 2\%$ ))
- c) Capacidad de diferenciación *in-vitro* hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos (17).

Las CMMs se encuentran en una proporción muy pequeña a nivel de la MO (0,01%-0,001% de todas las células mononucleares), pero a pesar de su escasa presencia en esta localización cumplen importantes funciones. En condiciones fisiológicas, participan en el mantenimiento y diferenciación de las líneas hematopoyéticas, regulan la homeostasis mineral ósea y delimitan los nichos celulares (18). Una parte importante de la actividad de las CMMs se debe a su actividad paracrina, ya que estas células secretan multitud de moléculas y vesículas extracelulares que va a ejercer su acción sobre el resto de las células presentes en el microambiente de la MO.

Las células del MM, una vez han colonizado a la médula ósea, van a interactuar con las CMMs tanto de forma directa, mediante moléculas de adhesión, como de forma indirecta a través de citocinas y otras moléculas. Existen evidencias sustanciales de que esta interacción va a inducir cambios importantes en el comportamiento de las CMMs y en la composición de su perfil secretor de forma que, tras esa interacción, estas CMMs van a favorecer, con su acción paracrina, la supervivencia y proliferación de las células del MM.

### 5.1.2 Interacción MM/CMMs a través de moléculas de adhesión y moléculas solubles.

Las células del MM interactúan de manera directa mediante moléculas de adhesión (CAMs o Cell Adhesion Molecules) con las CMMs. Entre estas CAMs se encuentra VLA-4 (Very Late Antigen 4;  $\alpha 4\beta 1$ ) presente en las células del MM que se unirá a VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule) presente en la superficie celular de las CMMs. En referencia a VLA-4 se conoce que su expresión aumenta al avanzar la evolución de la neoplasia. Otras dos moléculas implicadas en la comunicación directa con las CMMs son LFA-1 (Leukocyte Function associated Antigen 1) y MUC-1 (Mucin 1, cell Surface-associated) presentes en las células del MM y que se unen a ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) localizada en la superficie de las CMMs. Asimismo, hay que mencionar a AXIIR (Annexin II Receptor) expresado por las células del MM, que se une a AXII (Annexin II) presente en las CMMs, esta última CAM además de favorecer la adhesión al estroma, favorece el crecimiento celular (19–21). Como se explicará más adelante, estas interacciones a través de CAMs, van a activar determinadas rutas de señalización implicadas en procesos como la proliferación celular o la inhibición de la apoptosis.

Existen una gran cantidad de factores solubles, tales como citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento y diferenciación que interactúan de forma recíproca con las células del MM y las CMMs. Entre ellas podemos destacar la Interleucina 6 (IL-6), el TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$  o Factor de Crecimiento Transformador  $\beta$ ), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor o Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), SDF1 $\alpha$  (stromal-cell derived factor-1, también llamado CXCL12), IGF1 (Insulin-like growth Factor o Factor de crecimiento insulínico tipo 1 $\alpha$ ), TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor o Factor de necrosis tumoral), BAFF (B-cell activating factor), APRIL (a proliferation-inducing ligand) y HGF (hepatocyte growth factor). Al igual que ocurre con el contacto directo entre las células del MM y las CMMs a través de CAMs, estas citocinas activan diferentes vías de señalización en las células del MM, tales como las cascadas de señalización PI3K/akt/mTOR/p70S6K, IKK- $\alpha$ /NF- $\kappa$  $\beta$ , MAPK y JAT/STAT3 (**Figura 3**). Dichas cascadas de señalización a su vez van a activar la producción de otras citocinas, proteínas anti-apoptóticas y moduladores del ciclo celular que van a favorecer el crecimiento, la supervivencia, la resistencia a los tratamientos y la diseminación de las células del MM, así como la osteoclastogénesis y la angiogénesis (22).

Una vez en la MO, las células del MM no solo van a interactuar con las CMMs, sino que también a través de CAMs, estas células se adherirán a proteínas de la matriz extracelular. Como ejemplo, la proteína VLA-4 que es expresada por las células del MM y se adhiere a las CMMs a través de VCAM1 se unirá también a la matriz extracelular a través de una fibronectina (FN). Esta última unión va a inducir la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$  $\beta$  en las células del MM que promueve resistencia a los tratamientos y su supervivencia (23).

Otras CAMs importantes en MM son LFA1 y MUC-1 que se unen a ICAM-1 localizado en las CMMs y se asocian a progresión de la enfermedad y a un mal

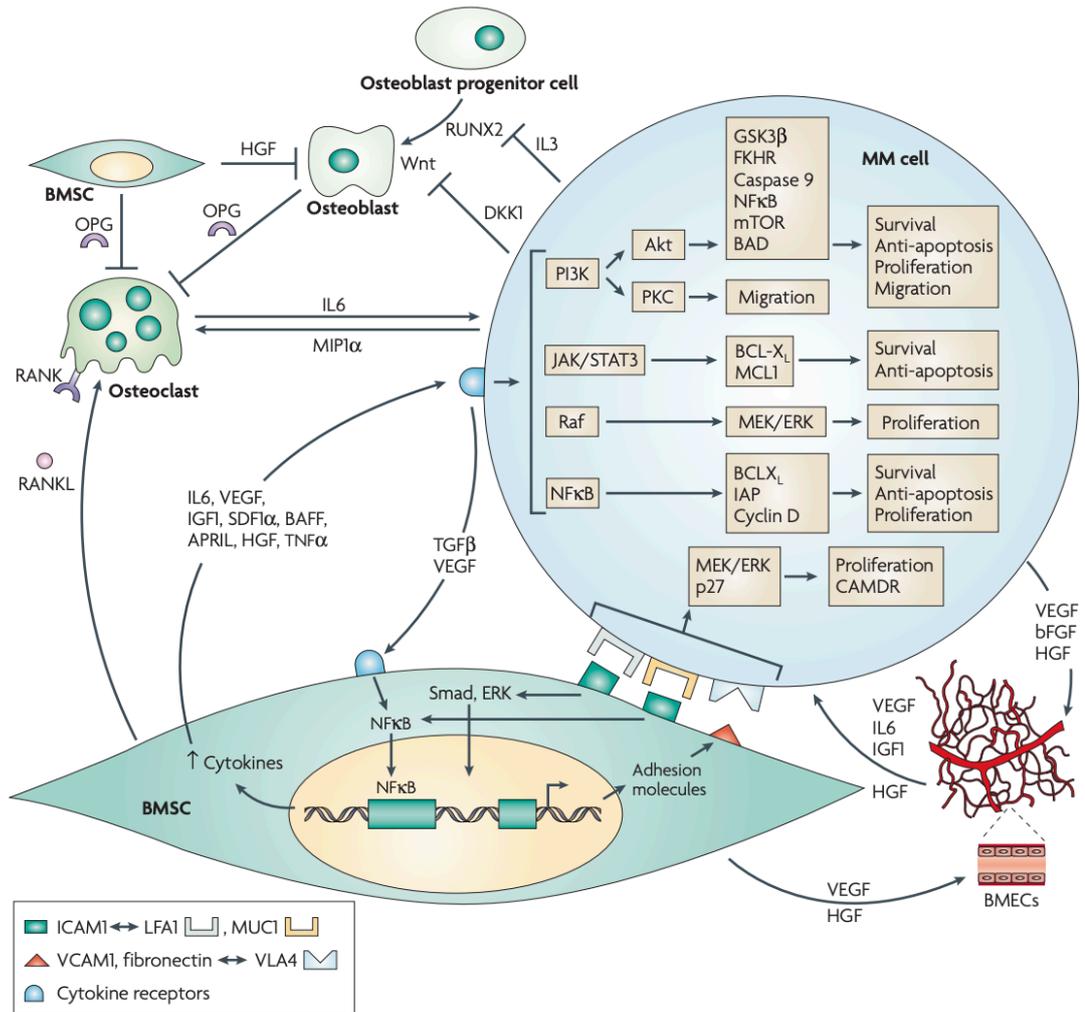
pronóstico (24–26). Por otra parte, syndecan 1 es un proteoglicano de heparán sulfato que se une al colágeno tipo 1 de la matriz extracelular, activando la expresión de la metaloproteinasa de la matriz 1 (Matrix Metalloprotease 1 o MMP1), que va a promover la invasión tumoral, la resorción ósea y la angiogénesis (27).

La adhesión de las células del MM a las CMMs va a activar diferentes vías de señalización también en las CMMs, como ya se ha adelantado para el caso de la vía NF- $\kappa$ B, y a desencadenar la secreción de diferentes citocinas, como la IL-6. Esta interleucina es la más importante e imprescindible para la patogénesis y progresión del MM, ya que estimula el crecimiento celular, la supervivencia, la diseminación y la resistencia a los tratamientos. La IL-6 se une a su receptor IL-6R que se encuentra en las células del MM y activa las vías de señalización MEK/MAPK, JAK/STAT y P13K/Akt (28,29). A su vez, las células del MM también van a secretar otras citocinas como TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , VEGF que también estimulan la secreción de la IL-6 en las CMMs (30–32). Dentro de la familia TNF a su vez cabe mencionar que se encuentran BAFF y APRIL, los cuales estimulan la proliferación tumoral y su supervivencia actuando sobre todo mediante la vía NF- $\kappa$ B que acabamos de mencionar (33).

Asimismo, el contacto MM/CMMs también va a activar en las CMMs la secreción de numerosas citocinas que van a favorecer la angiogénesis, lo cual indirectamente promoverá el crecimiento de las células del MM al favorecer la llegada de oxígeno y nutrientes dichas células y la eliminación de productos de desecho. Las citocinas involucradas en el proceso de angiogénesis son VEGF, una de las más importantes en el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos en la médula ósea, bFGF (basic Fibroblast Growth factor), MMPs (metaloproteasas), IL6, IGF1, TGF $\beta$ , HGF, etc. (34,35). Algunas de estas citocinas tienen otras funciones además de la promoción de la angiogénesis. Por ejemplo, IGF1 tiene un papel importante a nivel de la proliferación, migración e invasión de las células del mieloma, o lo que es lo mismo, del crecimiento tumoral y las metástasis mediante la vía de señalización PI3K/Akt (36). Por otro lado, HGF, también con acción pro-angiogénica, es una citocina que está también implicada a nivel óseo promoviendo la formación de los osteoclastos y aumentando el nivel de resorción ósea, y en el crecimiento tumoral (37).

Es importante señalar que la colonización exitosa de la médula ósea por las células del MM requiere el anidamiento (también llamado “*homing*”) de dichas células en ese nicho. La principal quimiocina que va a mediar este proceso de *homing* va a ser SDF1 $\alpha$ , producida por las CMMs, que se une al receptor CXCR4 de las células del MM y va a causar la migración de dichas células hacia el estroma de la médula ósea (38). Además de esta función, SDF1 $\alpha$  interviene también en la adhesión, invasión, y la producción de la IL-6 por las CMMs mediante la activación de la vía de señalización P13K/AKT (39).

Por lo tanto, las moléculas de adhesión y factores solubles que intervienen en la comunicación entre las CMMs y las células del MM son variadas y desempeñan diversas funciones en ambas células lo que se traduce en un complejo nodo de señales que se traducen en la formación de un microambiente propicio para el crecimiento de las células del MM.



**Figura 3. Interacción de las células del mieloma múltiple con el microambiente de la médula ósea.** La adhesión de las células del mieloma múltiple a las células madre mesenquimales da lugar a citocinas que median el crecimiento tumoral, supervivencia, resistencia a los tratamientos y diseminación. Tomado de: *Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets* por Hidheshima T et al, 2007. *Nature Reviews Cancer*, vol 7.

### 5.1.3 Interacción MM/CMMs a través de Vesículas Extracelulares.

Existen evidencias también de que hay vesículas extracelulares (VEs) que funcionan como mediadores en la comunicación entre células del MM y las CMMs, transfiriendo entre estas células diferentes moléculas como lípidos, proteínas, factores de transcripción, mRNAs, microRNAs, etc. Estas VEs se dividen tradicionalmente en tres subgrupos en función de su tamaño y su mecanismo de liberación desde la célula hacia la matriz extracelular. El grupo más importante de estas VEs debido a su relevante papel en la comunicación celular son los exosomas. Estos corresponden a vesículas de pequeño tamaño (30-150nm de diámetro) que se originan a partir de un proceso de endocitosis de la membrana celular durante la maduración de los cuerpos multivesiculares y que posteriormente se secretan al medio por un proceso de exocitosis después

de la activación celular. Por otra parte, las microvesículas, son VEs de mayor tamaño (50-1000 nm de diámetro) y se forman a partir de invaginaciones de la membrana plasmática. Por último, los cuerpos apoptóticos, el tercer grupo de Ves que podemos encontrar formando parte del secretoma de las células, son fragmentos celulares que miden entre 500nm-2 $\mu$ m y que se liberan de forma tardía en el proceso de apoptosis (40,41). Múltiples trabajos han puesto de manifiesto la importancia de estas VEs en los procesos de comunicación celular, ya que las VEs y más concretamente las moléculas que transportan, están involucradas en varios procesos dentro del desarrollo del MM, tales como el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la metástasis, la formación de lesiones óseas, la inmunosupresión y resistencia a los fármacos.

## **5.2 Alteraciones de las células madre mesenquimales en Mieloma Múltiple.**

Se ha comprobado que existen importantes diferencias entre las CMMs de pacientes con MM (MM-CMMs) y las CMMs de donantes sanos (DS-CMMs). En las siguientes secciones abarcaremos este tema además de estudiar cómo y porqué se lleva a cabo la evolución de las CMMs hacia otro estado que va a facilitar la progresión de la enfermedad.

Las MM-CMMs parecen ser genética y funcionalmente diferentes en comparación a las DS-CMMs (42). En primer lugar, las MM-CMMs tienen una capacidad proliferativa menor que las DS-CMMs, esto está asociado a una menor expresión de una serie de receptores celulares dentro de los que se encuentran el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor o PDGF), el receptor de IGF-1, del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor o EGF) y el receptor de bFGF (43). Por otra parte, las MM-CMMs tienen una elevada producción de diversas citocinas en comparación con los DS-CMMs. Dentro estas citocinas se incluyen la IL-6, Dickkopf-1 (DKK1), IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 beta), IL-3 (interleucina 3), IL-10 (interleucina 10), OPN (osteopontina), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF o Granulocyte Colony Stimulating Factor), Factor de Células Madre (SCF o Stem Cell Factor), TNF- $\alpha$ , HGF y BAFF. La característica más destacable en lo que se refiere a las diferencias entre las MM-CMMs y las DS-CMMs es la elevación anormal en las MM-CMMs, tanto de los niveles de mRNA como de los niveles proteicos de la IL-6, que resulta ser la citocina más importante para el crecimiento y desarrollo de esta enfermedad (43–47).

Otro rasgo característico de las MM-CMMs es que tienen una mayor expresión de marcadores de senescencia, tales como la  $\beta$ -galactosidasa asociada a este proceso (Senescence Associated - $\beta$ -galactosidasa). El proceso de senescencia está asociado con un aumento del tamaño celular, una disminución de la capacidad proliferativa y un perfil secretor caracterizado por un aumento de la expresión de HGF, IGF-2, IL-6, IL-8 (interleucina 8), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, CCL2), MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ), DKK1 and VEGF. Asimismo, se ha demostrado que en las MM-CMMs existe un aumento del mRNA y proteínas implicadas en la angiogénesis (bFGF, HGF y VEGF) (48). Cabe destacar también que las MM-CMM tienen un potencial osteogénico menor, que se refleja en una disminución de la

mineralización de la matriz y de la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina en análisis *in vitro*, además de la disminución de factores de transcripción involucrados en la osteogénesis y aumento de aquellos que inhiben la osteogénesis (44,49–51).

Las diferencias entre las MM-CMMs y las DS-CMMs no se circunscriben a la expresión de RNAs mensajeros (mRNAs). También se han encontrado diferencias significativas a nivel de la expresión de microRNAs (miRNA). Los miRNAs son pequeños RNAs de aproximadamente 22 nucleótidos que no codifican para proteína pero que tienen importantes funciones reguladoras dentro de las células. Los miRNAs se encargan de regular la expresión génica de forma postranscripcional uniéndose a la región 3'UTR del mRNA dando lugar a la degradación de dicho mRNA o a la inhibición de su traducción (52). Existen múltiples miRNAs que actúan sobre la expresión de diferentes factores de transcripción y vías implicadas en osteogénesis. Entre estos distinguimos un aumento de miR-129 en las MM-CMMs, el cual va a tener su diana en marcadores de diferenciación de los osteoblastos, inhibiéndolos, por tanto actúa fomentando el daño óseo. También se ve un aumento de miR-135b en las MM-CMMs, que regula de forma negativa la osteogénesis. Por otra parte, la disminución de otro miRNA, el miR-223 en CMMs produce un aumento de la expresión de VEGF y IL-6 por parte de las MM-CMMs y una disminución en su potencial osteogénico (53–55).

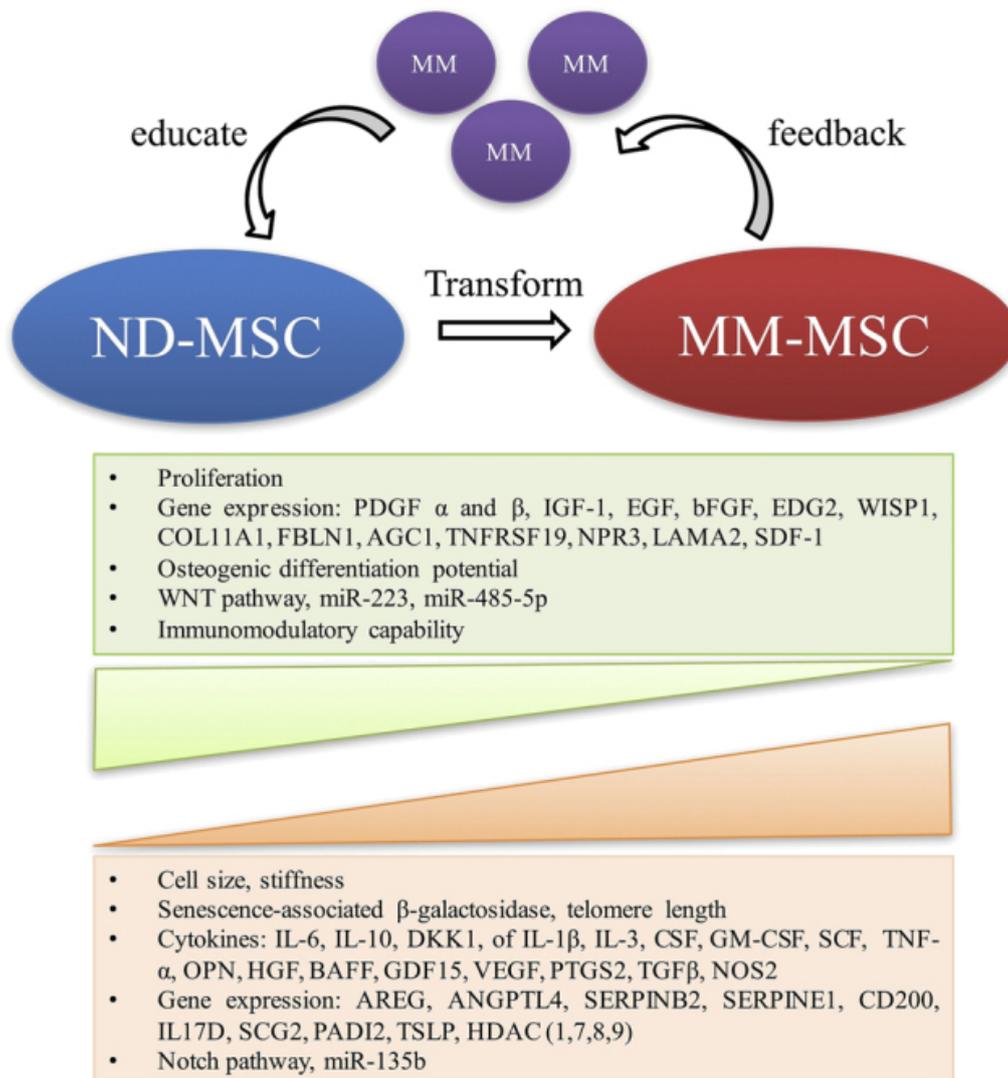
Finalmente hay que destacar que existe también un cambio de expresión de los genes involucrados en el ciclo celular, reparación del DNA, adhesión celular y metabolismo en las MM-CMMs respecto a las DS-CMMs. Se ha observado que la disminución de la proliferación de las MM-CMMs no es por un aumento de la apoptosis, sino por una acumulación de las células en la fase S debido a una disminución de activadores de la fase S como CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), ciclina E y CDC25A (cell division cycle 25 homolog A). Además de lo anterior, se ha observado también una sobreexpresión de inhibidores de la fase S como p53 y p21 en las MM-CMMs. Por otra parte, varios genes involucrados en reparación del DNA se vieron también alterados, entre ellos destacamos, TOP21, BRCA1, RAD51, etc. (49).

#### *5.2.1 Evolución de las células madre mesenquimales de individuos sanos a MM: causa o consecuencia.*

Se cree que hay diversos mecanismos involucrados en la evolución de las DS-CMMs hacia un fenotipo propio de MM-CMMs (**Figura 4**). Hay algunos estudios que sugieren que las MM-CMMs tienen alteraciones propias y que permanecen aun cuando estas se separan de las células del MM, mientras que otros sugieren que las diferencias de las MM-CMMs provienen de la influencia directa de las células del MM que alteran de forma temporal la expresión genética de las CMMs (56).

Se ha demostrado que el cultivo de DS-CMMs junto con células del MM puede dar lugar *in vitro* a CMMs con un fenotipo similar a las MM-CMMs (57). Como ya se ha indicado, esto se logra mediante el contacto de estas CMMs con las células del MM a través de moléculas de adhesión o mediante la secreción de diferentes citocinas y VEs que inician este proceso dando lugar a cambios en

el nivel de expresión génica y también cambios a nivel del epigenoma, que en su conjunto consiguen alterar el fenotipo de las CMMs (58). Sin embargo, muchos de los cambios observados en las MM-CMMs no pueden atribuirse únicamente a esta influencia de las células del MM. Existen estudios que demuestran que hay alteraciones inherentes de las propias CMMs, por ejemplo, se ha observado que persisten diferencias entre las MM-CMMs y las DS-CMMs aun cuando hay cese de interacciones entre las CMMs y las células del MM durante un tiempo prolongado, además, también existen pacientes con fracturas patológicas que incluso una vez son libres de tumor estas no curan por alteración de la osteoblastogénesis, dejando a entender que existen alteraciones propias de las CMMs . Actualmente el origen de las MM-CMMs sigue sin estar claro, siendo posiblemente la interacción entre múltiples factores (56,58).



**Figura 4. Alteración de las CMM en el microambiente del MM.** Las DS-CMM son educadas por las células del MM para transformarse en MM-CMM, que a su vez están involucradas en el desarrollo del MM. Además, es probable que existan de forma intrínseca ciertas anomalías en las CMM que no son inducidas por el MM. Tomado de: *Mesenchymal stem cells in multiple mieloma: a therapeutic tool or target?* Por Song Xu et al, 2018. *Leukimia*.

## **6 PAPEL DE LAS CMMs EN LA PROGRESIÓN DEL MIELOMA MÚLTIPLE.**

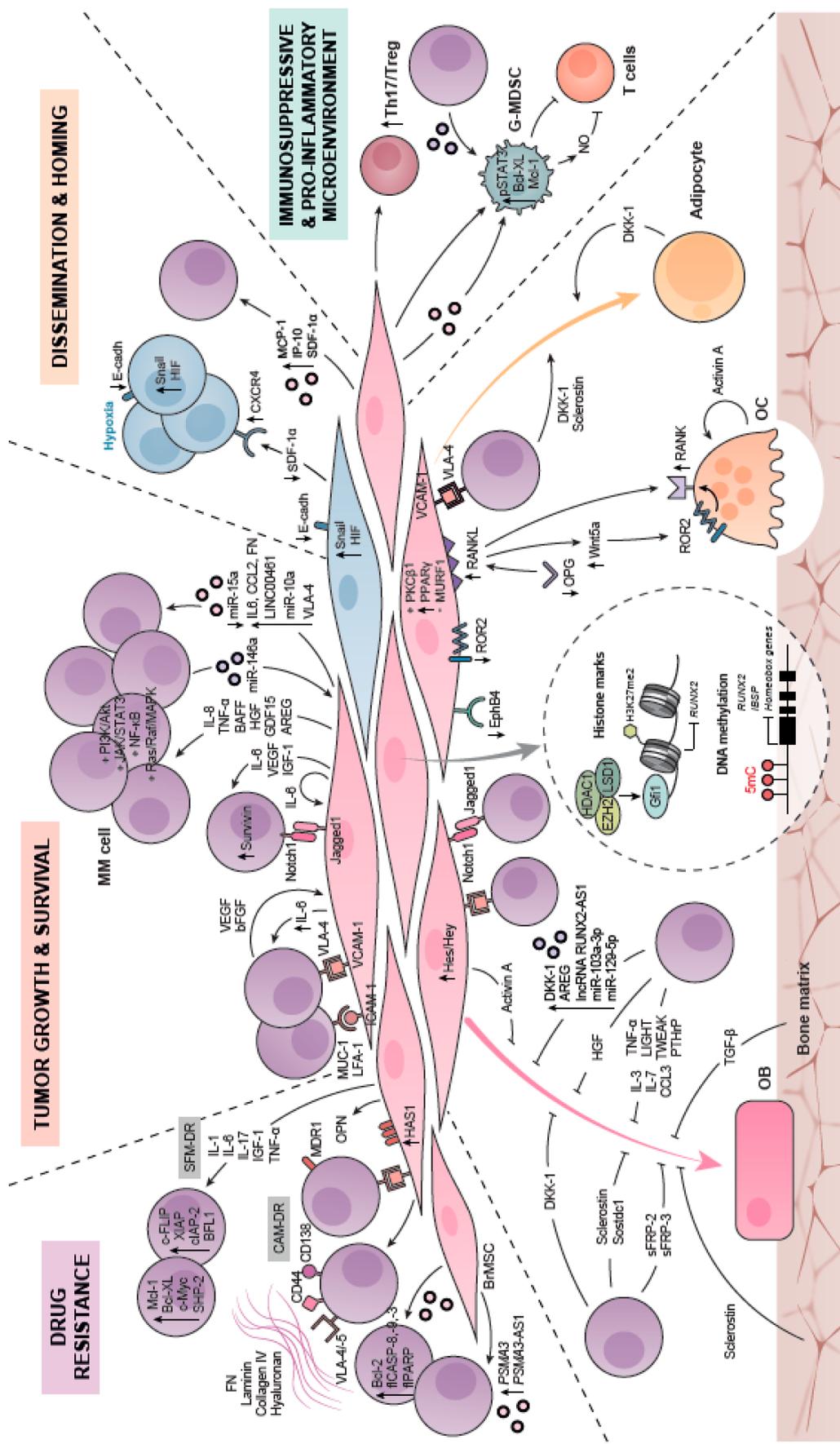
### **6.1 Papel de las CMMs en la proliferación de las células del MM.**

Las CMMs y el microambiente de la MO van a tener un papel esencial a nivel de la proliferación, diseminación, afectación ósea y resistencia a los tratamientos de las células del MM (**Figura 5**).

Como ya se ha comentado, las células del MM se van a unir a diferentes proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, la fibronectina y ácido hialurónico, a través de varias moléculas de adhesión y la interacción entre estos dos tipos celulares a través de estas moléculas de adhesión va a dar lugar a la activación de múltiples vías de señalización que van a favorecer la proliferación de las células del MM a través de la activación del ciclo celular, la producción de proteínas antiapoptóticas y la inhibición de señales proapoptóticas (59,60). Además de a través del contacto célula-célula, diversos factores solubles van a implicarse también en la activación de determinadas rutas metabólicas relacionadas con la proliferación celular. De hecho, estas moléculas solubles se producen en ocasiones, gracias a la interacción directa anteriormente mencionada. Por ejemplo, ya se ha mencionado que la unión de VLA-4 presente en la superficie de las células del MM a VCMA1 en la superficie de las CMMs induce la activación de la vía NF- $\kappa$ B en las células del MM estimulando la secreción de la IL-6 en las mismas (23,61). Esta IL-6 estimulará a las propias células del MM de forma autocrina (62). Hay que aclarar que la IL-6 es el factor de crecimiento más importante de las células del MM, es producida por multitud de células, incluidas las células del MM, pero su mayor producción está a cargo de las CMMs y de forma paracrina va a activar el crecimiento celular de las células del MM. La IL-6 activa la vía de señalización JAK2/STAT3 que favorece el crecimiento celular y mantiene la supervivencia regulando factores antiapoptóticos.

Por otro lado, la unión de BAFF y APRIL, producidas por las CMMs, a sus receptores BAFFR y TACI/BCMA en la superficie de las células del MM facilita la adhesión celular entre ambos tipos de células y la supervivencia de las células del MM también a través de la activación de la vía NF- $\kappa$ B favoreciendo la producción de los factores antiapoptóticos Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1) y Bcl-2 (B cell Lymphoma 2) (63).

Por su parte, la ruta PI3K/AKT es activada por numerosas citocinas. De entre ellas, las que más estimulan su activación y función como crecimiento celular y supervivencia son la IL-6 y IGF1. La ruta MAPKs (ERK1/2) en las células del MM se encuentra activada de forma constitutiva pero además se favorece su activación mediante citocinas como IL-6, VEGF, BAFF y CXCL12 contribuyendo al crecimiento celular además de otras funciones que iremos comentando posteriormente (60,62).

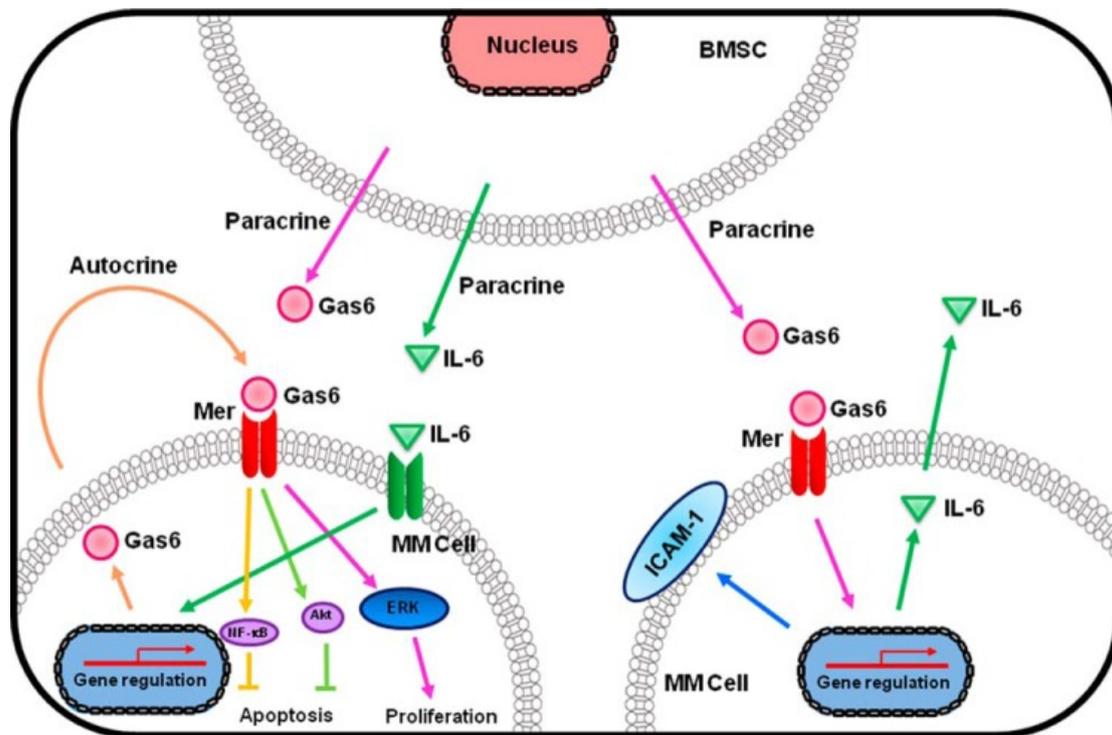


**INHIBITION OF OSTEOBLAST DIFFERENTIATION & FAVOURED ADIPOGENESIS**

**Figura 5. Papel de las CMM en el microambiente del Mieloma Múltiple.** Las CMM y las células del mieloma múltiple intercambian información a través de moléculas de adhesión, factores solubles, exosomas, etc. que contribuyen a la patología de la enfermedad. Las interacciones de las CMM con las células del MM intervienen en el crecimiento celular, diseminación y homing, la afectación ósea y la resistencia a los tratamientos. Tomado de: Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Multiple Myeloma: Their Role as Active Contributors to Myeloma Progression. Por Patricia Maiso et al, 2021. Cancers.

Las adhesiones celulares van a mediar también la activación de la vía de señalización Notch que está involucrada en la proliferación celular por la expresión de genes antiapoptóticos como survivina y Bcl-2 (64). Además, las células del MM van a secretar DKK1 que al unirse a las CMMs va a inhibir su diferenciación hacia los osteoblastos. Al bloquear la diferenciación de las CMMs mediante DKK1, estas CMMs indiferenciadas van a seguir produciendo IL-6 que a su vez actúa sobre las propias CMMs estimulando la secreción de DKK1 y por lo tanto estableciéndose un círculo vicioso que se traduce en una disminución de la formación de hueso (65). Toda esta señalización paracrina mantiene el crecimiento celular de las células del MM.

Otro factor importante a nivel del crecimiento tumoral es Gas6 (growth arrest-specific gene 6). Este factor es secretado por las CMMs y actúa sobre las células del MM pero también va a ser secretado por las propias células del MM ejerciendo una acción autocrina (**Figura 6**). Su función se va a dar simultáneamente con las múltiples acciones de la IL-6. Ambas moléculas al unirse a sus receptores (el receptor de Gas6 es Mer, un receptor tirosin quinasa), van a favorecer la proliferación tumoral e inhibir la apoptosis mediante la fosforilación de las vías de señalización ERK, Akt y NFκB en las células del MM. Por otra parte, la acción paracrina de Gas6 al unirse a Mer va a estimular la adhesión celular de las células del MM a las CMMs incrementando la síntesis de ICAM-1 y de la IL-6, que va a favorecer la progresión de la enfermedad (66).



**Figura 6. Mecanismos autocrinos y paracrinos de la acción de Gas6.** Tomado de: *Autocrine and Paracrine Interactions between Multiple Myeloma Cells and Bone Marrow Stromal Cells by Growth Arrest-specific Gene 6 Cross-talk with Interleukin-6*. Por Miki Furukawa et al, 2017. *The journal of biological chemistry* vol. 292.

Por lo tanto, aunque hay múltiples moléculas solubles que ejercen acciones importantes para favorecer la progresión de la enfermedad, existen dos actores principales, Gas6 e IL-6, que al unirse a sus receptores en las células del MM va a dar lugar a la activación de las vías de señalización que favorecen la proliferación celular e inhiben la apoptosis de las células del MM.

Como ya se ha comentado anteriormente, el secretoma de las CMMs tiene un componente soluble y un componente vesicular. No solamente las moléculas solubles secretadas por las CMMs ejercen su acción sobre las células del MM, sino que la fracción vesicular, concretamente los exosomas, también influye en la progresión de la enfermedad. De hecho, se ha observado que existe un contenido diferente de miRNA, proteínas oncogénicas y citocinas en los exosomas de las MM-CMMs frente a los exosomas producidos por las células sanas (67). En los exosomas producidos por las MM-CMMs está sobre-expresado el RNA no codificante LINC00461 que se une a miR15a/miR16 disminuyendo su expresión y por tanto su efecto represor de la transcripción del factor antiapoptótico Bcl-2, por lo que el aumento de la expresión de LINC00461 actuaría, de forma indirecta, favoreciendo la proliferación de las células del MM (67,68). En los exosomas producidos por las MM-CMMs existe también una sobreexpresión de miR-10a que tiene un efecto negativo a nivel de las propias MM-CMM, pero a nivel de las células del MM actúa favoreciendo su proliferación como un posible “onco-miR” (69).

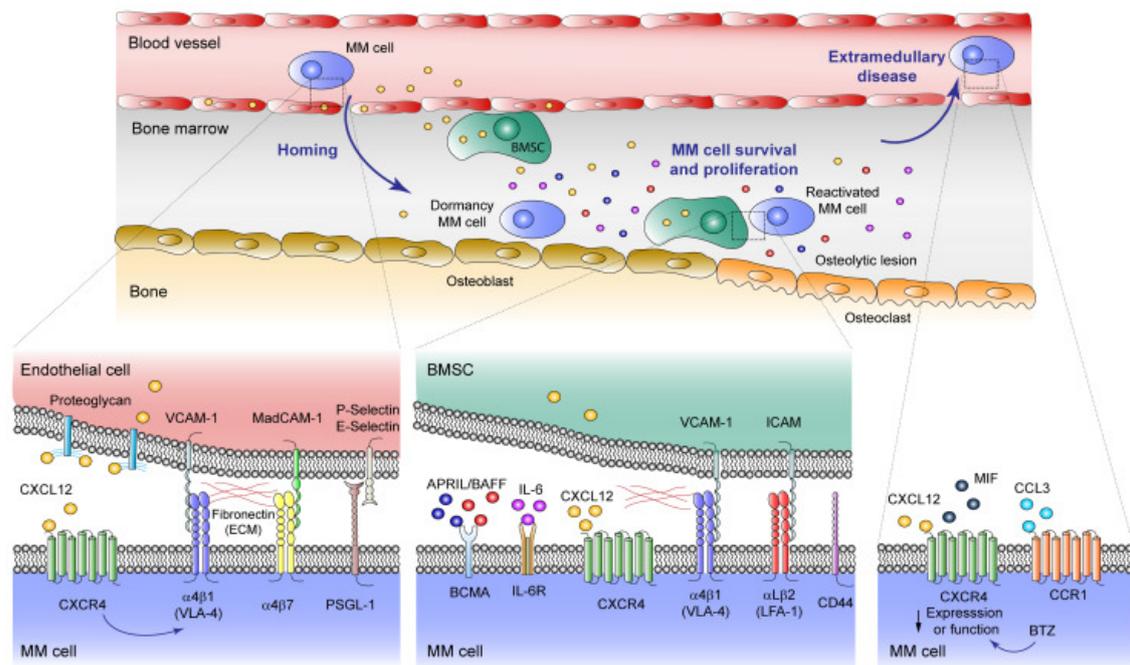
Por otra parte, las células del MM también producen exosomas con un cargamento que va a favorecer de forma indirecta su proliferación. En los exosomas producidos por estas células van a estar sobre-representados miRNAs como el miR-146a, que al ser transferido a las CMMs favorece la secreción de citocinas como IL-6, IL-8, MCP-1, etc. que promueven a su vez la proliferación a nivel de las células del MM (70).

## **6.2 Papel de las CMMs en la diseminación y *homing* de las células del MM.**

La progresión del MM requiere la salida de las células del MM a la sangre periférica y su *homing* en la MO, para invadir nuevas regiones de esta (**Figura 7**) (58).

Como ya se mencionó en la sección 5.1.3., el factor regulador del tráfico celular de las células del MM más importante a nivel del *homing* en la MO es SDF1 $\alpha$ . SDF1 $\alpha$  es producido por las CMMs y se une al CXCR4 de las células del MM (14). Esto es de especial importancia en las fases iniciales de la enfermedad en las cuales tiene lugar la colonización de la MO. En fases más tardías, para que se produzca la diseminación de la enfermedad, tiene que darse de nuevo una movilización de las células del MM a la sangre periférica. Para ello tiene que producirse una disrupción en la unión entre las células del MM y las CMMs y también entre las células del MM y la matriz extracelular. La unión SDF1 $\alpha$  y CXCR4 puede romperse por una reducción endógena o inactivación por proteasas del SDF1 $\alpha$ . Las uniones con la matriz extracelular están asociadas a una degradación de dichas uniones por las MMPs, principalmente las MT1-MMP o MMP14 (metaloproteinasa 14) y MMP9 (metaloproteinasa 9) (71,72).

En el proceso de *homing* el primer paso es la unión de las células del MM a las células endoteliales mediante selectinas. Una vez se produce esta unión en el vaso sanguíneo, tiene lugar la extravasación de las células del MM hacia la médula ósea. La extravasación está mediada por la interacción de integrinas como VLA-4 de la célula del MM a VCAM-1 de la célula endotelial, en esta unión además hay otras moléculas involucradas como LFA-1, VLA-5 (Very Late Antigen 5), activación de metaloproteasas que degradan la membrana basal para permitir el paso de las células del MM, etc. VLA-4 aparece en la superficie de las células del MM en respuesta a la unión de SDF1 $\alpha$  a su receptor CXCR4 en dichas células. Esto permite la salida de las células del MM del vaso sanguíneo hacia el microambiente de la MO (71).



**Figura 7. Tráfico celular de las células malignas del Mieloma Múltiple.** Las células del mieloma múltiple alcanzan el nicho de la MO a través de los sinusoides y ocasionalmente pueden salir a la circulación sanguínea y producir metástasis extramedular. Homing: se produce la interacción de CXCL2 con CXCR4 que atrae a las células a la MO. Tomado de: *The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression*. Por Almudena García-Ortiz et al, 2021. *Cancers*.

### 6.3 Papel de las CMMs en la afectación ósea.

El hueso está formado por varios tipos celulares entre los que destacan los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos que se encargan del remodelado óseo. Este remodelado implica la constante formación y resorción (destrucción) del hueso. Los pre-osteoclastos, que proceden de la célula madre hematopoyética y pertenecen a la estirpe mieloide (monocito-macrófago), se diferencian a su forma madura por la activación de RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B) al unirse su ligando RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B ligand) en la superficie del pre-osteoclasto. Esto da lugar

a la aparición de los osteoclastos, células multinucleares maduras con capacidad para llevar a cabo la resorción ósea. Los osteoblastos, por su parte, derivan de las CMMs y se encargan de la formación de la matriz ósea. Un tercer tipo de célula, los osteocitos, se forman a partir de los osteoblastos diferenciados que quedan inmersos en la matriz ósea durante su formación y son las células principales del tejido óseo (forman un 90-95% del tejido óseo del adulto) (73). Estos osteocitos secretan importantes moléculas que regulan la actividad de los otros dos tipos celulares.

Las lesiones óseas son una característica principal en el MM. Un 80-90% de los pacientes con MM van a tener una complicación de este tipo en algún estadio de su enfermedad. La clínica que pueden presentar es muy amplia ya que alberga desde osteopenia difusa hasta osteoporosis, lesiones líticas focales, fracturas patológicas, compresiones y fracturas vertebrales. Además, la presencia de fracturas patológicas se ha observado que está asociado a una disminución de la supervivencia de los pacientes (74). Estas lesiones osteolíticas se producen a consecuencia de una disrupción en la homeostasis ósea, dando lugar a un aumento de la resorción ósea respecto a su formación (22). En las siguientes secciones vamos a tratar cómo las células del MM modifican la actividad de las células del hueso afectando a la homeostasis ósea de forma que se rompa el equilibrio entre la destrucción y la formación de hueso.

### *6.3.1 Interacción de las células del MM con osteoclastos*

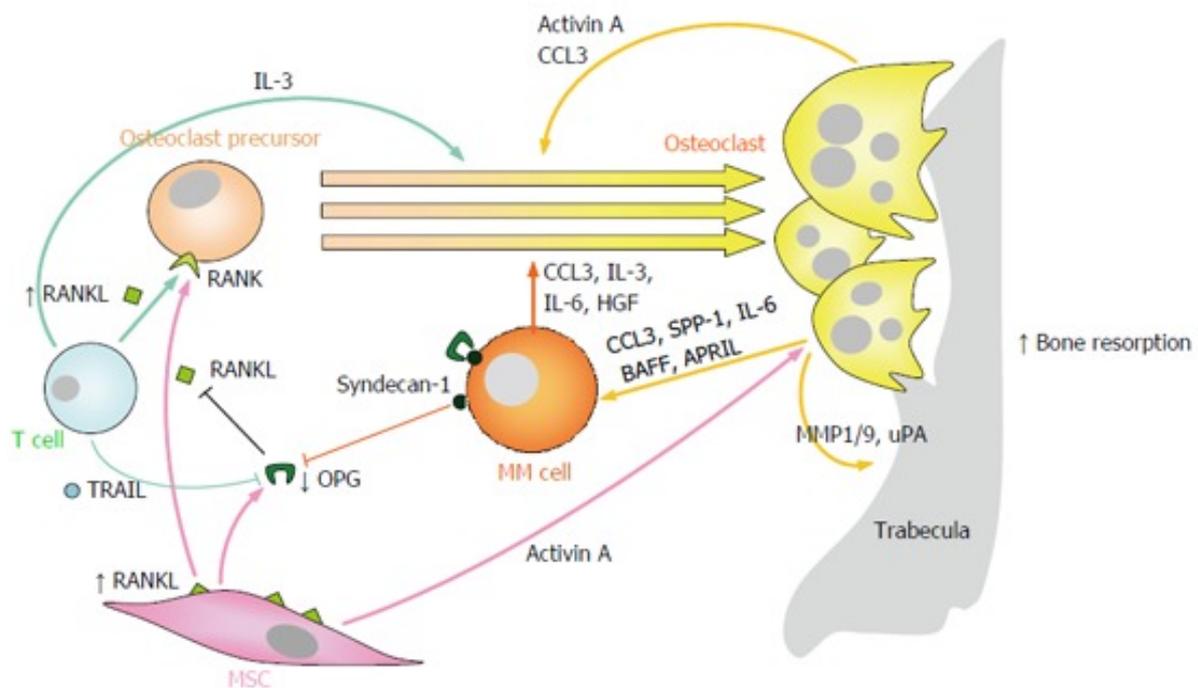
Las lesiones óseas en el MM se producen por la activación de los osteoclastos para dejar espacio al crecimiento tumoral de las células del MM. Existe una relación muy importante entre los osteoclastos, las células del MM y las CMMs ya que van a estimular su activación y función en la resorción ósea (**Figura 8**).

Los osteoblastos y las CMMs producen una proteína denominada Osteoprotegerina (OPG) que actúa como un antagonista de RANKL. La unión de la OPG al receptor RANK bloquea la unión de RANKL, que activa la diferenciación de estas células, por lo que la OPG reduce la resorción ósea. Debido a esto, el ratio entre las concentraciones de RANKL y OPG en suero es un factor pronóstico muy importante en el mieloma, ya que, como se ha explicado, está asociado con la medición de la actividad de los osteoclastos y la osteoclastogénesis, siendo así que cuando mayor es el ratio más se correlaciona con la afectación ósea y peor es el pronóstico de la enfermedad (75,76).

Las células del MM y los osteoblastos inmaduros aumentan la concentración de RANKL, y, por lo tanto, la resorción ósea, por dos vías diferentes. Por una parte, de forma directa, aumentando su producción y, por otra parte, disminuyendo la expresión de la OPG. La unión de las células del MM a las CMMs mediante la interacción VLA-4 / VCAM1 va a estimular la producción de interleucinas como IL-6, IL-11 (interleucina 11) y IL-1b a nivel de las células del MM que van a inducir la expresión de RANKL y a su vez disminuir la producción de OPG por parte de las CMMs y osteoblastos favoreciendo así la acción de los osteoclastos (77). Por otra parte, otros factores que actúan a este nivel son la activina A y la esclerostina. La primera pertenece a la superfamilia de la TFG- $\beta$  y actúa en numerosas vías de señalización favoreciendo la

diferenciación de los osteoclastos, entre ellas destacamos su acción estimulando directamente a RANK y activando la vía NF- $\kappa$ B. La esclerostina por su parte es una citocina producida por los osteocitos que induce la apoptosis de los osteoblastos y consecuentemente disminuye la osteogénesis, además de activar también la vía NF- $\kappa$ B y disminuir la producción de OPG (78,79).

Las células del MM también secretan MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , ambas son inductores de la formación de los osteoclastos por una vía independiente de RANKL. MIP-1 $\alpha$  se une a CCR1 (C-C Motif Chemokine Receptor 1) y CCR5 (C-C Motif Chemokine Receptor 5) y MIP-1 $\beta$  a CCR5 y CCR8 (C-C Motif Chemokine Receptor 8), estimulando la resorción ósea. Estos receptores se encuentran tanto a nivel de las CMMs como de las células del MM. En estudios *in vitro* mediante el uso de inhibidores frente a estos receptores, se ha observado una reducción de la actividad y del número de los osteoclastos. Este efecto se observó también *in vivo*, donde se vio una disminución de las lesiones óseas y de la carga tumoral (80).



**Figura 8. Aumento de la producción de los osteoclastos y su papel en la resorción ósea en la evolución del MM.** Existen múltiples factores activadores de los osteoclastos producidos por las células del mieloma múltiple y otras células en el microambiente de la médula ósea (entre ellos RANK-L, CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), activina A, IL-3, HGF y IL-6) que favorecen la diferenciación de los osteoclastos o su actividad. Tomado de: *Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics*. Por Antonio García-Gomez et al, 2014. *World Journal of Stem Cells*.

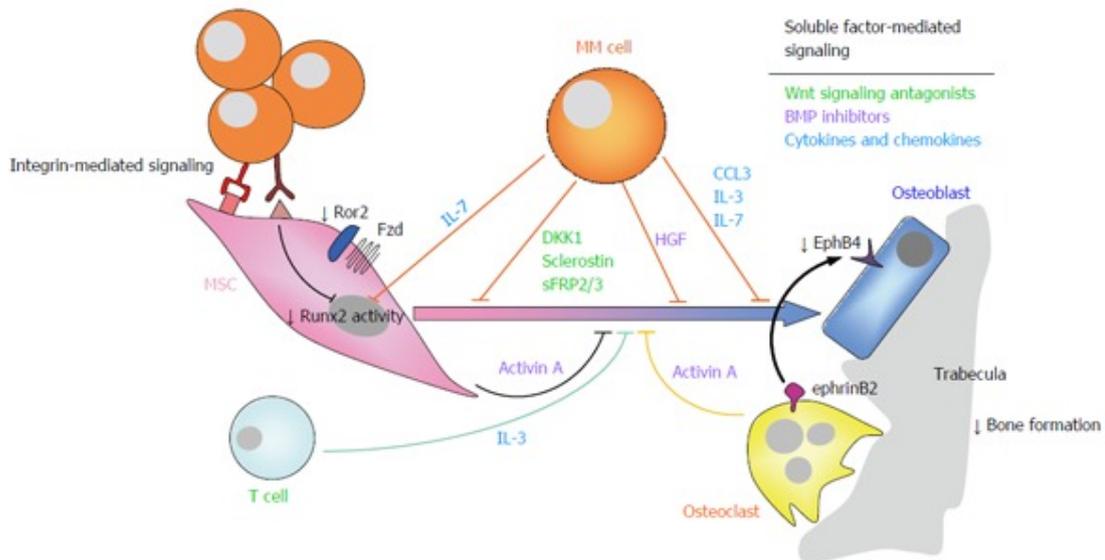
Además, los osteoclastos secretan IL-6 que estimulan a la proliferación tanto de las células del MM como de los propios osteoclastos. Otras citocinas involucradas son IL1 $\beta$ , VEGF y HGF (81,82). La secreción de RANKL, MIP-1 $\alpha$  y IL-11 se ve favorecido por la vía p38 MAPK de las CMMs que en el MM se encuentra activada (83). Las glicoproteínas de la matriz extracelular, la

osteopontina (OPN) y la IL-17 (interleucina 17) también están implicadas en este proceso (84,85).

La interacción entre los osteoclastos y las CMMs va a regular al alza la expresión de CHSY1, la cual modula la señalización de la vía Notch, involucrada en el crecimiento celular y resistencia a los fármacos del MM (86).

### 6.3.2 Interacción de las células del MM con los osteoblastos.

Las células del MM inhiben la diferenciación de las CMMs hacia osteoblastos y su proliferación, por lo tanto, afectan también a los osteocitos ya que estas células derivan directamente de los osteoblastos (**Figura 9**). Para que se pueda producir una correcta diferenciación desde las CMMs a osteoblastos son necesarias la integración de la ruta de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina y la ruta de las BMPs (Bone morphogenetic proteins).



**Figura 9. Supresión de la diferenciación de los osteoblastos y su función en la evolución del MM.** La supresión de la diferenciación de los osteoblastos está mediada por la interacción celular con las CMMs que da lugar a una reducción de la expresión de Runx2/Cbfa1 y a la inhibición de la vía no canónica Wnt5 por la disminución de la expresión de Ror2 en los preosteoblastos. Además, factores solubles producidos por las células del MM y células del microambiente de la MO como antagonistas de la vía Wnt (por ej. DKK1, esclerostina, sFRP2-3), inhibidores de la vía BMP (activina A, TGF $\beta$ , HGF), citocinas (por ej. IL-7, TNF $\alpha$ , IL-3) y factores apoptóticos contribuyen a la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos y su función. Tomado de: Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics. Por Antonio Garcia-Gomez et al, 2014. World Journal of Stem Cells.

Una vía importante a nivel de la osteoblastogénesis es la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, las moléculas que participan en la inhibición de esta vía son la esclerostina, que ya hemos mencionado previamente, DKK1, sFRP-2 (Secreted frizzled-related protein 2) y sFRP-3 (Secreted frizzled-related protein 3). Estas proteínas van a ser sobre-expresadas por las células del MM (87), inhibiendo por

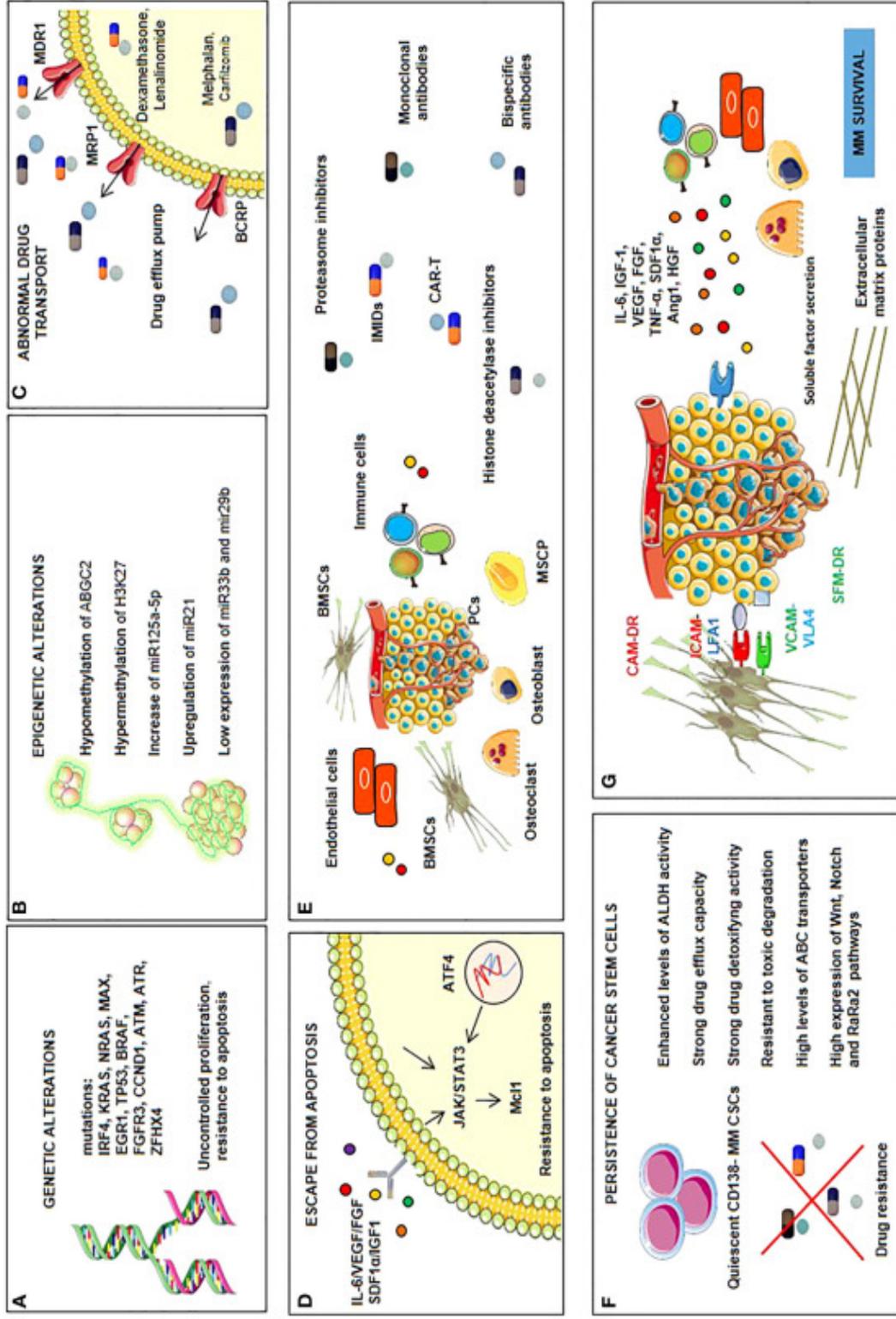
lo tanto dicha ruta osteogénica en los osteoblastos. Por otra parte, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina también regula la formación de los osteoclastos y su resorción modulando la expresión de OPG y RANKL a nivel de los osteoblastos, por lo tanto, al interrumpir esta vía a través de moléculas como esclerostina y DKK1, se observa una disminución de la secreción de OPG y un aumento de RANKL, viéndose efectos importantes a nivel de la osteólisis (79,88). La ruta de las BMPs tiene un papel clave en la osteogénesis. En esta vía, miembros de la superfamilia de citocinas TGF $\beta$  (BMPs, activina A y TGF $\beta$ ) se unen a receptores que activan a las proteínas Smad que regulan la expresión de genes que intervienen en la diferenciación de los osteoblastos a través de la formación de un complejo con Runx2/Cbfa1, que es el principal regulador de esta vía (89). La activina A, que es producida por los osteoclastos y las CMMs tras la interacción con las células del MM, regula de forma negativa la expresión del gen DLX5 (distal-less homeobox 5) que codifica para un factor de transcripción con un papel positivo en la osteoblastogénesis (90). TGF $\beta$  tiene una función similar, ya que también actúa regulando de forma negativa DLX5 e inhibiendo consecuentemente la diferenciación de los osteoblastos (91).

Otras de las citocinas que modulan la actividad de los osteoblastos es la IL-7 (Interleucina 7), también producida por las células del MM. La IL-7 disminuye la actividad de Runx2/Cbfa1 en células osteoprogenitoras, disminuyendo por lo tanto la expresión de genes osteoblásticos (87). TNF $\alpha$  inhibe también a Runx2/Cbfa1 y al factor de transcripción Osterix, que coopera con Runx2 activando genes implicados en la diferenciación osteoblástica (92). La IL-3 es producida sobre todo por los linfocitos T y las células del MM y al igual que los dos anteriores inhibe la diferenciación osteoblástica (93).

El ligando Wnt5a de la vía no canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina también participa en el proceso de osteogénesis a través de la activación del receptor transmembrana de tirosina-proteína quinasa Ror2 (Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2). La expresión de Ror2 aumenta de forma significativa durante la diferenciación de las CMMs a preosteoblastos. Las células del MM actúan inhibiendo la expresión de Ror2 al interactuar con los pre-osteoblastos mediante la inhibición de la vía no canónica Wnt5a inhibiendo de esta forma la diferenciación de las CMMs a osteoblastos (94). Como ya hemos comentado, las MM-CMM tienen una expresión de miRNA diferente a la de los DS-CMM, entre los miRNAs expresados de forma diferencial, distinguimos una sobreexpresión de miR-135b, que es un regulador negativo de la osteogénesis, en MM-CMS (54).

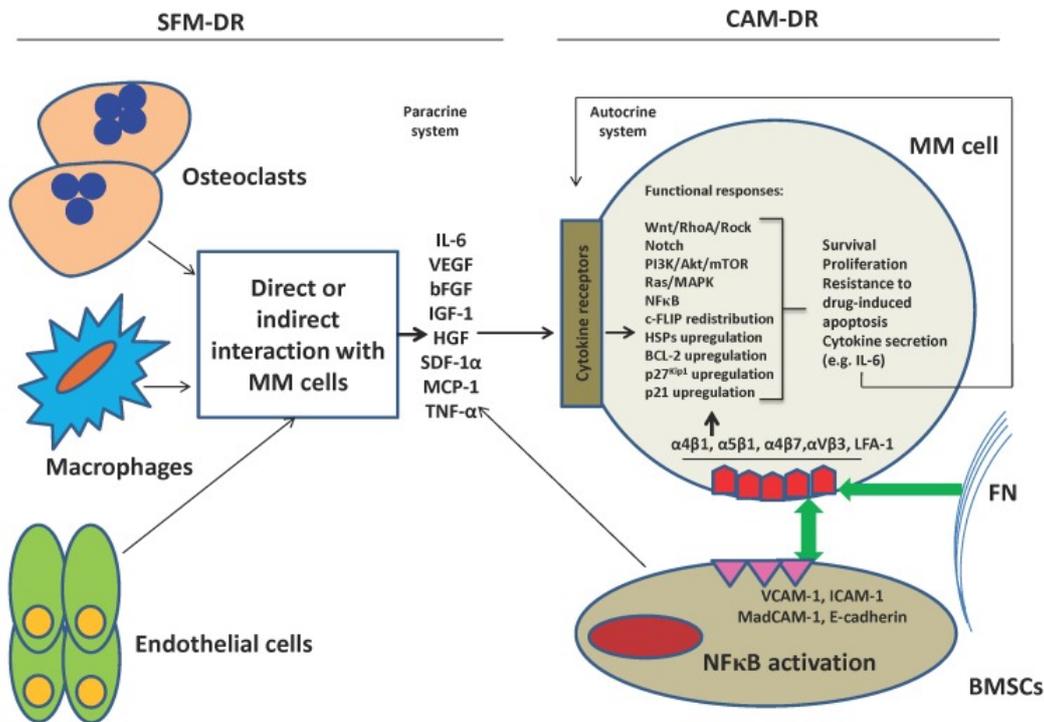
## **7 FACTORES DEL MICROAMBIENTE QUE FAVORECEN LA RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS.**

La presencia de células tumorales después del tratamiento, es decir, la enfermedad residual mínima (MRD o Minimal Residual Disease), sugiere la existencia de nuevas formas de resistencia a los tratamientos aplicados. La resistencia a los fármacos en el MM puede darse por causas intrínsecas o extrínsecas (95) (**Figura 10**). Dentro de las causas intrínsecas nos encontramos con alteraciones genéticas y epigenéticas, sobreexpresión de las bombas de eflujo, alteración de las dianas de los fármacos y desregulación de las vías de señalización intracelulares que están involucradas en la apoptosis y reparación del DNA, entre otras. (96–98). Los mecanismos extrínsecos son aquellos en los que participa el microambiente de la MO, como la producción de citocinas involucradas en este proceso (soluble factors-mediated drug resistance, SFM-DR) o las adhesiones celulares (cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR) (99). Estos mecanismos extrínsecos van a estar directamente relacionados con el microambiente de la MO. De hecho la relación de las células del mieloma con este microambiente son diana de numerosos fármacos que han demostrado ser eficaces tanto en el tratamiento como en evitar mecanismos de resistencia (100,101).



**Figura 10. Mecanismos extrínsecos e intrínsecos que participan en la resistencia a los tratamientos en el MM.** Los mecanismos de resistencia intrínsecos son alteraciones genéticas (A) y epigenéticas (B). En las alteraciones genéticas (A) se incluye mutaciones de múltiples genes como factor 4 regulador del interferón (IRF-4), KRAS, NRAS, factor X asociado a myc (MAX), early growth response 1 (EGR1), proteína tumoral 53 (TP53), BRAF, receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), ciclina D1 (CCND1), gen ataxia telangiectasia mutado (ATM), serenine/threonine kinase (ATR) y zinc finger homebox 4 (ZFH4), que dan lugar a una proliferación no controlada y resistencia a la apoptosis. Las alteraciones epigenéticas (B) abarca mecanismos de hipometilación (ABGC2) e hipermetilación (H3k27); aumento de la regulación de algunos microRNAs (miRNAs) como miR125a-5p y miR21, y disminución de miR33b y miR29b. Otros mecanismos intrínsecos son la sobreexpresión de bombas eflujo y alteración de las dianas de los fármacos (C), desregulación de las vías de señalización intracelular como aquellos que intervienen en la apoptosis (JAK, STAT3, Mcl1, factor de transcripción activador 4 (ATF4)) y reparación del DNA (D). Los mecanismos extrínsecos abarcan la interacción de las células del MM con el microambiente de la MO (E), persistencia de las células madre cancerosa(F) y factores solubles que median resistencia a los tratamientos (soluble factors-mediated drug resistance, SFM-DR) y la adhesión celular que media la resistencia a los fármacos (cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR) (G). Tomado de: Drug resistance in multiple myeloma: Soldiers and weapons in the bone marrow niche Por Giovanni A et al, 2022. *Frontiers in Oncology*.

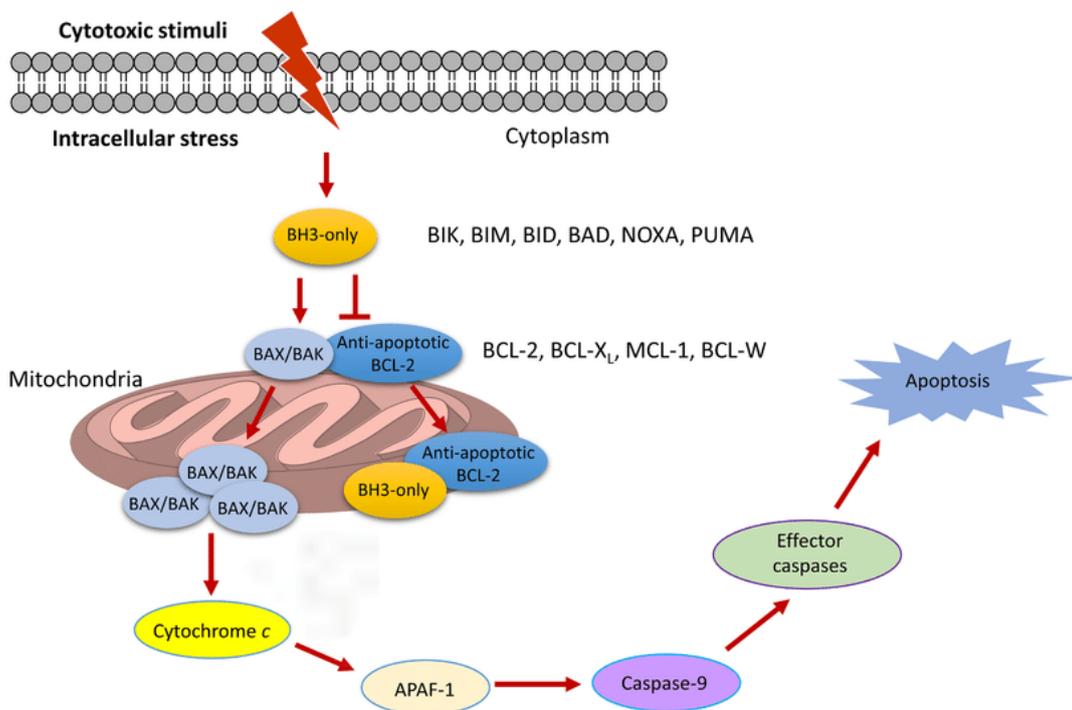
Dada la temática de este trabajo, vamos a centrarnos en los factores extrínsecos que como ya hemos comentado, se dividen en dos categorías, aquellos en los que participan factores solubles, como las citocinas (*SFM-DR*) y aquellos en los que están involucradas las adhesiones celulares a las CMMs o al estroma (*CAM-DR*) (**Figura 11**).



**Figura 11. SFM-DR y CAM-DR actúan juntos en el entorno de la médula ósea.** La adhesión de las células del MM a las CMMs y la FN a través de moléculas de integrina desencadena diversas vías de señalización (como Ras/MAPK, PI3K/Akt, NFκB, Notch, Wnt, HSP) implicadas en la proliferación celular, la antiapoptosis, el RD y la secreción de citocinas (IL-6), así como la regulación al alza de los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2, BCL-2, MCL-1 o BCL-XL. La adhesión anterior induce la secreción de varias citocinas (IL-6, VEGF, HGF, IGF-1, SDF-1α, TNF-α, MCP-1) por parte de las BMSC, lo que desencadena la mayoría de las vías anteriores y la inducción de la resistencia a la apoptosis y a los fármacos en las células del MM (paracrina). La IL-6 también puede estimular las células del MM de forma autocrina, aunque este sistema también se ha demostrado para algunas otras citocinas. Además, la mayoría de las citocinas anteriores también pueden ser secretadas por los osteoclastos, las células endoteliales y los macrófagos durante sus interacciones directas o indirectas con las células del MM, lo que desencadena las respuestas funcionales mencionadas en estas últimas células. Tomado de: *Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms.* Por Jahangir Abdi et al, 2013. *Oncotarget*.

Las SFM-DR relacionadas con el microambiente de la MO están relacionadas mayoritariamente con la activación de las vías JAK/STAT y PI3K/AKT. Entre los factores solubles que median la resistencia a fármacos destaca la IL-6, que está implicada en la resistencia frente a la dexametasona e implica la activación de la vía de señalización JAK/STAT, que a su vez favorecerá la expresión de proteínas antiapoptóticas como son BCL-XL y MCL1 (102,103). Ambas proteínas pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2 que funcionan como

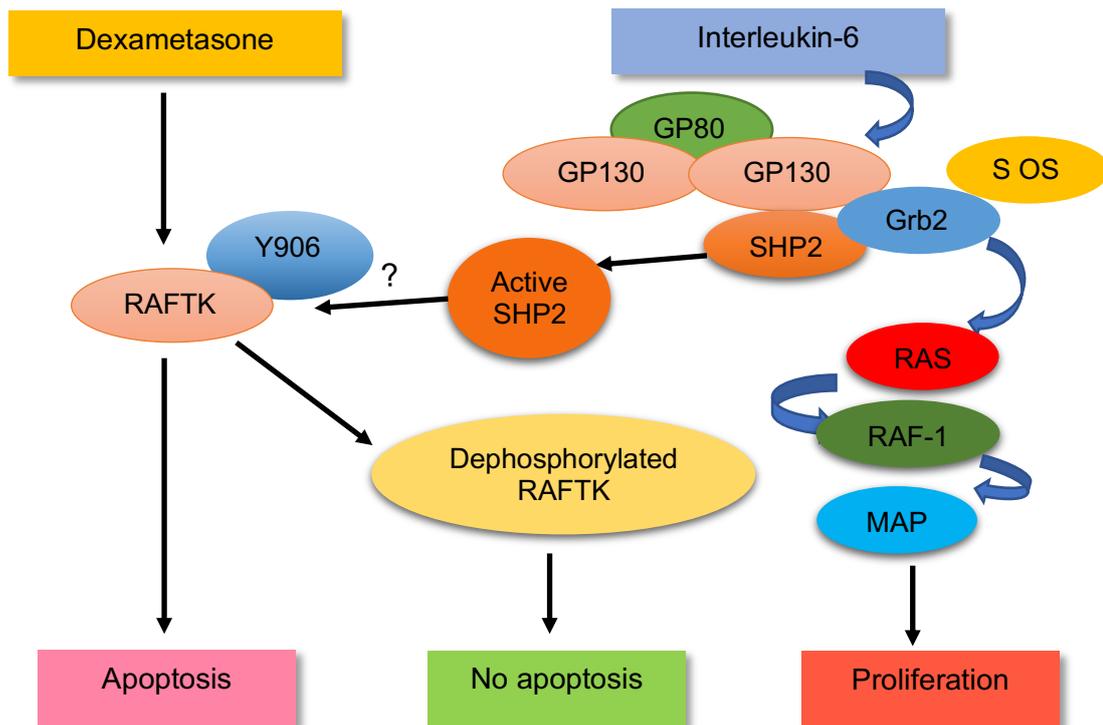
reguladores de vías apoptóticas. Estas proteínas ejercen su acción mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP) a través de interacciones entre proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas. Las proteínas antiapoptóticas interaccionan con proteínas formadoras del poro en la membrana mitocondrial (BAX y BAK), evitando su oligomerización y la formación de dicho poro. Si estas proteínas se oligomerizan y se forma el poro en la membrana mitocondrial, se producirá el eflujo del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma. Este citocromo C se une a factor activador de una proteasa apoptótica (Apoptotic protease activating factor-1, APAF-1), que estimula a la caspasa 9 para activar el efector de caspasas y la activación de la ruta apoptótica (**Figura 12**) (104). La IL-6 por lo tanto, evitará este proceso de formación de poros y, en última instancia, la activación proteolítica de las caspasa y la consiguiente entrada en apoptosis (105,106).



**Figura 12. Efecto regulador de Bcl-2 en la apoptosis.** Tomado de: *PROTACs are effective in addressing the platelet toxicity associated with BCL-XL inhibitors.* Por Peiyi Zhang et al, 2020. ResearchGate.

Por otro lado, para que la dexametasona pueda inducir la apoptosis de las células del MM es necesaria la activación de RAFTK (Protein Tirosin Kinase 2 beta, PTK2B). Cuando la proteína RAFTK está inactiva (desfosforilada) bloquea la acción de la dexametasona y no se produce la apoptosis. La IL6 también participa en la activación de RAFTK en un mecanismo que involucra a la vía MAPk. En este aspecto participa la IL-6, la cual favorece la proliferación de las células del MM a través de la vía MAPK. La proteína, la SHP2 (Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11, PTPN11), que participa en esta vía, se activa tras el contacto con la IL-6 e impide la activación de la proteína RAFTK, y

por lo tanto, actúa favoreciendo la resistencia a la dexametasona (**Figura 13**) (107–109). RAFTK pertenece a la subfamilia FAK (Focal Adhesion Kinase) de proteínas-tirosina quinasa, es una proteína tirosina quinasa dependiente de calcio que se activa en respuesta a diversos estímulos, entre ellos  $TNF\alpha$ , luz ultravioleta, etc., y su activación está involucrada en la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina, la polarización celular, la migración celular, adhesión, la inducción de la apoptosis, etc. (110). SHP2 por su parte, es una proteína que pertenece a la familia de las tirosinas fosfatasa que regula el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica (111).

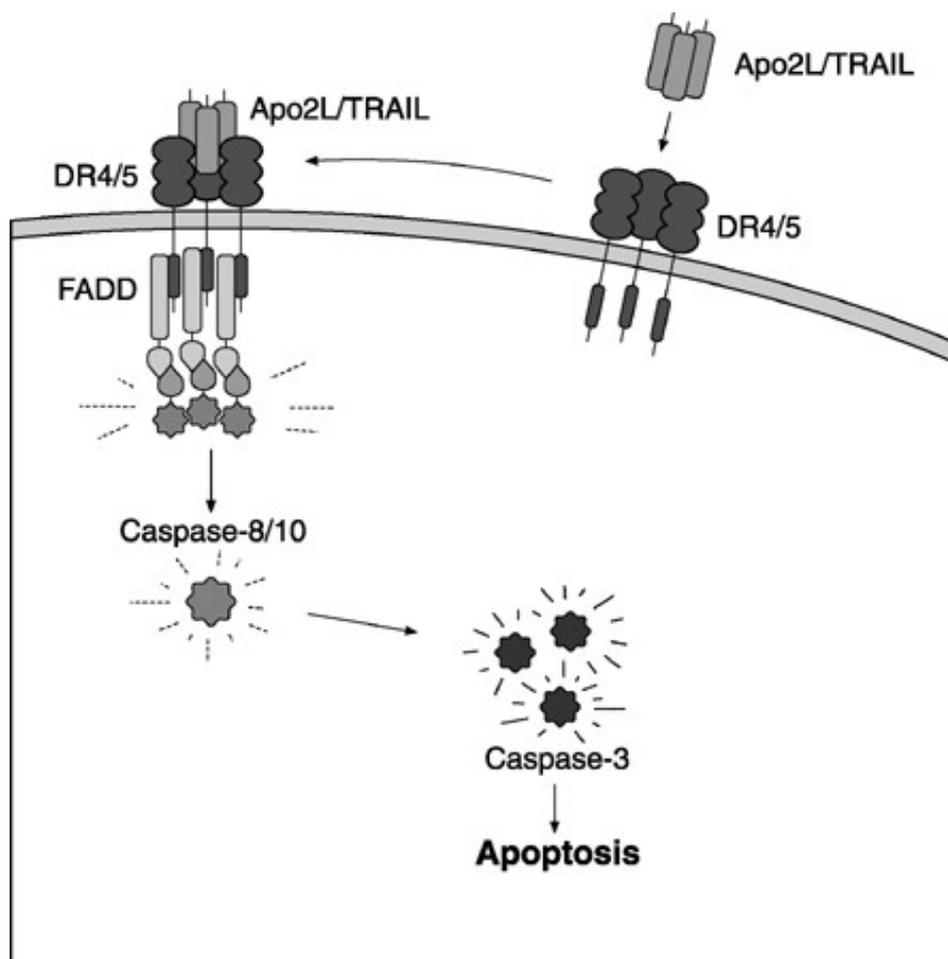


**Figura 13. SHP2 regula de forma negativa a RAFTK.** Modificado de: *Advances in Disease Biology: Therapeutic Implications*. Por Kenneth G. Anderson et al, 2001. *Semin Hematol* 38.

Además de tener un papel relevante en la resistencia a dexametasona, la IL-6 parece estar también implicada en la resistencia a bortezomib. El tratamiento con bortezomib actúa inhibiendo el proteosoma que favorece la inducción de programas proapoptóticos. Si embargo, el bortezomib también produce una activación de proteínas de choque térmico (HSP, heat shock protein), HSP-27, HSP-70 y HSP-90 con efecto antiapoptótico por lo que un tratamiento efectivo requeriría de forma simultánea el uso del bortezomib junto con inhibidores de estas proteínas de heat shock. La IL-6 va a actuar favoreciendo la supervivencia a través de la activación del factor de transcripción STAT-1 que interaccionará con HSF-1 facilitando la transcripción de HSP-70 y HSP-90 y por lo tanto la supervivencia celular (112).

La IGF-1, de forma similar a la IL-6, inhibe la apoptosis celular por la activación de las rutas MAPK, PI3K/AKT y  $NF\kappa B$  que inducen la expresión de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs) que ejercen un papel inhibitorio de

las caspasas y de la muerte celular. Entre estas IAPs encontramos proteínas tales como el inhibidor celular proteico de FLICE (C-FLIP: celular FLICE inhibitory protein), la survivina, el inhibidor celular de la proteína de apoptosis 2 (cIAP2: celular inhibitor of apoptosis 2), la proteína A1 relacionada con Bcl-2 (A1/BFL1: the Bcl-2-related protein A1) y, inhibidor de la proteína de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP). Es importante destacar también que IGF-1 disminuye también la sensibilidad de Apo2L/TRAIL (Apo2 ligand / TNF-Related apoptosis inducing ligand) (28,113). Apo2L/TRAIL es un inductor de la apoptosis, se une a su ligando DR4 y/o DR5 dando lugar al reclutamiento de proteínas que inducen la muerte celular mediante la formación de una estructura conocida como complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (**Figura 14**) (114). Esto se da en numerosas células neoplásicas, entre ellas, las células del MM. IGF-1 estimula a NF- $\kappa$ B, que tiene efectos antiapoptóticos y es un gran regulador de la sensibilidad de Apo2L/TRAIL, disminuyendo la sensibilidad a la misma en las células del MM (113). Además, IGF-1 también se ha visto involucrada en mecanismos de resistencia frente a bortezomib, donde se ha observado que los pacientes con MM refractario a este tratamiento presentaban una sobreexpresión del receptor de IGF-1 y del propio IGF-1 y una regulación al alza de la vía de señalización IGF-1/IGF-1R. De hecho, se ha comprobado que la inhibición farmacológica de IGF-1 favorece la sensibilidad de las células del MM de los pacientes con MM al tratamiento con bortezomib (115).

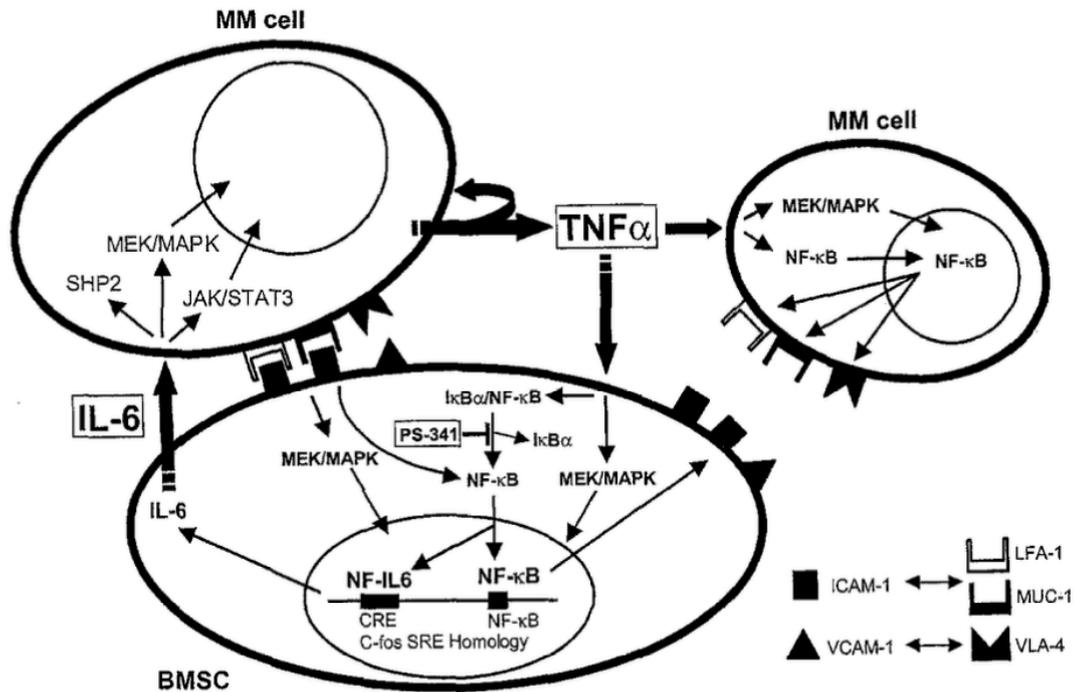


**Figura 14. Acción de Apo2L/TRAIL en la apoptosis.** Tomado de: Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Por H N LeBlanc et Al, 2003. Nature.

Por otro lado, las CAM-DR van a intervenir en la apoptosis inducida por fármacos a través de otras formas de resistencia a los tratamientos que implican a la glicoproteína-P, a la fibronectina, la laminina y el colágeno IV (58). Entre los fármacos que se pueden ver afectados son la doxorrubicina, el melfalán y d la dexametosona. Las CAMs más relevantes en este aspecto son VLA4 y LFA-1 (116).

El  $TNF\alpha$  regula la adhesión entre las células del MM y las CMMs incrementando los niveles de diferentes CAMs a través de la vía  $NF\kappa B$ . Estas moléculas que aumentan en respuesta a  $TNF\alpha$  son LFA1 y VLA4, que se encuentra en la superficie celular de las células del MM e ICAM1 y VCAM1 que están en la superficie de las CMMs. Al aumentar la presencia de estas moléculas aumenta la interacción entre CMMs y las células del MM, lo que a su vez aumenta la expresión de la IL-6 por parte de las CMMs (**Figura 15**), con lo que esto conlleva (117). Por otra parte, las células del MM se adhieren mediante VLA4 a la fibronectina y VCAM-1, esto previene a la apoptosis y contribuye a una selección positiva de las células del MM que sobreexpresan VLA-4, que favorece la resistencia de fármacos como la doxorrubicina y melfalán (118). VLA-4 tiene un papel muy importante a nivel de favorecer las resistencias, al unirse a la fibronectina va a favorecer la expresión del inhibidor CDK p27 e inducir la activación de la vía  $NF-\kappa\beta$ , las cuales confieren resistencia. Se ha comprobado que los pacientes con MM con mayor expresión de moléculas de adhesión en suero como VLA-4 e ICAM-1 existe una mayor resistencia a los fármacos, adquirida por CAM-DR (116,119).

Finalmente podemos decir que el conocer el papel de las moléculas solubles y las CAMs en la resistencia al tratamiento en el MM es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas para el MM. El bloqueo de la acción de estas moléculas o de las interacciones que propician las resistencias sería fundamental para mejorar los tratamientos y el pronóstico de los pacientes.



**Figura 15. Papel del  $TNF\alpha$  en el MM.** El  $TNF\alpha$  aumenta la afinidad de la adhesión entre las células del MM y las CMMs e induce la transcripción y secreción de la IL-6 en las CMMs. Tomado de: *Novel Therapies Targeting the Myeloma Cell and Its Bone Marrow Microenvironment*. Por Teru Hideshima et Al, 2001. *Seminars in Oncology*, Vol 28, No 6.

Por último, las vesículas extracelulares (VEs) secretadas por las MM-CMMs también favorecen la resistencia a los tratamientos, dado que dichas vesículas contienen moléculas bioactivas como miRNA y proteínas que influyen en estas resistencias. Se ha comprobado que en pacientes con MM, las VEs tienen un contenido menor de los supresores tumorales miR-15a y miR-16a con respecto a individuos sanos. Estos dos supresores tumorales actúan a nivel del ciclo celular mediante la regulación negativa de las ciclinas D1, E1 y D2 dando lugar a una parada del ciclo celular en G<sub>1</sub>. La ciclina E1, la ciclina D1 y la ciclina D2 son oncoproteínas que suelen estar desreguladas en los tumores. El incremento de la actividad de estas ciclinas debido a la ampliación génica, la translocación o a un aumento de la estabilidad debido a la inactivación de proteínas responsables de su degradación da lugar a una proliferación celular descontrolada. La pérdida de expresión de miR-15a y miR-16 en neoplasias malignas se traduce en una regulación al alza de estas ciclinas y al crecimiento tumoral. Estos miRNAs también disminuyen la expresión Bcl-2, cuyo modo de acción que ya hemos mencionado previamente (67,95,121).

## 8 CONCLUSIONES.

Las CMMs interactúan con las células del MM tanto de forma directa mediante moléculas de adhesión como indirecta a través de citocinas que inducen cambios en su perfil secretor, favoreciendo la supervivencia, proliferación, diseminación, afectación ósea y resistencia a los tratamientos de las células del MM.

Se ha observado que las CMMs de pacientes y donantes sanos son genética y funcionalmente diferentes entre ellas, teniendo las primeras una capacidad proliferativa menor, unos niveles de mRNA de IL-6 mayores, una mayor expresión de marcadores de senescencia y un menor potencial osteogénico.

El microambiente de la médula ósea es esencial para el anidamiento (*homing*) y diseminación de la enfermedad, siendo SDF1 $\alpha$  la quimiocina fundamental en este proceso. Esta quimiocina, producida por las CMMs, se une a su receptor CXCR4 en las células del MM causando su migración hacia el estroma de la médula ósea.

La IL-6 es la interleucina más importante en la patogénesis del MM ya que estimula el crecimiento celular, la supervivencia, la diseminación y la resistencia a los tratamientos a través de diferentes vías de señalización.

Las células del MM contribuyen a un cambio en la homeostasis ósea que favorece la resorción frente a la formación de hueso provocando las lesiones osteolíticas típicas de esta enfermedad. Las células del MM y las CMMs estimulan la activación de los osteoclastos y la resorción ósea aumentando el ratio RANKL/OPG mediante el aumento de la producción de RANKL y disminución de OPG. Además, las células del MM inhiben la diferenciación de las CMMs hacia osteoblastos impidiendo su actividad.

La resistencia a los fármacos en el MM se puede dar por mecanismos intrínsecos o extrínsecos. El microambiente de la médula ósea participaría en los mecanismo extrínsecos de resistencia donde tienen un papel relevante citocinas como IL-6 y IGF-1, además de las moléculas de adhesión y las vesículas extracelulares.

Con todo esto, las CMMs tienen un papel fundamental en la progresión y desarrollo de las células del MM, siendo de gran importancia y necesidad más investigaciones en este campo debido a que podrían ser un factor atractivo para el mejor entendimiento de la enfermedad y una mejor caracterización de los pacientes.

## **9 AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar, gracias a mi tutora, la prof<sup>a</sup>. Flor M. Perez Campo, sin su ayuda y dedicación este trabajo no habría sido posible.

Gracias a mis padres y a mi hermana por todos sus esfuerzos por haberme permitido estudiar con la tranquilidad de tenerlos a mi lado y por haberme apoyado para llegar hasta donde estoy actualmente.

Te agradezco a ti, Marcos, por ser mi mayor soporte a lo largo de estos seis años de carrera, por creer en mí cuando yo dudaba, por toda tu paciencia y tu apoyo incondicional.

Por último, pero no por ello menos importante, a mis amigos que me han acompañado durante todo este camino y sin ellos esta etapa tan bonita no hubiese sido lo mismo.

Muchas gracias, de corazón.

## 10 BIBLIOGRAFÍA.

1. Alvarado-Ibarra M, Luis Álvarez-Vera J, Anaya-Cuéllar I, de La Peña-Celaya A, García-Fernández L, Hernández-Ruiz E, et al. Primer Consenso Nacional de Mieloma Múltiple por Hematólogos del ISSSTE. Vol. 16, artículo EspEcial Rev Hematol Mex. 2015.
2. Gonsalves WI, Rajkumar S v., Gupta V, Morice WG, Timm MM, Singh PP, et al. Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: Implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia*. 1 de octubre de 2014;28(10):2060-5.
3. Neumeister P, Schulz E, Pansy K, Szmyra M, Deutsch AJA. Targeting the Microenvironment for Treating Multiple Myeloma. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
4. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. Vol. 110, *Blood*. American Society of Hematology; 2007. p. 3112-21.
5. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [Internet]. [citado 11 de abril de 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/>
6. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. [Internet]. based on November 2018 SEER data submission. 2019 [citado 11 de abril de 2023]. Disponible en: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/)
7. SEER explorer [Internet]. [citado 11 de abril de 2023]. Disponible en: [https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=1&data\\_type=1&graph\\_type=2&compareBy=sex&chk\\_sex\\_3=3&chk\\_sex\\_2=2&rate\\_type=2&race=1&age\\_range=1&hdn\\_stage=101&advopt\\_precision=1&advopt\\_show\\_ci=on&hdn\\_view=0&advopt\\_show\\_apc=on&advopt\\_display=2#resultsRegion0](https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=1&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&rate_type=2&race=1&age_range=1&hdn_stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_show_apc=on&advopt_display=2#resultsRegion0)
8. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global burden of multiple myeloma: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. En: *JAMA Oncology*. American Medical Association; 2018. p. 1221-7.
9. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Vol. 15, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2014. p. e538-48.
10. Cejalvo MJ, de la Rubia J. Which therapies will move to the front line for multiple myeloma? *Expert Rev Hematol*. 4 de mayo de 2017;10(5):383-92.
11. Rajkumar SV. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol*. 1 de junio de 2019;37(S1):62-5.

12. Yang P, Qu Y, Wang M, Chu B, Chen W, Zheng Y, et al. Pathogenesis and treatment of multiple myeloma. Vol. 3, MedComm. Blackwell Publishing Inc.; 2022.
13. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 1 de junio de 2011;128(11):2527-35.
14. García-Ortiz A, Rodríguez-García Y, Encinas J, Maroto-Martín E, Castellano E, Teixidó J, et al. cancers The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. 2021; Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers13020217>
15. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Gö GT, Roccaro AM, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. 2014.
16. Friedenstein AJ, Petrakova K v, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. marzo de 1968;6(2):230-47.
17. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. agosto de 2006;8(4):315-7.
18. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Vol. 505, *Nature*. 2014. p. 327-34.
19. Hao P, Zhang C, Wang R, Yan P, Peng R. Expression and pathogenesis of VCAM-1 and VLA-4 cytokines in multiple myeloma. *Saudi J Biol Sci*. 1 de junio de 2020;27(6):1674-8.
20. Kawano MM, Huang N, Tanaka H, Ishikawa H, Sakai A. Homotypic cell aggregations of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. Vol. 79, *British journal oJHaematology*. 1991.
21. Kurihara N, Shiozawa Y, Joseph J, Taichman R, Galson DL, David Roodman G. LYMPHOID NEOPLASIA Annexin II interactions with the annexin II receptor enhance multiple myeloma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment. 2012; Disponible en: [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org)
22. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. Vol. 7, *Nature Reviews Cancer*. 2007. p. 585-98.
23. Hosen N. Integrins in multiple myeloma. Vol. 40, *Inflammation and Regeneration*. BioMed Central Ltd.; 2020.
24. Asosingh K, Vankerkhove V, Riet I van, Camp B van, Vanderkerken K. Selective in vivo growth of lymphocyte function-associated antigen-1-

positive murine myeloma cells: Involvement of function-associated antigen-1-mediated homotypic cell-cell adhesion. Vol. 31, Experimental Hematology. 2003.

25. Ahsmann EJM, Lokhorst HM, Dekker AW, Bloem AC. Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 Expression on Plasma Cells Correlates With Tumor Growth in Multiple Myeloma Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) (CD11a / CD18) expression on bone marrow-derived plasma cells from normal individuals, patients with monoclonal gammo.
26. Tagde A, Rajabi H, Bouillez A, Alam M, Gali R, Bailey S, et al. MUC1-C drives MYC in multiple myeloma Key Points. 2016; Disponible en: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/21/2587/1394136/2587.pdf>
27. Yang Y, MacLeod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, et al. Heparanase enhances syndecan-1 shedding: A novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. Journal of Biological Chemistry. 4 de mayo de 2007;282(18):13326-33.
28. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma [Internet]. Disponible en: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)
29. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto KL, Libermann TA, et al. Multiple Myeloma Cell Adhesion-Induced Interleukin-6 Expression in Bone Marrow Stromal Cells Involves Activation of NF-KB. Vol. 87, Blood. 1996.
30. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications [Internet]. Disponible en: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)
31. Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma.
32. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Hatziyanni M, Vidriales MB, Dederá DA, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$  1: Differential Effects on Multiple Myeloma Versus Normal B Cells.
33. Bolkun L, Lemancewicz D, Jablonska E, Kulczynska A, Bolkun-Skornicka U, Kloczko J, et al. BAFF and APRIL as TNF superfamily molecules and angiogenesis parallel progression of human multiple myeloma. Ann Hematol. 2014;93(4):635-44.
34. Angelo Vacca B, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, et al. Project Diagnosis and Prognosis in Clinical Oncology to F.D. and Special Project Angiogenesis to M. Vol. 93. 1999.
35. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells

- upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications [Internet]. Vol. 15, *Leukemia*. 2001. Disponible en: [www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)
36. Peng Y, Li F, Zhang P, Wang X, Shen Y, Feng Y, et al. IGF-1 promotes multiple myeloma progression through PI3K/Akt-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Life Sci*. 15 de mayo de 2020;249.
  37. Jurczyszyn A, Czepiel J, Biesiada G, Gdula-Argasińska J, Cibor D, Owczarek D, et al. HGF, sIL-6R and TGF- $\beta$ 1 play a significant role in the progression of multiple myeloma. *J Cancer*. 2014;5(7):518-24.
  38. Menu E, Asosingh K, Indraccolo S, de Raeye H, van Riet I, van Valckenborgh E, et al. The involvement of stromal derived factor 1alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model. *Haematologica*. 2006;91(605-12).
  39. Liu Y, Liang HM, Lv YQ, Tang SM, Cheng P. Blockade of SDF-1/CXCR4 reduces adhesion-mediated chemoresistance of multiple myeloma cells via interacting with interleukin-6. *J Cell Physiol*. 1 de noviembre de 2019;234(11):19702-14.
  40. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 213-28.
  41. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. Vol. 9, *Biology*. MDPI AG; 2020.
  42. Xu S, De Veirman K, De Becker A, Vanderkerken K, Van Riet I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: A therapeutic tool or target? Vol. 32, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2018. p. 1500-14.
  43. Zdzisińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, Kandefer-Szerszeń M. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. junio de 2008;56(3):207-21.
  44. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21(5):1079-88.
  45. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, et al. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. octubre de 2007;48(10):2032-41.
  46. Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltsis-Mortari A, Masellis AM. Abnormalities of Bone Marrow Mesenchymal Cells in Multiple Myeloma Patients. 2001.
  47. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow

- mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21(1):158-63.
48. Wang X, Zhang Z, Yao C. Angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Invest*. enero de 2011;29(1):37-41.
  49. André T, Meuleman N, Stamatopoulos B, de Bruyn C, Pieters K, Bron D, et al. Evidences of Early Senescence in Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One*. 21 de marzo de 2013;8(3).
  50. Xu S, Evans H, Buckle C, De Veirman K, Hu J, Xu D, et al. Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients is associated with a blockade in the deactivation of the Notch signaling pathway. Vol. 26, *Leukemia*. 2012. p. 2546-9.
  51. Li B, Shi M, Li J, Zhang H, Chen B, Chen L, et al. Elevated tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses TAZ expression and impairs osteogenic potential of Flk-1+ mesenchymal stem cells in patients with multiple myeloma. *Stem Cells Dev*. 1 de diciembre de 2007;16(6):921-30.
  52. Díaz Carrasco I, Guisado Rasco A, Ordoñez Fernández A. ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? *CardiCore*. 1 de octubre de 2016;51(4):161-6.
  53. Mazziotta C, Lanzillotti C, Iaquina MR, Taraballi F, Torreggiani E, Rotondo JC, et al. Micrnas modulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1-21.
  54. Xu S, Cecilia Santini G, De Veirman K, Vande Broek I, Leleu X, De Becker A, et al. Upregulation of miR-135b is involved in the impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients. *PLoS One*. 6 de noviembre de 2013;8(11).
  55. Berenstein R, Nogai A, Waechter M, Blau O, Kuehnel A, Schmidt-Hieber M, et al. Multiple myeloma cells modify VEGF/IL-6 levels and osteogenic potential of bone marrow stromal cells via Notch/miR-223. *Mol Carcinog*. 1 de diciembre de 2016;55(12):1927-39.
  56. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: Characterization, origin, and tumor-promoting effects. Vol. 18, *Clinical Cancer Research*. 2012. p. 342-9.
  57. Garcia-Gomez A, De Las Rivas J, Ocio EM, Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Martín M, et al. Transcriptomic profile induced in bone marrow mesenchymal stromal cells after interaction with multiple myeloma cells: implications in myeloma progression and myeloma bone disease [Internet]. Vol. 5. Disponible en: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
  58. Maiso P, Mogollón P, Ocio EM, Garayoa M. Bone marrow mesenchymal stromal cells in multiple myeloma: Their role as active contributors to myeloma progression. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.

59. Neri P, Bahlis NJ. Targeting of Adhesion Molecules as a Therapeutic Strategy in Multiple Myeloma. Vol. 12, *Current Cancer Drug Targets*. 2012.
60. Hideshima T, Anderson KC. Signaling pathway mediating myeloma cell growth and survival. Vol. 13, *Cancers*. MDPI AG; 2021. p. 1-17.
61. Damiano JS, Dalton WS, Lee H. 2). Vol. 38.
62. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: Clinical applications. Vol. 104, *Blood*. American Society of Hematology; 2004. p. 607-18.
63. Cippitelli M, Stabile H, Kosta A, Petillo S, Lucantonio L, Gismondi A, et al. Role of NF- $\kappa$ B Signaling in the Interplay between Multiple Myeloma and Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci*. 17 de enero de 2023;24(3):1823.
64. Colombo M, Garavelli S, Mazzola M, Platonova N, Giannandrea D, Colella R, et al. Multiple myeloma exploits Jagged1 and Jagged2 to promote intrinsic and bone marrow-dependent drug resistance. *Haematologica*. 1 de julio de 2020;105(7):1925-36.
65. Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA. A Crosstalk Between Myeloma Cells and Marrow Stromal Cells Stimulates Production of DKK1 and Interleukin-6: A Potential Role in the Development of Lytic Bone Disease and Tumor Progression in Multiple Myeloma. *Stem Cells*. 1 de abril de 2006;24(4):986-91.
66. Furukawa M, Ohkawara H, Ogawa K, Ikeda K, Ueda K, Shichishima-Nakamura A, et al. Autocrine and paracrine interactions between multiple myeloma cells and bone marrow stromal cells by growth arrest-specific gene 6 cross-talk with interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry*. 10 de marzo de 2017;292(10):4280-92.
67. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *Journal of Clinical Investigation*. 1 de abril de 2013;123(4):1542-55.
68. Deng M, Yuan H, Liu S, Hu Z, Xiao H. Exosome-transmitted LINC00461 promotes multiple myeloma cell proliferation and suppresses apoptosis by modulating microRNA/BCL-2 expression. *Cytotherapy*. 1 de enero de 2019;21(1):96-106.
69. Umezu T, Imanishi S, Yoshizawa S, Kawana C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Induction of multiple myeloma bone marrow stromal cell apoptosis by inhibiting extracellular vesicle miR-10a secretion. *Blood Adv*. 12 de noviembre de 2019;3(21):3228-40.
70. de Veirman K, Wang J, Xu S, Leleu X, Himpe E, Maes K, et al. Induction of miR-146a by multiple myeloma cells in mesenchymal stromal cells

- stimulates their pro-tumoral activity. *Cancer Lett.* 10 de julio de 2016;377(1):17-24.
71. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: Implications for therapy. Vol. 120, *Blood*. American Society of Hematology; 2012. p. 20-30.
  72. Bouyssou JMC, Ghobrial IM, Roccaro AM. Targeting SDF-1 in multiple myeloma tumor microenvironment. Vol. 380, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 315-8.
  73. McDonald MM, Fairfield H, Falank C, Reagan MR. Adipose, Bone, and Myeloma: Contributions from the Microenvironment. Vol. 100, *Calcified Tissue International*. Springer New York LLC; 2017. p. 433-48.
  74. García-Sanz R, Alegre A, Capote FJ, Hernández JM, Rosiñol L, Rubia J de la, et al. Utilización de bisfosfonatos en pacientes con mieloma múltiple: recomendaciones del comité de expertos del Grupo Español de Mieloma del Programa Español de Tratamientos en Hematología. *Med Clin (Barc)*. 6 de marzo de 2010;134(6):268-78.
  75. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: Proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 1 de agosto de 2003;102(3):1064-9.
  76. J. Boyle W, Scott Simonet W, L. Lacey D. Osteoclast differentiation and activation. 2003; Disponible en: [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
  77. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression [Internet]. 2001. Disponible en: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201394498](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201394498)
  78. Sugatani T, Alvarez UM, Hruska KA. Activin A stimulates I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF $\kappa$ B and RANK expression for osteoclast differentiation, but not AKT survival pathway in osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. 1 de septiembre de 2003;90(1):59-67.
  79. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J*. junio de 2011;1(6).
  80. Menu E, De Leenheer E, De Raeve H, Coulton L, Imanishi T, Miyashita K, et al. Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: A study in the 5TMM model. *Clin Exp Metastasis*. noviembre de 2006;23(5-6):291-300.
  81. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: The importance of the neighbourhood. Vol. 16, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2016. p. 373-86.

82. Hashimoto T, Abe M, Oshima T, Shibata H, Ozaki S, Inoue D, et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* abril de 2004;125(1):38-41.
83. Nguyen AN, Stebbins EG, Henson M, O'Young G, Choi SJ, Quon D, et al. Normalizing the bone marrow microenvironment with p38 inhibitor reduces multiple myeloma cell proliferation and adhesion and suppresses osteoclast formation. *Exp Cell Res.* 10 de junio de 2006;312(10):1909-23.
84. Noonan K, Marchionni L, Anderson J, Pardoll D, Roodman GD, Borrello I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 4 de noviembre de 2010;116(18):3554-63.
85. Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: Clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol.* octubre de 2003;123(2):263-70.
86. Yin L. Chondroitin synthase 1 is a key molecule in myeloma cell-osteoclast interactions. *Journal of Biological Chemistry.* 22 de abril de 2005;280(16):15666-72.
87. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood.* 2005;106(7):2472-83.
88. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. 2008; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
89. Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* diciembre de 2011;112(12):3491-501.
90. Vallet S, Mukherjee S, Vaghela N, Hideshima T, Fulciniti M, Pozzi S, et al. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 de marzo de 2010;107(11):5124-9.
91. Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, et al. BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *Journal of Biological Chemistry.* 5 de septiembre de 2003;278(36):34387-94.
92. Lu X, Gilbert L, He X, Rubin J, Nanes MS. Transcriptional regulation of the osterix (*Osx*, *Sp7*) promoter by tumor necrosis factor identifies disparate effects of mitogen-activated protein kinase and NF $\kappa$ B pathways. *Journal of Biological Chemistry.* 10 de marzo de 2006;281(10):6297-306.

93. Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, Choi SJ, Morandi F, Colla S, et al. EL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood*. 15 de agosto de 2005;106(4):1407-14.
94. Bolzoni M, Donofrio G, Storti P, Guasco D, Toscani D, Lazzaretti M, et al. Myeloma cells inhibit non-canonical wnt co-receptor ror2 expression in human bone marrow osteoprogenitor cells: Effect of wnt5a/ror2 pathway activation on the osteogenic differentiation impairment induced by myeloma cells. *Leukemia*. febrero de 2013;27(2):451-63.
95. Yang WC, Lin SF. Mechanisms of Drug Resistance in Relapse and Refractory Multiple Myeloma. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
96. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 16 de enero de 2014;5.
97. Zhou W, Yang Y, Xia J, Wang H, Salama ME, Xiong W, et al. NEK2 Induces Drug Resistance Mainly through Activation of Efflux Drug Pumps and Is Associated with Poor Prognosis in Myeloma and Other Cancers. *Cancer Cell*. 14 de enero de 2013;23(1):48-62.
98. Gourzones-Dmitriev C, Kassambara A, Sahota S, Rème T, Moreaux J, Bourquard P, et al. DNA repair pathways in human multiple myeloma: Role in oncogenesis and potential targets for treatment. Vol. 12, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2013. p. 2760-73.
99. Marzo L Di, Desantis V, Solimando AG, Ruggieri S, Annese T, Nico B, et al. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players [Internet]. Vol. 7. Disponible en: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
100. Xu H, Han H, Song S, Yi N, Qian C, Qiu Y, et al. Exosome-transmitted PSMA3 and PSMA3-AS1 promote proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(6):1923-35.
101. Rao L, De Veirman K, Giannico D, Saltarella I, Desantis V, Frassanito MA, et al. Targeting angiogenesis in multiple myeloma by the VEGF and HGF blocking DARPin® protein MP0250: a preclinical study [Internet]. Vol. 9, *Oncotarget*. 2018. Disponible en: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
102. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oscuro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. *Immunity*. 1999;10:105-15.
103. Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates Mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than Ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*. 1999;29(12):3945-50.

104. BCL2L1 gene [Internet]. 2023 [citado 26 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2L1&keywords=BCL-XL>
105. MCL1 Gene [Internet]. 2023 [citado 26 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MCL1&keywords=MCL-1>
106. Seiller C, Maiga S, Touzeau C, Bellanger C, Kervoëlen C, Descamps G, et al. Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis.* 1 de mayo de 2020;11(5).
107. Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, Treon S, Raje N, Davies FE, et al. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Journal of Biological Chemistry.* 8 de septiembre de 2000;275(36):27845-50.
108. PTK2B gene [Internet]. 2023 [citado 26 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTK2B&keywords=RAFTK#summaries>
109. Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, Treon S, Raje N, Davies FE, et al. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Journal of Biological Chemistry.* 8 de septiembre de 2000;275(36):27845-50.
110. Chauhan D, Pandey P, Hideshima T, Treon S, Raje N, Davies FE, et al. SHP2 Mediates the Protective Effect of Interleukin-6 Against Dexamethasone-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells Downloaded from [Internet]. *JBC Papers in Press*; 2000. Disponible en: <http://www.jbc.org/>
111. PTPN11 [Internet]. 2023 [citado 26 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN11&keywords=SHP2>
112. Voorhees PM, Chen Q, Kuhn DJ, Small GW, Hunsucker SA, Strader JS, et al. Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research.* 1 de noviembre de 2007;13(21):6469-78.
113. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF- $\kappa$ B and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* [Internet]. 2002;21:5673-83. Disponible en: [www.nature.com/onc](http://www.nature.com/onc)
114. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Vol. 10, *Cell Death and Differentiation*. 2003. p. 66-75.

115. 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*. 18 de octubre de 2012;120(16):3260-70.
116. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms [Internet]. Vol. 4, *Oncotarget*. 2013. Disponible en: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
117. Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. *Novel Therapies Targeting the Myeloma Cell and Its Bone Marrow Microenvironment*. 2001.
118. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS, Lee H. Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines.
119. Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, et al. Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 15 de enero de 2009;28(2):231-42.
120. Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Lin HY, Jones RJ, Kuyatse I, Wang H, et al. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: Therapeutic implications. *Leukemia*. febrero de 2014;28(2):373-83.
121. Lerner M, Harada M, Lovén J, Castro J, Davis Z, Oscier D, et al. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res*. 15 de octubre de 2009;315(17):2941-52.