



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Disrupció de l'homeòstasi lipídica com estratègia terapèutica en leucèmia limfoblàstica aguda-T

Antònia Banús Mulet

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

Programa de Doctorat en Biomedicina

Disrupció de l'homeòstasi lipídica com  
estratègia terapèutica  
en leucèmia limfoblàstica aguda -T

Memòria presentada per Antònia Banús Mulet per optar al títol de  
doctora per la Universitat de Barcelona

Ruth Muñoz Risueño  
la directora

Antònia Banús Mulet  
la doctoranda

Albert Tauler Girona  
el tutor

Antònia Banús Mulet  
Barcelona, 2019



Aquest estudi ha estat finançat pel programa estatal de I+D+i orientada a los Retos de la Sociedad 2016 del Ministeri de Ciencia, Innovación i Universidades i s'ha dut a terme a l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras.



## **Resum**

Recentment s'han descrit els receptors de dopamina per la seva implicació en càncer i la seva potencial inhibició com a mecanisme antitumoral. Al present treball s'ha ampliat aquesta recerca a la LLA-T, una malaltia amb recaigudes freqüents i mal pronòstic en pacients adults, i on existeix la necessitat de tractaments innovadors. Aquí, es descriuen els efectes antileucèmics selectius de L741-742, nemonaprida i RBI-257, tots ells antagonistes del receptor de dopamina tipus 4 (DRD4), al rang micromolar baix, validats en experiments en línies cel·lulars i amb una mostra primària en experiments ex vivo i in vivo. Aquest grup de compostos, anomenats antagonistes del DRD4, mostren efectes sinèrgics amb quimioteràpia convencional. El mecanisme pel qual els antagonistes de DRD4 exerceixen els seus efectes antileucèmics és independent de DRD4, i és produït mitjançant la inducció de la fosfolipidosi i la subseqüent desregulació de l'homeòstasi lipídica. Els antagonistes de DRD4 es caracteritzen per ser fàrmacs hidrofòbics amb estructura catiònica amfifílica, característiques que s'han relacionat prèviament amb la inducció de la fosfolipidosi. L'acumulació d'agregats fosfolipídics als lisosomes, pertorba el normal funcionament del compartiment de reciclatge. El mal funcionament lisosomal sembla comportar una acumulació del material cel·lular digerible i en consonància un augment del compartiment autofàgic. Aquest conjunt d'alteracions precipita finalment les cèl·lules leucèmiques a la mort cel·lular dependent d'autofàgia. L'efecte antileucèmic selectiu d'aquests compostos es deu a la vulnerabilitat del compartiment lisosomal i la fragilitat de les membranes fosfolipídiques en càncer. A partir d'aquestes observacions, es proposa l'ús dels compostos inductors de la fosfolipidosi com a estratègia terapèutica en LLA-T.



## **Abstract**

Dopamine receptor has been recently identified for their involvement in cancer progress and their inhibition as a potential antitumor mechanism. The present work has expanded this research to T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), a disease characterized by frequent relapse and bad prognosis in adults, for which novel treatments are urgently needed. Herein, we report selective antileukemia effects induced by L741-742, nemonapride and RBI-257 at low micromolar range, all of them subtype-specific dopamine receptor type 4 (DRD4) antagonists, as assessed in cell lines and in a primary sample *ex vivo* and *in vivo*. This group of compounds, hereafter DRD4 antagonists, display synergic effects when combined with conventional chemotherapy. DRD4 antagonists' mechanism of action is DRD4-independent and rely instead on phospholipidosis induction and subsequently disruption of lipid homeostasis. DRD4 antagonists possess a cationic amphiphilic structure with overall hydrophobicity, features related to phospholipidosis induction. Phospholipid accumulation in lysosomes, alters the normal function of the cellular recycling compartment. Dysfunctional lysosomes seem to entail an accumulation of the digestible cell material and in consonance an increase in the autophagic compartment. This set of alterations ultimately precipitates leukemia cells to an autophagy-mediated cell death. Considering these observations, the use of phospholipidosis-inducing drugs is proposed as a potential therapeutic strategy in T-ALL.





## Abreviatures

**ACC:** Acetil-CoA carboxilasa

**ACLY:** ATP-citrat lias

**ADCD:** Mort cel·lular dependent d'autofàgia

**AGPAT:** Acilglicerol fosfat acil transferasa

**AMACR:** Alfa metilacil coenzima A racemasa

**AMPK:** Proteïna-cinasa activada per AMP

**ATG:** gen relacionat amb l'autofàgia

**ATGL:** Adipo-triglicèrid lipasa

**BME:**  $\beta$ -mercaptoetanol

**BSA:** Albúmina sèrica bovina

**CAD:** Fàrmac catiònic amfifílic

**CFSE:** Èster de succinimidil-carboxifluoresceïna

**CFU:** Unitat formadora de colònia

**CLEAR:** Xarxa d'expressió i regulació lisosomal coordinada

**CMH:** Complex major d'histocompatibilitat

**COX2:** Ciclooxygenasa 2

**CPTI-II:** Transportador específic acil/carnitina I i II.

**CSC:** Cèl·lules mare del càncer

**DAG:** Diacilglicerol

**DGAT:** Diacilglicerol acil transferasa

**DMSO:** Dimetilsulfòxid

**DN:** Doble negatiu (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)

**DP:** Doble positiu (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>)

**DR:** Receptor de dopamina

**DRD4:** Receptor de dopamina tipus 4

**DTT:** Ditiotreitòl

**EOBA:** Excés sobre l'aditivisme de Bliss

**ETP:** Progenitors primerencs T

**EVOVL:** Allargament de cadenes llargues d'àcids grassos

**FASN:** Àcid gras sintasa

**FBS:** Sèrum boví fetal

**FDA:** Administració d'aliments i fàrmacs dels Estats Units

**FLT3:** Tirosina cinasa semblant a fms-3

**FSC:** Dispersió frontal de la llum

**GPAT:** Glicerol-3-fosfat aciltransferasa

**GPCR:** Receptor acoblat a proteïnes G

**HBSS:** Solució salina equilibrada de Hanks

**HCS:** Cribratge d'alt contingut

**HSC:** Cèl·lules mare hematopoètiques

**HSL:** Hormona sensible a la lipasa

**IL-7R:** Receptor interleucina 7

**IL:** Interleucina

**LAMP:** Proteïna associada a la membrana lisosomal

**LC3:** Cadena curta 3 de les proteïnes associades a microtúbuls 1A/1B

**LD:** *Lipid droplets* / Gotes lipídiques

**LIMP:** Proteïna integral de membrana lisosomal

**LLA:** Leucèmia limfoblàstica aguda

**LMA:** leucèmia mieloide aguda

**LMMC:** Leucèmia mielomonocítica crònica

**LMP:** Permeabilització de la membrana lisosomal

**LTR:** LysoTracker

**LXR:** Receptor hepàtic X

**MAG:** Monoacilglicerol

**MDR:** Resistents a múltiples fàrmacs

**MFI:** Intensitat mitjana de la fluorescència

**MGL:** Lipasa monoacilglicerol

**mitROS:** Espècies reactives de l'oxigen mitocondrials

**mTORC1:** Complex 1 de la diana mecànica de la rapamicina

**NCCD:** Comitè de nomenclatura de la mort cel·lular

**OMS:** Organització mundial de la salut

**PAP:** Àcid fosfatídic fosfatasa

**PBS:** Tampó fosfat salí

**PC:** Fosfatidilcolina

**PDX:** Mostra derivada de pacient

**PE:** Fosfatidiletanolamina

**PEXs:** Peroxines

**PI:** Fosfatidilinositol

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinasa

**PLINs:** Perilipines

**PMSF:** Fluorur de fenilmetilsulfoni

**PPP:** Via de les pentoses-6-fosfat

**PS:** Fosfatidilserina

**PTS1:** Senyal d'orientació peroxisomal

**ROS:** Espècies reactives d'oxigen

**S1P:** Esfingosina-1-fosfat

**SCD:** Esteraoïl desaturasa

**SCF:** Factor de cèl·lules mare

**SCT:** Transplantament cèl·lules mare

**SDS:** Dodecil sulfat sòdic

**SEM:** Error estàndard de la mitjana

**SMD:** Síndrome mielodisplàsica

**SP:** Esfíngolípid

**SphK1:** Esfingosina quinasa 1

**SPR1:** Receptor esfingosina-1-fosfat

**SREBP:** Proteïna d'unió a l'element regulador de l'esterol

**SSC:** Dispersió lateral de la llum

**TAG:** Triacilglicerol

**TBS:** Sèrum salí tamponat amb Tris

**TCA:** Cicle àcid cítric

**TCR:** Receptor de limfòcits T

**TFEB:** Factor de transcripció EB

**TPO:** Trombopoetina

**ULK1:** Cinasa activadora de l'autofàgia semblat a Unc-51

**VEGF:** Factor de creixement de l'endoteli vascular

**VLCFA:** Àcids grassos de cadenes llargues

## Índex:

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. Homeòstasi lipídica i la reprogramació en càncer</b> .....	<b>21</b>
1.1.1. El metabolisme lipídic.....	21
1.1.2. Classificació lípids.....	21
1.1.3. Funcions cel·lulars lipídiques.....	21
1.1.4. Vies del metabolisme lipídic.....	23
1.1.4.1. Degradació d'àcids grassos.....	24
1.1.4.2. Síntesi d'àcids grassos.....	26
<b>1.2. La reprogramació lipídica en càncer</b> .....	<b>28</b>
1.2.1. Síntesi lipídica en càncer.....	29
1.2.2. Degradació lipídica en càncer.....	32
1.2.3. Comunicació lipídica i tumor-microambient i metàstasi.....	36
1.2.4. <i>Lipid droplets</i> en càncer.....	38
<b>1.3. El compartiment de reciclatge i el càncer</b> .....	<b>39</b>
1.3.1. Lisosomes.....	39
1.3.2. L'autofàgia.....	41
1.3.2.1. Mort cel·lular dependent d'autofàgia.....	44
1.3.3. Els lisosomes i el càncer.....	45
1.3.4. Autofàgia i càncer.....	47
1.3.5. El compartiment de reciclatge i el metabolisme lipídic en càncer.....	48
1.3.5.1. Fosfolipidosi.....	49
<b>1.4. La leucèmia limfoblàstica aguda</b> .....	<b>51</b>
1.4.1. Generalitats.....	51
1.4.2. La leucèmia limfoblàstica aguda T (LLA-T).....	52
1.4.3. Maduració de limfòcits T en el tim.....	52
1.4.4. Subgrups de LLA-T.....	54
1.4.5. Biologia de la malaltia.....	56
1.4.6. Tractament de LLA-T.....	59
1.4.7. Cèl·lules mare leucèmiques.....	60
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	<b>63</b>

<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Materials.....</b>	<b>69</b>
3.1.1. Línies i cultius cel·lulars.....	69
3.1.2. Mostres primàries.....	69
3.1.3. Compostos.....	70
3.1.4. Anticossos acoblats a fluoròfor.....	73
<b>3.2. Mètodes.....</b>	<b>74</b>
3.2.1. Generalitats i estadística.....	74
3.2.2. Estudis de supervivència i proliferació.....	75
3.2.2.1. Citotoxicitat.....	75
3.2.2.1.1. Càlcul de concentracions efectives mitjanes (EC <sub>50</sub> ) .....	75
3.2.2.2. Efecte citotòxic de combinació de compostos.....	76
3.2.2.3. Anàlisi de reversions de la citotoxicitat.....	76
3.2.2.4. Co-cultiu amb cèl·lules d'estroma.....	76
3.2.2.5. Assaig proliferació CFSE.....	76
3.2.2.6. Assaig del cicle cel·lular.....	77
3.2.3. Anàlisi d'expressió de proteïnes en superfície.....	77
3.2.3.1. Anàlisi d'expressió de DRD4 en superfície.....	77
3.2.4. Estudis de mort cel·lular i apoptosi.....	77
3.2.4.1. Tinció amb annexina V.....	77
3.2.4.2. Anàlisi de l'activació de caspases efectores.....	78
3.2.5. Estudi del compartiment autofàgic.....	78
3.2.6. Estudi del compartiment lisosomal.....	79
3.2.7. Estudi del compartiment mitocondrial.....	79
3.2.7.1. Anàlisi d'espècies reactives d'oxigen mitocondrials mitjançant MitoSOX.....	79
3.2.7.2. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial mitjançant Rodamina-123.....	80
3.2.8. Estudi dels lípids neutres cel·lulars.....	80
3.2.9. Estudi dels fosfolípids.....	80
3.2.10. Estudi de la fosfolipidosi.....	81
3.2.11. Assaig de clonogeneïtat.....	81
3.2.12. Estudis <i>in vivo</i> .....	82
3.2.12.1. Xenotransplantaments amb línies cel·lulars.....	82
3.2.12.2. Xenotransplantaments amb mostra PDX de LLA-T.....	82
3.2.12.3. Xenotransplantaments amb mostres de cordó umbilical de donant sa.....	83
3.2.13. Determinació de quantitat de proteïnes via <i>Western Blot</i> .....	84
3.2.14. Anàlisi bioinformàtics.....	84
3.2.14.1. <i>Screening Mind The Byte</i> .....	84
3.2.14.2. Array d'expressió gènica Clarion™ S.....	85

<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Resultats preliminars.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2. Estudi preclínic del potencial dels antidopaminèrgics tipus 4 en LLA-T.....</b>	<b>90</b>
4.2.1. Estudi citotòxic en línies cel·lulars de LLA-T.....	90
4.2.1.1. Interacció dels antagonistes de DRD4 amb els tractaments actuals....	95
4.2.2. Estudi citotòxic en cèl·lules de mostres primàries tumorals i sanes.....	98
4.2.3. Estudis preclínics <i>in vivo</i> .....	100
<b>4.3 Estudi de la diana antileucèmica.....</b>	<b>104</b>
4.3.1. Mecanisme dependent de DRD4.....	104
4.3.2. Identificació de dianes alternatives.....	107
<b>4.4. Estudi del mecanisme de mort cel·lular regulada.....</b>	<b>116</b>
4.4.1. Apoptosi.....	116
4.4.2. Mort cel·lular dependent d'autofàgia.....	121
4.4.2.1. Avaluació del compartiment lisosomal.....	129
<b>4.5. Estudi de la regulació de l'expressió gènica en resposta al tractament amb els antagonistes de DRD4.....</b>	<b>134</b>
<b>4.6. Estudi del metabolisme lipídic.....</b>	<b>137</b>
4.6.1. Estudi de l'expressió gènica del metabolisme lipídic amb el tractament dels antagonistes de DRD4.....	137
4.6.2. Estudi dels lípids neutres amb el tractament dels antagonistes de DRD4.....	138
4.6.3. Estudi dels fosfolípids amb el tractament dels antagonistes de DRD4.....	148
4.6.4. Estudi de la fosfolipidosi amb el tractament dels antagonistes de DRD4.....	151
<b>4.7. Cinètica dels efectes de L741-742 sobre els diferents compartiments cel·lulars.....</b>	<b>156</b>
<b>4.8 Estudi preclínic dels antagonistes de DRD4 en LMA.....</b>	<b>158</b>
4.8.1. Estudi del potencial citotòxic en línies cel·lulars de LMA.....	158
4.8.2. Estudi preclínic en mostres primàries en LMA.....	162
4.8.3. Estudi del mecanisme d'acció dels antagonistes de DRD4.....	162

<b>5. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>167</b>
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>187</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>191</b>
<b>8. ANNEXOS.....</b>	<b>215</b>
I. Taula de pacients de SMD, LMMC.....	217
II. Taula de pacients de LMA.....	221
III. Publicacions.....	222



## Llista de figures

<b>Figura 1.</b> Classificació estructures lipídiques en base a la possessió de àcids grassos a la seva estructura.....	21
<b>Figura 2.</b> Estructures lipídiques involucrades en reservori d'energia.....	22
<b>Figura 3.</b> Estructures lipídiques representatives constituents de membranes cel·lulars.....	22
<b>Figura 4.</b> Representació esquemàtica de les vies de síntesi i degradació d'àcids grassos...	27
<b>Figura 5.</b> Esquema representatiu d'estratègies proposades en la teràpia anti-cancer dirigida selectivament als peroxisomes.....	35
<b>Figura 6.</b> Esquematzació del procés d'autofàgia.....	43
<b>Figura 7.</b> Maduració cèl·lules T en el tim.....	54
<b>Figura 8.</b> Correlació de subgrups de LLA-T amb el desenvolupament tímic.....	56
<b>Figura 9.</b> Mostres primàries de SMD, LMMC i LMA expressen el receptor de dopamina tipus 1,2 i 4.....	89
<b>Figura 10.</b> Efecte antileucèmic dels agonistes i antagonistes del receptor de dopamina en línies cel·lulars de LLA-T.....	91
<b>Figura 11.</b> Els antagonistes de DRD4 tenen efectes antileucèmics al rang micromolar.....	92
<b>Figura 12.</b> Els antagonistes de DRD4 disminueixen la proliferació de les línies cel·lulars de LLA-T.....	93
<b>Figura 13.</b> Els antagonistes DRD4 no indueixen canvis importants en el cicle cel·lular.....	94
<b>Figura 14.</b> L'estroma reverteix els efectes dels antagonistes de DRD4 .....	95
<b>Figura 15.</b> Els antagonistes DRD4 no tenen efecte sensibilitzador a la prednisona .....	97
<b>Figura 16.</b> Els antagonistes DRD4 mostren sinergisme amb vincristina .....	98
<b>Figura 17.</b> Els antagonistes del DRD4 mostren efecte antileucèmic ex vivo.....	99
<b>Figura 18.</b> Els antagonistes del DRD4 no afecten les cèl·lules hematopoètiques sanes.....	100
<b>Figura 19.</b> Els antagonistes de DRD4 afecten selectivament a les cèl·lules leucèmiques in vivo.....	102
<b>Figura 20.</b> Els antagonistes de DRD4 no són efectius en experiments in vivo amb Jurkat..	103
<b>Figura 21.</b> Les línies cel·lulars de LLA-T i PDX de LLA-T no expressen el receptor de DRD4.....	105
<b>Figura 22.</b> La dopamina no reverteix els efectes dels antagonistes de DRD4.....	105
<b>Figura 23.</b> Les línies cel·lulars de LMA expressen el DRD4 i els antagonistes presenten efecte citotòxic.....	106
<b>Figura 24.</b> Cribratge de les potencials dianes predites per <i>Mind The Byte</i> .....	108
<b>Figura 25.</b> Els antagonistes del receptor de glutamat no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.....	110

<b>Figura 26.</b> Els inhibidors de l'acetilcolinesterasa no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.....	112
<b>Figura 27.</b> Els antagonistes del receptor opioide $\mu$ no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.....	113
<b>Figura 28.</b> El receptor sigma non-opioide no és la diana molecular.....	115
<b>Figura 29.</b> Els antagonistes de DRD4 no indueixen l'expressió d'annexina V.....	117
<b>Figura 30.</b> Els antagonistes de DRD4 no indueixen una activació de caspases efectores a les 6h i 24h.....	118
<b>Figura 31.</b> Els antagonistes de DRD4 no indueixen una acumulació de mitROS.....	119
<b>Figura 32.</b> L741-742 no indueix una pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial.....	120
<b>Figura 33.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autofàgic.....	122
<b>Figura 34.</b> Antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autofàgic en PDX LLA-T.....	123
<b>Figura 35.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del marcador autofàgic LC3B.II en LL-T.....	124
<b>Figura 36.</b> El tractament amb L741-742 indueix un augment en el compartiment autofàgic.....	126
<b>Figura 37.</b> 3-MA reverteix els efectes citotòxics i sobre el compartiment autofàgic dels antagonistes de DRD4.....	127
<b>Figura 38.</b> 3-MA reverteix la formació d'autofagosomes.....	129
<b>Figura 39.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment de la massa lisosomal.....	130
<b>Figura 40.</b> El tractament amb L741-742 indueix un augment en el compartiment lisosomal.....	132
<b>Figura 41.</b> L741-742 indueix un augment del compartiment autofàgic i lisosomal.....	133
<b>Figura 42.</b> L741-742 indueix un augment del compartiment autofàgic i lisosomal.....	134
<b>Figura 43.</b> L741-742 indueix un augment dels lípids neutres a nivell cel·lular .....	139
<b>Figura 44.</b> L741-742 indueix un augment del contingut lipídic total de la cèl·lula.....	141
<b>Figura 45.</b> El tractament amb l741-742 indueix un increment de la massa lisosomal així com de vesícules lipídiques.....	143
<b>Figura 46.</b> DEUP indueix un augment dels lípids neutres cel·lulars.....	144
<b>Figura 47.</b> DEUP indueix un augment del contingut lipídic total de la cèl·lula.....	145
<b>Figura 48.</b> DEUP presenta efectes citotòxics en Jurkat a més de 50 $\mu$ M.....	146
<b>Figura 49.</b> L742-742 presenta efecte sinèrgic amb DEUP.....	146
<b>Figura 50.</b> DEUP i L741-742 presenten efecte sinèrgic sobre la viabilitat cel·lular.....	147

<b>Figura 51.</b> El tractament amb etomoxir no incrementa el contingut lipídic total cel·lular.....	148
<b>Figura 52.</b> L741-742 indueix una disminució dels fosfolípids cel·lulars.....	149
<b>Figura 53.</b> L741-742 indueix la formació de vesícules de fosfolípids cel·lulars.....	150
<b>Figura 54.</b> L741-742 indueix la generació de vesícules de fosfolípids que co-localitzen amb els lisosomes.....	151
<b>Figura 55.</b> L741-742 indueix la fosfolipidosi a les primeres 6h de tractament.....	152
<b>Figura 56.</b> L741-742 indueix la fosfolipidosi via microscòpia de fluorescència.....	154
<b>Figura 57.</b> $\alpha$ -tocoferol reverteix l'efecte citotòxic de L741-742.....	155
<b>Figura 58.</b> $\alpha$ -tocoferol no reverteix la inducció de la fosfolipidosi .....	156
<b>Figura 59.</b> Cinètica d'esdeveniments observats després del tractament amb L741-742.....	157
<b>Figura 60.</b> Els antagonistes de DRD4 tenen efecte antileucèmic en LMA.....	159
<b>Figura 61.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen la diferenciació de línies cel·lulars de LMA.....	160
<b>Figura 62.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen canvis en el cicle cel·lular de LMA .....	161
<b>Figura 63.</b> Els antagonistes de DRD4 redueixen la capacitat clonogènica de línies cel·lulars de LMA.....	162
<b>Figura 64.</b> Els antagonistes de DRD4 mostren efectes antileucèmics ex vivo en LMA.....	162
<b>Figura 65.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autogàgic en LMA.....	163
<b>Figura 66.</b> Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment lleu del compartiment lisosomal en LMA.....	164
<b>Figura 67.</b> Estructura química dels antagonistes de DRD4 estudiats.....	177
<b>Figura 68.</b> Bases del model de predicció de la inducció de la fosfolipidosi.....	178
<b>Figura 69.</b> Els antagonistes de DRD4 són CADs inductor de la fosfolipidosi.....	178
<b>Figura 70.</b> Model proposat per a l'efecte dels antagonistes de DRD4.....	186

## **Llista de taules:**

<b>Taula 1.</b> Llistat de compostos inhibidors de la síntesi lipídica.....	31
<b>Taula 2.</b> Compostos inhibidors específics de SCD1.....	32
<b>Taula 3.</b> Llistat de compostos inhibidors de CPT1.....	34
<b>Taula 4.</b> Compostos amb efecte antitumoral amb mecanismes d'acció vinculat amb el microambient tumoral.....	37
<b>Taula 5.</b> Informació de les línies cel·lulars.....	69
<b>Taula 6.</b> Relació de compostos emprats. ....	73
<b>Taula 7.</b> Informació dels anticossos de marcadors humans.....	73
<b>Taula 8.</b> Llistat d'anticossos emprats per a Western Blot.....	74
<b>Taula 9.</b> Llista de dianes coincidents en l' <i>screening</i> de <i>Ming The byte</i> .....	109
<b>Taula 10.</b> Gens amb canvis d'expressió substancials en resposta al tractament.....	136
<b>Taula 11.</b> Gens amb implicació en el metabolisme lipídic sobreexpressants o reprimits en resposta al tractament amb els antagonistes de DRD4.....	138



# **1. Introducció**



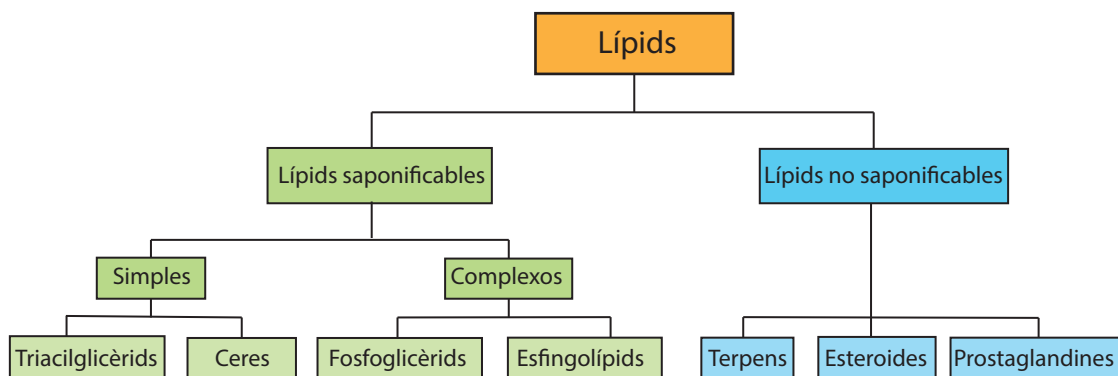
## 1.1. Homeòstasi lipídica

### 1.1.1. El metabolisme lipídic

Els lípids constitueixen una de les grans famílies de biomolècules orgàniques, duent a terme múltiples funcions imprescindibles per a la vida. Bona mostra d'aquesta rellevància biològica és el fet que aproximadament un cinc per cent dels gens d'una cèl·lula eucariota estan implicats en la síntesi lipídica. La gran diversitat estructural dels lípids, (la cèl·lula es capaç de reconèixer fins a 1000 tipus de lípids diferents amb exquisida especificitat) convergeix en una característica química comuna: la seva insolubilitat en aigua i solubilitat en dissolvents apolars com el cloroform o l'èter (D. L. Nelson and Cox 2009).

### 1.1.2. Classificació lípids

La gran multitud d'estructures lipídiques es poden classificar atenent a múltiples criteris, en aquest cas s'ha fet servir la classificació en base a la possessió d'àcids grassos a la seva estructura, o el que seria el mateix, saponificables o no-saponificables (Figura 1) (D. L. Nelson and Cox 2009).



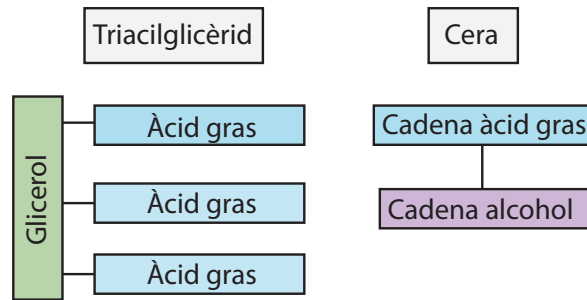
**Figura 1. Classificació estructures lipídiques en base a la possessió de àcids grassos a la seva estructura.**

### 1.1.3. Funcions cel·lulars lipídiques:

Malgrat la gran diversitat d'estructures que conformen la família lipídica, les funcions que duen a terme a nivell cel·lular i sistèmic es poden resumir en tres branques principals:

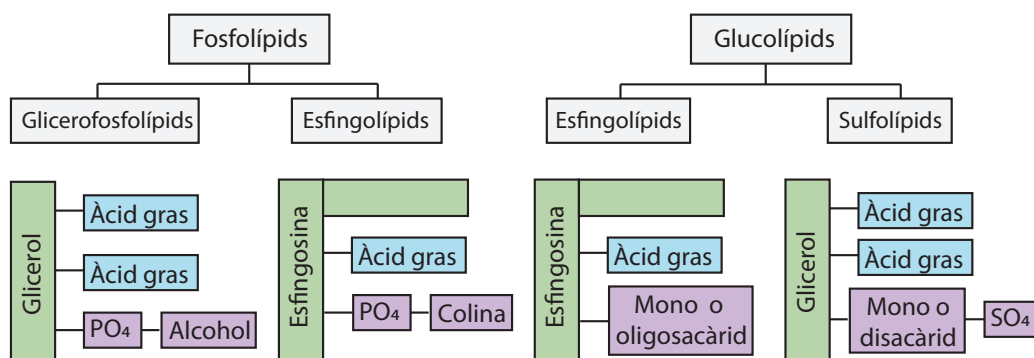


**Reservori d'energia cel·lular:** Es tracta d'una funció duta a terme fonamentalment pels TAG (triacilglicerol). En certs contextos que tractarem més endavant, aquests poden acumular-se formant estructures conegudes com *lipid droplets*. Aquestes estructures es formen principalment en adipòcits i hepatòcits i actuen com a reservori quan el sistema presenta un dèficit energètic, traslladant els àcids grassos al teixit que els requereixin. (Figura 2) (Alberts et al. 2010; D. L. Nelson and Cox 2009).



**Figura 2. Estructures lípídiques involucrades en reservori d'energia**

**Components estructurals de les membranes:** Alguns lípids, principalment fosfolípids i glucolípidos formen bicapes lípídiques que constitueixen els components majoritaris de les membranes biològiques. Aquests lípids de membrana representen aproximadament un 10% de la massa seca de molts tipus cel·lulars posant de manifest el seu paper clau en les estructures cel·lulars. Els fosfolípids i glucolípidos són algunes de les estructures polars més comunes que duen a terme aquesta funció (Figura 3) (Alberts et al. 2010; D. L. Nelson and Cox 2009).



**Figura 3. Estructures lípídiques representatives constituents de membranes cel·lulars**

Per a la rellevància d'aquest treball, és important recalcar els elements constituents de les membranes cel·lulars. Els fosfolípids, els esfingolípids i el colesterol són els tres elements estructurals bàsics. Cadascun d'ells aporta propietats físiques claus a les bicapes lipídiques. El grau de fluïdesa de la membrana el determina la presència de colesterol i els esfingolípids determinen la hidrofobicitat. Existeixen cinc tipus de fosfolípids que conformen les membranes, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) i fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) i cardiolipina. La organització entre els subtipus en la part externa i interna és clau per a generar la asimetria de la membrana fosfolipídica. Conjuntament amb la part lipídica de les membranes, aquestes també contenen elements proteics (Escribá et al. 2008; Van Meer, Voelker, and Feigenson 2008a).

**Lípids com senyals o cofactors:** Contràriament a les dues funcions anteriors, de naturalesa més passiva i estructural, aquesta funció dels lípids suposa un rol actiu en la senyalització cel·lular. En aquesta categoria els components són minoritaris però duen a terme una funció més activa en el trànsit metabòlic així com sent metabòlits o missatgers en si. Entre d'altres, duen a terme aquesta funció són hormones transportades pel flux sanguini d'un teixit a un altre, missatgers intracel·lulars generats en resposta a un senyal extracel·lular (factors de creixement) o cofactors enzimàtics en reaccions de transferència d'electrons. (Baenke et al. 2013; Holthuis and Menon 2014; Van Meer, Voelker, and Feigenson 2008b).

#### **1.1.4. Vies del metabolisme lipídic**

Dins de les múltiples vies involucrades en el metabolisme lipídic, n'hi ha dues que sobresurten com a nodes principals: degradació d'àcids grassos per a generar energia a través de la lipòlisi seguida de la  $\beta$ -oxidació o fermentació i la síntesi de reserves energètiques a través de la lipogènesi (D. L. Nelson and Cox 2009).

#### 1.1.4.1. Degradació d'àcids grassos

Les cèl·lules poden obtenir àcids grassos combustibles a partir de tres fons principals: greixos consumits a la dieta, greixos emmagatzemats en cèl·lules en forma de *lipid droplet* i greixos sintetitzades en un òrgan i que s'exporten a un altre. La utilització dels àcids grassos per a la producció d'energia varia enormement en funció del teixit i de l'estat metabòlic. En condicions de falta d'energia metabòlica la cèl·lula inicia el procés anomenat lipòlisi en què obté energia a través de la degradació d'àcids grassos. En el cas de la utilització dels TAG obtinguts de la dieta, el primer pas és el trencament de l'estructura separant els àcids grassos (3 cadenes per molècula de TAG) del glicerol. Si els TAG utilitzats són aquells emmagatzemats en forma de *lipid droplet*, existeix una mobilització prèvia a través de l'acció hormonal: adrenalina i glucagó senyalitzen al corrent sanguini nivells baixos de glucosa i subseqüentment s'activen les lipases sensibles a l'acció hormonal que hidrolitzen els TAG emmagatzemats alliberant molècules d'àcid gras (D. L. Nelson and Cox 2009).

En la degradació dels TAG a àcids grassos es requereix l'acció de tres enzims consecutius: ATGL catalitza el pas inicial de la lipòlisi, convertint els TAG en DAG (diacilglicerol); HSL (de les sigles en anglès, *hormone sensitive lipase*) responsable de la hidròlisi dels DAG a monoacilglicerols (MAG) i finalment la MG lipasa (MGL) que hidrolitza els MAG (D. L. Nelson and Cox 2009).

Els àcids grassos arribats a aquest punt poden seguir dues rutes oxidatives en funció de la disponibilitat d'oxigen: la  $\beta$ -oxidació (presència d'oxigen) i la fermentació (absència d'oxigen).

En la  $\beta$ -oxidació, l'àcid gras de partida pateix la conversió a acilgras-CoA a través de l'acció de l'acilgras-CoA sintasa i la pirofosfat hidrolasa a l'espai citoplasmàtic. Un cop generat l'acilgras-CoA actiu aquest és transportat a l'interior del mitocondri a través del transportador específic d'acil/carnitina (CPTI-II). A la matriu mitocondrial s'inicia la  $\beta$ -oxidació que es divideix en tres fases:

- Primera fase ( $\beta$ -oxidació): Els àcids grassos experimenten l'eliminació oxidativa d'unitats successives de dos àtoms de carboni en forma d'acetil-

CoA. La formació de cada acetil-CoA requereix l'eliminació de quatre àtoms d'hidrogen, o el que és el mateix, dos parells d'electrons i quatre H<sup>+</sup>.

- Segona fase (Cicle àcid cítric): Els grups acetil-CoA generats en la fase anterior s'oxiden a CO<sub>2</sub> a través del cicle de l'àcid cítric (TCA per les seves sigles en anglès) que també té lloc a la matriu mitocondrial. En aquesta fase com també en l'anterior, l'oxidació d'àcids grassos genera transportadors electrònics reduïts NADH i FADH<sub>2</sub> que esdevindran crucials en la tercera fase del procés

- Tercera fase (Respiració): En aquesta fase els electrons generats en les dues fases anteriors així com els electrons cedits per NADH i FADH<sub>2</sub> entren a la cadena respiratòria mitocondrial a través de la qual es transporten els electrons cap a l'oxigen, amb la concomitant fosforilació de l'ADP a ATP. D'aquesta manera l'energia alliberada a l'oxidar els àcids grassos es conserva en forma d'ATP (Delvin 2011; D. L. Nelson and Cox 2009).

Paral·lelament al mitocondri, els peroxisomes són també orgànuls encarregats de l'oxidació de lípids, especialment àcids grassos de cadenes llargues (VLCFA's de les seves sigles en anglès) o àcids grassos ramificats amb grups metil via  $\alpha$ - $\beta$  oxidació (Niemann and Rohrbach 2016). Els peroxisomes presenten unes proteïnes associades anomenades peroxines (PEX) que estan implicades en la biosíntesi de l'orgànul, en el transport d'enzims en el seu interior i en el correcte funcionament i interacció amb el mitocondri (Cai et al. 2018).

En condicions de dèficit d'oxigen, la cèl·lula inicia el procés fermentatiu, en el que també obté ATP però amb menys eficiència. Existeixen molts tipus de fermentació i reben el nom del producte generat en major quantitat: alcohòlica, làctica, acètica. La característica principal d'aquestes vies metabòliques de degradació és que tant les substàncies oxidades com els mateixos oxidants són composts orgànics que s'originen durant el procés, a partir del substrat orgànic inicial (Alberts et al. 2010; D. L. Nelson and Cox 2009).

#### 1.1.4.2. Síntesi d'àcids grassos

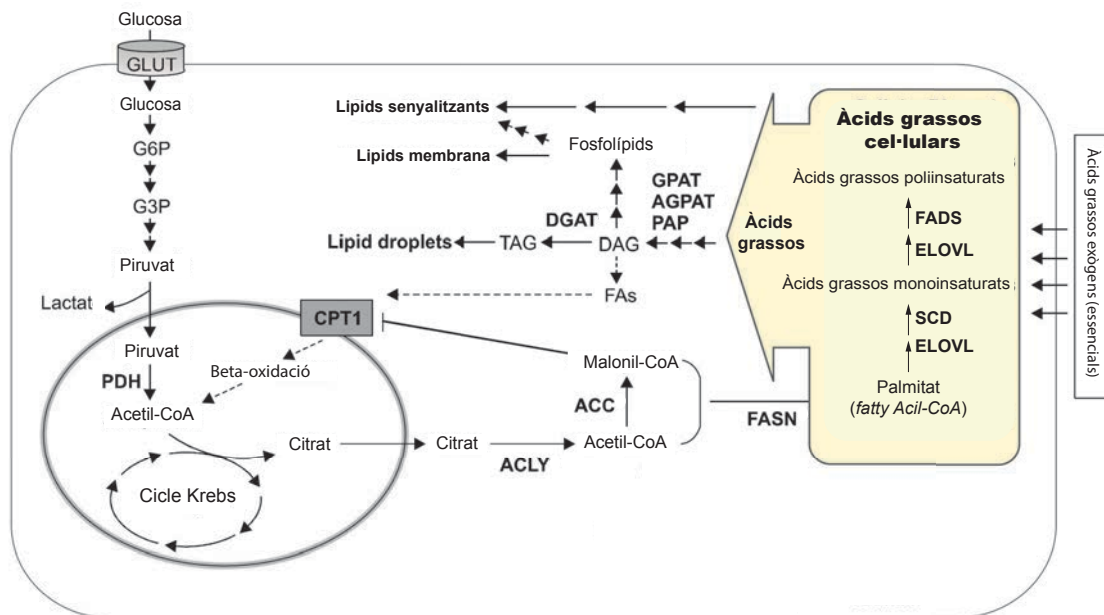
Quan una cèl·lula o organisme disposa de més combustible metabòlic del requerit per a les seves necessitats energètiques, l'excés es converteix generalment en àcids grassos que s'emmagatzemen en forma de lípids tals com TAG en *lipid droplets* un procés conegut com a lipogènesi. En el cicle de l'àcid cítric es produeix un excés de citrat que és exportat al citoplasma i posteriorment transformat a acetil-CoA per l'acció de l'enzim ATP-citrat liasa (ACLY per les sigles angleses). L'acumulació d'acetil-CoA activa a continuació un reguitzell d'enzims el primer dels quals està implicat en la transformació d'acetil-CoA a malonil-CoA. Aquest primer pas és limitant en la velocitat de biosíntesi dels àcids grassos i està catalitzat per l'enzim acetil-CoA carboxilasa (ACC). La presència de malonil-CoA, ahora, actua com a regulador negatiu del transport d'àcids grassos al mitocondri per a la seva oxidació. Aquest precursor, conjuntament amb l'acetil-CoA és utilitzat com a substrat per a la síntesi de palmitat, l'estructura de la qual es parteix en la producció d'àcids grassos. L'àcid gras sintasa (FASN de les seves sigles en anglès) és un enzim clau implicat en aquest procés de síntesi, i el palmitat és el seu producte principal (Alberts et al. 2010; Delvin 2011; D. L. Nelson and Cox 2009). El palmitat però, pot ser allargat o fins i tot generar àcids grassos saturats mitjançant la successiva addició de grups acetil a través de l'acció d'enzims de la família d'enzims de les elongases en la que resulten especialment rellevants l'estearoïl-CoA desaturasa (SCD per les seves sigles en anglès) i família d'enzims d'allargament de cadenes llargues d'àcids grassos (ELOVL de les seves sigles en anglès) (Jakobsson, Westerberg, and Jacobsson 2006). Els àcids grassos generats amb ampli espectre de saturació i llargada són convertits a TAG per la creació de *lipid droplets* a través de la via del glicerol-3-fosfat. En aquesta via tenen especial importància els enzims glicerol-3-fosfat aciltransferasa (GPAT sigles angleses), l' acilglicerol fosfat acil transferasa (AGPAT de les seves sigles en anglès), l' àcid fosfatídic fosfatasa (PAP de les sigles en anglès) i la diacilglicerol acil transferasa (DGAT de les sigles angleses)(H. Wang, Airola, and Reue 2017).

Els *lipid droplets* (LD) són estructures intracel·lulars citoplasmàtiques, que consisteixen en un reservori d'àcids grassos. El contingut del LD és generalment TAG, esterols i colesterol, i està envoltat per una monocapa fosfolipídica en la que

s'hi troben enganxades proteïnes específiques anomenades perilipines (PLINs de les sigles angleses) (Thiele and Spandl 2008).

La generació dels LD respon a les necessitats cel·lulars. Grans quantitats de TAG i esterols acumulats en l'espai de la membrana del reticle endoplasmàtic (RE), impulsa la síntesis *de novo* del *lipid droplet*. Quan suficients lípids s'han acumulat en el LD naixent, aquest s'escindeix de la membrana de RE i es alliberat al citosol. La connexió però, entre LD i RE, no es trenca del tot, ambdós segueixen connectats, el que permet una transferència bidireccional del contingut lipídic (Thiam, Farese, and Walther 2013). El LD és un orgànul dinàmic ja que durant la seva generació, part de la maquinària li es transferida, permetent-li així la possibilitat de creixement, fusió o fissió en funció de les necessitats cel·lulars (Petan, Jarc, and Jusović 2018).

Un esquema representatiu de la via de síntesi englobant els precursors claus, així com els enzims implicats en la seva síntesi, degradació o transformació es pot trobar a la Figura 4.



**Figura 4. Representació esquemàtica de les vies de síntesi i degradació d'àcids grassos.** Adaptat de (Cha and Lee 2017).

## 1.2. La reprogramació lipídica en càncer

El metabolisme ha estat durant el darrer segle un procés àmpliament estudiat en relació al càncer, i s'ha establert la noció que en les cèl·lules tumorals es produeix una reprogramació d'aquest. La fita fundacional d'aquest camp d'estudi la va establir Otto Warburg quan l'any 1920 va descriure l'efecte Warburg. Aquest, descriu l'increment en el metabolisme de la glucosa en les cèl·lules tumorals, així com la utilització de la via comunament anomenada glicòlisi anaeròbica malgrat la presència d'oxigen. Avui en dia, es considera que l'efecte Warburg és només la punta de l'iceberg d'un procés extremadament complex que permet a les cèl·lules tumorals adquirir l'estat metabòlic ideal per a la proliferació i manteniment de la malaltia. Aquesta idealisme metabòlic en càncer, inclou la perversió de la glicòlisi usant intermediaris com la fructosa-6-fosfat a través de la via de les pentoses-6-fosfat (PPP de les seves sigles en anglès), la fructosa-6-fosfat, dihidroxiacetona fosfat entre molts d'altres per a la generació de grans quantitats de subproductes cel·lulars de gran rellevància per la proliferació tumoral (Heiden et al. 2009; Intlekofer et al. 2015; Pavlova and Thompson 2016; Spiro 2002; Wellen et al. 2010).

Les desregulacions en el metabolisme tumoral, conjuntament amb una novena d'alteracions fonamentals més, són les característiques bàsiques que defineixen la cèl·lula tumoral. Aquesta desena d'alteracions són conegudes com *hallmarks of cancer* (Hanahan and Weinberg 2000, 2011). En la seva darrera revisió dels *hallmarks of cancer*, el Dr. Hanahan i Dr. Weinberg, van incloure-hi la desregulació del metabolisme (Hanahan and Weinberg 2011). Aquesta nova incorporació al panteó dels *hallmarks* ha desencadenat un gran interès en la comunitat científica, i ha portat a la minuciosa caracterització de les múltiples alteracions en el metabolisme de la cèl·lula tumoral, que en última instància es poden resumir en sis trets fonamentals: Absorció desregulada de glucosa i aminoàcids, ús de mètodes oportunistes d'obtenció de nutrients, ús d'intermediaris de la glicòlisi/cicle TCA per la biosíntesi i producció NADPH, increment en la demanda de nitrogen, alteració en regulació de gens impulsats per metabòlits aberrants i interaccions metabòliques amb el microambient (Pavlova and Thompson 2016).

En apartats anteriors s'ha aprofundit en el metabolisme lipídic i la via de degradació i síntesi lipídica com a nodes principals d'aquest. En càncer, la reprogramació del metabolisme lipídic que pateix la cèl·lula tumoral, afecta en les vies principals del metabolisme (síntesi i degradació), així com també en el transport dels mateixos i en la composició lipídica dels teixits.

### **1.2.1. Síntesi lipídica en càncer**

A mitjan del segle passat, Medes, Thomas i Weinhouse, van demostrar la capacitat dels teixits tumorals de generar lípids incloent àcids grassos i fosfolípids a través de la lipogènesi *de novo* (Medes, Thomas, and Weinhouse 1953). En cèl·lules sanes, aquest procés de síntesi lipídica és exclusiu del teixit hepàtic, adipós, mamari durant l'alletament i del desenvolupament embrionari. A diferència de les cèl·lules normals, la síntesi *de novo* d'àcids grassos pot representar més del 93% dels TAG en les cèl·lules tumorals (Menendez and Lupu 2007). Aquesta lipogènesi exacerbada de les cèl·lules tumorals s'aconsegueix amb el segrest i sobreactivació de la via de síntesi lipídica, que a efectes pràctics, es reflexa en un augment significatiu de diversos enzims lipogènics (Menendez and Lupu 2007). Enzims claus d'aquesta via lipídica, tals com ACLY, ACC, SCD i FASN presenten sobreexpressió en múltiples tipus de càncer (Flavin 2010; Omabe, Ezeani, and Omabe 2015; Röhrig and Schulze 2016).

Conjuntament amb els productes enzimàtics, també s'ha estudiat la importància dels factors de transcripció responsables. SREBP és el factor de transcripció que respon a les vies metabòliques reguladores de l'homeòstasi lipídica, que al seu torn regulen l'expressió gènica d'ACC, FASN i ACLY. La hiperactivació d'aquest factor ha estat relacionada amb l'afavoriment del programa lipogènic associat al creixement tumoral i metastasi. (M. Chen et al. 2018; Guo et al. 2014; Nickels 2018).

La inhibició o silenciament dels productes enzimàtics anteriorment esmentats, així com l'activitat dels factors de transcripció, s'ha demostrat en nombrosos estudis que redueix el creixement de les cèl·lules tumorals en múltiples tipus de càncer. Estudis precedents en la literatura es troben recollits a la Taula 1.



**DIANA COMPOST MODEL EFECTE REF**  
**PRE-CLÍNIC**

<b>FASN</b>	<b>COMPOST</b>	<b>MODEL</b>	<b>EFECTE</b>	<b>REF</b>
	Cerulenina	Línies cel·lulars càncer ovari i mama i xenotrans- plantaments	Inhibició proliferació, inducció apoptosi, inhibició creixement tumoral.	(Flavin 2010; Pizer, Jackisch, et al. 1996; Pizer, Wood, et al. 1996)
	Orlistat	Línies cel·lulars càncer pròstata i melanoma i xenotrans- plantaments.	Inducció apoptosi, inhibició creixement tumoral, inhibició de metàstasi (melanoma).	(Kridel et al. 2004; Schcolnik- Cabrera et al. 2018)
	C75	Línies cel·lulars càncer colon	Inhibició replicació DNA i inducció apoptosi.	(J. N. Li et al. 2001)
		Línies cel·lulars càncer mama, ovari, estómac, pròstata i xenotrans- plantaments	Acumulació de malonil-CoA i inhibició del creixement tumoral (mama i pròstata).	(H. W. Chen et al. 2012; Flavin 2010; Pizer et al. 2000; W. Zhou et al. 2003)
	Triclosan	Línies cel·lulars càncer pròstata	Inducció apoptosi i inducció senescència.	(C. C. Nelson et al. 2015; Phan, Yeung, and Lee 2014)
	C93	Línies cel·lulars càncer ovari i estómac i xenotrans- plantaments	Citotoxicitat, activació AMPK, inhibició creixement tumoral	(Flavin 2010; Medghalchi et al. 2007; Vadlamudi et al. 2007)
	FAS31	Xenotrans- plantaments càncer ovari	Reducció tumoral.	(Flavin 2010)
	C247	Càncer mama model animal. Línies cel·lulars càncer estómac i xenotrans- plantaments	Quimioprevenió (mama), inhibició proliferació cel·lular i reducció del creixement tumoral.	(Alli et al. 2005)

	Resveratrol	Assaig clínic fase I	Reducció creixement tumoral.	(Berman et al. 2017)
<b>ACLY</b>	SB-204990	Línies cel·lulars càncer estómac, pròstata, ovari i xenotrans-plantaments	Inhibició creixement tumoral en cèl·lules dependents del metabolisme glicolític.	(Migita et al. 2008; Thompson et al. 2005)
<b>ACC</b>	TOFA	Línies cel·lulars càncer estómac, còlon i mama	Inducció apoptosi.	(C. Wang et al. 2009)
	Soraphen A	Línies cel·lulars càncer pròstata	Inducció apoptosi.	(Beckers et al. 2007)
<b>SREBP</b>	Fatostatina	Línies cel·lulars càncer pròstata i xenotrans-plantaments	Inhibició proliferació. Efecte citotòxic sinèrgic amb quimioteràpia	(X. Li et al. 2014; Xiangyan Li et al. 2015)
	Betulina	Múltiples línies cel·lulars canceroses	Inhibició de proliferació	(Król et al. 2015)

**Taula 1. Llistat de compostos inhibidors de la síntesi lipídica.** Diances moleculars actuant sobre enzims claus (FASN, ACLY, ACC) i elements reguladors (SREBP) actualment estudiats pel tractament del càncer.

Alguns dels compostos esmentats anteriorment estan aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*) tals com Orlistat o bé Resveratrol. En el cas d'aquest últim, s'estan duent a terme assajos clínics en càncer de colon (NCT00920803, fase I), càncer de còlon i recte (NCT00433576, fase I) i càncer de colon (NCT00578396, fase I). Actualment no es disposa de dades dels resultats dels diferents assajos clínics que estan en marxa.

Paral·lelament al bloqueig de la síntesi d'àcids grassos, un altre procés que ha rebut atenció com a possible diana terapèutica, és el procés d'elongació i dessaturació dels àcids grassos. En aquesta procés l'enzim que ha rebut més atenció es el SCD. Nombrosos inhibidors específics de SCD1 han demostrat efecte en diferents models de càncer, alguns dels més rellevants estan recollits a la Taula 2.

DIANA	COMPOST	MODEL PRE-CLÍNIC	EFFECTE	REF
<b>SCD1</b>	BZ36	Línies cel·lulars càncer pròstata i xeno- transplantaments	Reducció creixement tumoral i remissió completa en model animal	(Fritz et al. 2010)
	A939572	Línies cel·lulars càncer pròstata i mama. Xeno- transplantaments de càncer pròstata i gàstric.	Reducció creixement tumoral i efecte citotòxic sinèrgic amb quimioteràpia	(Roemeling et al. 2013)
	MF-438	Línies cel·lulars de càncer de estómac i xeno- transplantaments	Inducció apoptosi, reducció del creixement tumoral, reverteix resistència a quimioteràpia	(Elena et al. 2017; Noto et al. 2013)
	T-3764518	Línies cel·lulars càncer colorectal	Inducció apoptosi, reducció creixement tumoral, alteració composició lipídica tumoral	(Nishizawa et al. 2017)
	PluriSin#1	Cèl·lules mare pluripotents induïdes derivades a cardiomiòcits i xeno- transplantaments	Inducció apoptosi, alteració expressió genètica associada progressió tumoral	(Lan Zhang et al. 2014)

**Taula 2. Compostos inhibidors específics de SCD1.**

### 1.2.2. Degradació lipídica en càncer

Com s'ha detallat a l'apartat anterior, en càncer, la lipogènesi *de novo* està sobreactivada. D'aquesta manera, les cèl·lules canceroses aconsegueixen generar grans quantitats d'estructures lipídiques bé sigui per a la proliferació o per reservori energètic. Aquesta sobreactivació en la síntesi però, cal compensar-la amb mecanismes lipolítics complementaris. L'equilibri entre síntesi i degradació permet

a les cèl·lules modelar el contingut lipídic cel·lular (Gómez de Cedrón and Ramírez de Molina 2016).

La degradació lipídica en càncer, a banda del seu paper compensatori en relació amb la síntesi, és una via crucial en el metabolisme lipídic a través de la qual la cèl·lula obté energia. En apartats anteriors s'ha explicat la oxidació dels àcids grassos com a via d'obtenció d'energia cel·lular més rentable. En càncer, els elevats requeriments energètics i la necessitat imperiosa de proliferació cel·lular, han pervertit el procés d'oxidació dels àcids grassos. (Carracedo, Cantley, and Pandolfi 2013).

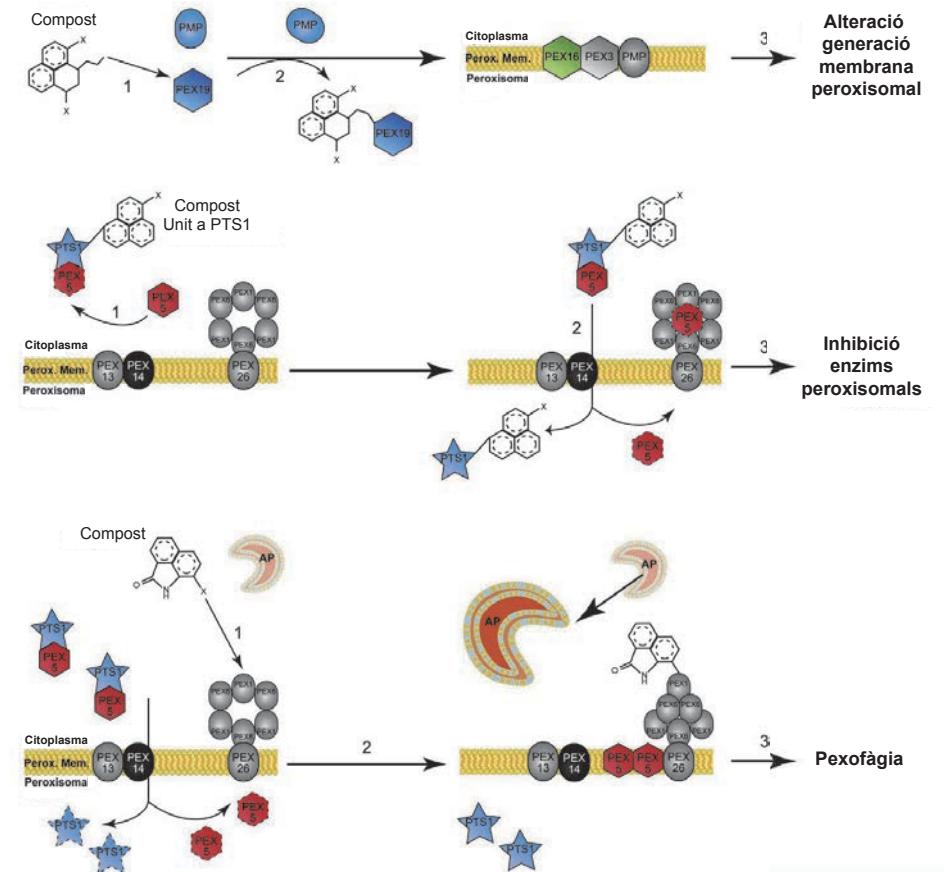
La sobreexpressió de CPT-1 incrementa el volum d'oxidació cel·lular, afavorint així la producció d'ATP i NADPH que, al seu torn, protegeixen la cèl·lula tumoral en ambients d'estrès tals com en condicions de privació de glucosa o oxigen (Q. Qu et al. 2016). Nombrosos estudis han demostrat la sobreexpressió de CPT-1 en múltiples models càncer, i s'ha relacionat amb la progressió tumoral en càncer de mama (Gatza et al. 2014), estómac (Zaugg et al. 2011), pròstata (Schlaepfer et al. 2014) , ovari (Roy et al. 2014), fetge (Rodríguez-enríquez et al. 2015) i cerebral (Wakamiya et al. 2014) entre altres. Aquesta sobreexpressió de CPT-1 en el context tumoral és crucial per a la viabilitat cel·lular. S'ha demostrat que la inhibició selectiva redueix la progressió tumoral en nombrosos càncers Taula 3.

<b>DIANA</b>	<b>COMPOST</b>	<b>MODEL</b>	<b>EFFECTE</b>	<b>REF</b>
<b>PRE-CLÍNIC</b>				
<b>CPT-1</b>	Etomoxir	Línies cel·lulars leucèmia, mieloma, pròstata	Inhibició proliferació, sensibilització a la quimioteràpia	(Q. Qu et al. 2016)
	ST1326	Línies cel·lulars limfoma, leucèmia	Inhibició proliferació, inducció apoptosi	(Q. Qu et al. 2016)
	Perhexilina	Leucèmia i xenotransplantaments	Reducció viabilitat, reducció creixement tumoral	(P. P. Liu et al. 2016)
	Ranolazine	Línies cel·lulars limfoma i leucèmia	Reducció viabilitat, sensibilització a la quimioteràpia	(Samudio, Taegtmeier, and Andreeff 2010)

### **Taula 3. Llistat de compostos inhibidors de CPT1.**

Com orgànul implicat en l'oxidació d'àcids grassos que també cal remarcar els peroxisomes i les desregulacions presents en càncer. Estudis previs han demostrat que peroxines com per exemple la PEX2 són vitals pel creixement tumoral en carcinoma hepàtic i que un silenciament total de la PEX2 porta associat un increment oxidatiu que acaba amb la mort cel·lular (Cai et al. 2018). També s'ha demostrat que enzims digestius associats a la  $\beta$ -oxidació tals com AMACR, es troben sobreexpressats en múltiples càncers tals com mama, colorectal, pròstata o melanoma (Benjamin et al. 2013; Shukla 2017; Witkiewicz et al. 2005).

En peroxisomes avui en dia no es disposa de compostos específics amb acció inhibidora o reguladora específica sobre una diana concreta. Malgrat això, Dahabieh et al., 2018, han identificat possibles dianes terapèutiques sobre les què actuar en el peroxisoma i sobre les quals caldria dissenyar futurs compostos, per atacar selectivament els peroxisomes en el tractament del càncer. Algunes de les dianes proposades són: el bloqueig de la interacció entre PEX19-PMP (proteïna de membrana peroxisomal); el bloqueig del reconeixement entre PEX5-PTS1 (de les seves sigles en anglès, *peroxisome targeting signal 1*); la inhibició de la AAA ATPasa. En la primera estratègia proposada, el bloqueig de PEX19-PMP, s'aconseguiria una incorrecta biogènesi del peroxisoma, ja que la PEX19 és una de les peroxines encarregades de transportar PMP a la membrana peroxisomal per la seva correcta generació. En la segona estratègia, el que pretén atacar-se és el correcte funcionament de l'enzim PTS1. En aquest cas la PEX5 està implicada en el reconeixement de PTS1 i el seu transport a l'interior del peroxisoma. En aquest cas caldria dissenyar un compost que s'uniria selectivament a PTS1 permetent el transport a l'interior del peroxisoma però evitant que allí hi dugués a terme la seva funció. En la tercera estratègia, la inhibició selectiva de l'enzim AAA ATPasa evitaria que la PEX5 fos reciclada del citosol. Aquesta acumulació de proteïnes aberrants desencadenaria la maquinària autofàgica donant lloc a la pexofàgia (digestió del peroxisoma). Esquemes representatius de les tres estratègies es troben representats a la Figura 5.



**Figura 5. Esquema representatiu d'estratègies proposades en la teràpia anti-càncer dirigida selectivament als peroxisomes.** Adaptat de (Dahabieh et al. 2018)

Conjuntament amb l'oxidació d'àcids grassos mitocondrials, els enzims lipolítics també s'han relacionat amb la tumorigènesi. Un exemple clar és l'enzim MAGL, sobreexpressat en càncer de mama, ovari i en melanoma (Nomura et al. 2010). En la via de la lipòlisi, també s'ha estudiat el paper de l'ATGL, el qual ha generat més controvèrsia en el context tumoral. Alguns estudis aposten pel seu paper pro-neoplàsic en models de càncer colorectal (Transition et al. 2014), estómac (Zagani et al. 2015), mama (Y. Y. Wang et al. 2017) o pàncrees (Grace et al. 2017). En altres estudis, s'ha determinat que l'expressió d'ATGL en càncer està reprimida (Alzoughbi et al. 2016; Vegliante et al. 2018).

### **1.2.3. Comunicació lipídica i tumor-microambient i metàstasi**

Un dels principals reptes a què s'enfronta actualment el tractament del càncer és la disseminació de les cèl·lules tumorals i la consegüent metàstasi. En aquest procés hi estan involucrades múltiples cèl·lules conjuntament amb les transformades inicialment (cèl·lules del sistema immunitari, adipòcits, cèl·lules nervioses, endotelials, limfàtiques, vasculars) (Ying Liu et al. 2018). El diàleg molecular establert entre elles ha demostrat ser molt important en el creixement tumoral, progressió i disseminació. Actualment se sap que la senyalització lipídica està fortament involucrada en aquesta comunicació i que en conseqüència representa una possible diana terapèutica molt interessant (Romero et al. 2015). Algunes de les molècules lipídiques bioactives importants en el procés són les prostaglandines (PG), el subtipus PGE2, així com enzims implicats en la seva síntesi (ciclooxigenasa 2, COX2). També tenen importància els esfingolípid (SP) més concretament esfingosina-1-fosfat (S1P), així com el seu receptor (SPR1) i l'enzim esfingosina quinasa (SphK1) implicada en la via de síntesi (Beloribi-djefa, Vasseur, and Guillaumond 2016; Ying Liu et al. 2018). Les prostaglandines són hormones provinents de l'oxidació de l'àcid araquidònic amb l'acció de l'enzim ciclooxigenasa (COX). Estan presents en la majoria dels teixits i poden presentar acció autocrina i paracrina (Röhrig and Schulze 2016). La seva senyalització es produeix a través del seu receptor que presenta set dominis transmembrana i està acoblat a proteïnes G. En el micro-ambient tumoral, s'ha descrit que el subtipus PGE2 està sobreexpressada i actua com a factor autocrí i paracrí promovent la progressió i metàstasi mitjançant múltiples mecanismes com la inactivació de les cèl·lules immunitàries, l'estimulació de la migració, proliferació i angiogènesi i la inhibició de l'apoptosi (Santander Ballestín et al. 2012). Els esfingolípid comprenen un grup de molècules intracel·lulars i extracel·lular que senyalitzen a la cèl·lula a través de l'acoblament a proteïnes G (R. Zhao et al. 2012). L'esfingosina 1 fosfat (S1P) és un factor de creixement pro-angiogènic responsable de la formació de capil·lars *in vitro* així com de xarxes de vascularització *in vivo*. El reconeixement cel·lular de la S1P es dona a través del SPR1, i la seva síntesi és a través de l'acció enzimàtica de SphK1 (Cuvillier 2008).

Els compostos que actuen sobre aquestes dianes terapèutiques conjuntament amb els models en els quals s'ha estudiat el seu potencial terapèutic en càncer estan resumits a la Taula 4.

<b>DIANA</b>	<b>COMPOST</b>	<b>MODEL</b>	<b>EFFECTE</b>	<b>REF</b>
<b>PRE-CLÍNIC</b>				
<b>PGE2</b>	SC-51322	Línies cel·lulars limfoma no-Hodgkin, càncer mama	Inducció apoptosi, arrest del creixement cel·lular, reducció angiogènesi	(Kulkarni et al. 2016; Timoshenko et al. 2006)
	AH6809	Línies cel·lulars càncer pàncrees, limfoma no-Hodgkin	Reducció creixement tumoral, inducció apoptosi	(Kulkarni et al. 2016; Takahashi et al. 2015)
	AH23848B	Línies cel·lulars càncer esòfag i xenotransplantaments	Reducció creixement tumoral	(Santander Ballestín et al. 2012)
<b>COX2</b>	Celecoxib	Línies cel·lulars càncer bufeta, pàncrees i xenotransplantaments	Reducció creixement tumoral, sensibilització tumor quimioresistent.	(Knab, Grippo, and Bentrem 2014; Mo et al. 2014; D. Wang et al. 2015)
	CG100649	Línies cel·lulars càncer còlon i xenotransplantaments	Reducció creixement tumoral.	(Kim et al. 2014)
<b>S1P</b>	Sphingomab	Línies cel·lulars càncer estómac, mama, colorectal, renal i xenotransplantaments	Reducció creixement tumoral, reducció angiogènesi, capacitat mestastatica, sensibilització tumor quimio-resistent.	(Lu et al. 2006; Liang Zhang et al. 2015)
<b>SPR1</b>	FTY720	Xenotransplanaments càncer colorectal.	Reducció proliferació cel·lular	(Liang et al. 2013)
<b>SPHK1</b>	SK1-I	Xenotransplantaments càncer mama.	Reducció creixement tumoral i de capacitat metastàtica.	(R. Zhao et al. 2012)

**Taula 4. Compostos amb efecte antitumoral amb mecanismes d'acció vinculat amb el micro-ambient tumoral.**



La majoria dels compostos han estat validats a nivell preclínic però en el cas de celecoxib, existeixen grans quantitats d'assajos clínics en múltiples tipus de càncer. Alguns d'aquests assajos clínics més avançats són en càncer de mama (NCT02429427, fase III), càncer de pròstata (NCT00136487, fase II-III), càncer de bufeta (NCT00006124, fase II-III), càncer d'estómac (NCT00300729, fase III). Sphingomab és també un exemple en el qual s'han dut a terme assajos clínics en diferents tipus de càncer tals com renal (NCT01762033, fase II) o tumors sòlids avançats refractaris (NCT00661414, fase I). Actualment no es disposa de resultats dels assajos clínics realitzats.

La reprogramació del metabolisme lipídic en les cèl·lules tumorals és tant extensa com complexa. Malgrat les clares afectacions a les principals vies del metabolisme, les alteracions també afecten a la gran majoria de estructures lipídiques amb paper rellevant en la biologia cel·lular. Colesterol (K. Liu and Czaja 2013), esfingolípid (Ogretmen and Hannun 2004), fosfolípids (Swinnen, Brusselmans, and Verhoeven 2006) i *lipid droplets* (Welte and Gould 2017), entre altres estructures lipídiques, presenten alteracions claus tant en la síntesi, transport, condensació, etc. Per la implicació i importància en aquest treball resulten d'especial interès els *lipid droplets*.

#### **1.2.4. Els *Lipid droplets* en càncer**

Les primeres evidències de l'existència dels *lipid droplets* en les cèl·lules tumorals es remunten l'any 1957, quan en estudis de tumor hepàtic en rata es va constatar la nombrosa presència de LD en el citoplasma cel·lular (Novikoff 1957). En humans, no va ser fins el 1963 en un model de carcinoma mamari, que es van observar els primers *lipid droplets* (Apffel and Baker 1963). Des de llavors, la seva presència en càncer ha estat descrita en nombrosos models tals com mama (Q. Zhou et al. 2000), cervell (Spence and Rubinstein 1975), fetge (Abbas, Yoo, and Viles 1982), estómac (Dessi et al. 1992), cervical (Than et al. 2003), pròstata (Hager et al. 2006), còlon (Accioly et al. 2008), ovari (Nieman et al. 2011) i pàncrees (Guillaumond et al. 2015) i la seva acumulació ha estat relacionada amb processos neoplàsics i invasió tumoral.

Avui en dia, s'ha establert la noció que els canvis en el metabolisme dels *lipid droplet* representen una important *hallmark* de la reprogramació del metabolisme de les cèl·lules tumorals (Beloribi-djefa, Vasseur, and Guillaumond 2016; Bozza 2010; Koizume and Miyagi 2016; Tirinato et al. 2017).

En càncer, l'alta presència de *lipid droplets* en el citoplasma cel·lular s'explica amb la multitud de funcions que duen a terme afavorint la progressió tumoral. Entre aquestes destaquen evitar la lipotoxicitat cel·lular. Aquest procés s'indueix en resposta a l'acumulació d'àcids grassos saturats al citoplasma cel·lular. Per evitar els efectes tòxics, la cèl·lula agrupa els àcids grassos i en genera una macroestructura inerta (*lipid droplet*) (Abramczyk, 2015; Bozza, 2010).

La relació entre els *lipid droplets* i els TAG ha estat àmpliament estudiada en càncer. Tot i això estudis recents suggereixen també la relació dels LD amb l'acumulació del colesterol (Petan, Jarc, and Jusović 2018). Malgrat els mecanismes avui en dia no són del tot clars, l'habilitat de les cèl·lules tumorals d'incrementar el reservori de colesterol en LD, eliminant al mateix temps el colesterol bioactiu del citoplasma, està relacionat amb la progressió de nombrosos models de càncer tals com pròstata (Yue et al. 2014), pàncrees (J. Li et al. 2016) o cervell (Geng et al. 2016).

Altres papers importants dels LD en la biologia tumoral són, per exemple, la protecció envers els agents quimioterapèutics (Koizume and Miyagi 2016; Welte and Gould 2017), o l'acumulació de acilceramides reduint així el dany cel·lular causat per l'elevada presència dels seus precursors (Snider et al. 2017).

### **1.3. El compartiment de reciclatge i el càncer**

#### **1.3.1. Lisosomes**

Els lisosomes constitueixen el principal compartiment digestiu de la cèl·lula. Identificats fa més de 50 anys, inicialment van ser considerats com a simples bosses d'escombraries cel·lulars. Contràriament, avui en dia en canvi sabem que desenvolupen un paper important en múltiples processos cel·lulars que permeten el manteniment de l'homeòstasi cel·lular. (Appelqvist et al. 2013). Els lisosomes es troben pràcticament en totes les cèl·lules eucariotes i, malgrat que el nombre depèn

del tipus de cèl·lula i del seu estat metabòlic, de forma general, una cèl·lula sense privació de nutrients conté diversos centenars de lisosomes (Xu and Ren 2015).

Els lisosomes són orgànuls delimitats per una bicapa lipídica que conté un gran nombre de proteïnes glicosilades atès l'alt grau de carbohidrats que la conformen. Algunes de les proteïnes més abundants són les proteïnes associades a la membrana lisosomal (LAMP de les sigles en anglès), la proteïna integral membrana lisosomal (LIMP) i CD63. A banda d'aquesta membrana externa, els lisosomes també presenten membranes intra-lisomals riques en fosfolípids que representen el lloc de degradació de membranes de l'orgànul (Appelqvist et al. 2013). L'interior del lisosoma es caracteritza per un pH àcid, que oscil·la entre 4,5 i 5. Per mantenir aquest pH el lisosoma disposa a la seva membrana exterior de l'ATPasa vacuolar, que bombeja protons ( $H^+$ ) cap a l'interior del lumen lisosomal, (Lawrence and Zoncu 2019).

La funció principal del lisosoma és la degradació de macromolècules de naturalesa molt diversa (lípid complexos, proteïnes mal plegades, àcids nucleics, oligosacàrids, etc). Per tal de dur a terme aquesta funció degradativa, el lisosoma està dotat d'una seixantena d'hidrolases en el seu interior amb dianes molt diferents entre elles, permetent així la degradació de tot tipus d'estructures. El pH àcid és un requeriment per a la correcta funcionalitat d'aquestes hidrolases (Schulze, Kolter, and Sandhoff 2008). Els lisosomes són els encarregats de digerir tot tipus de molècules ja siguin intracel·lulars, que arriben a través de l'autofàgia al compartiment lisosomal, o espai extracel·lulars que caldria la implicació del compartiment endocític o fagocític per arribar al lumen acídic (Xu and Ren 2015).

En la maquinària dels lisosomes s'ha identificat recentment una xarxa de coordinació d'expressió i regulació dels lisosomes (CLEAR per les seves sigles en anglès). Molts dels gens que codifiquen per proteïnes lisomals contenen a la seqüència CLEAR (GTCACGTGAC) al costat del lloc d'inici de transcripció. La regulació de la xarxa CLEAR corre a càrrec del factor de transcripció EB (TFEB en anglès) que entra al nucli de la cèl·lula i s'uneix a les regions CLEAR induint l'expressió dels seus gens diana entre els quals hi ha aquells involucrats en la biogènesi lisosomal i l'autofàgia (Appelqvist et al. 2013). La síntesi de lisosomes es

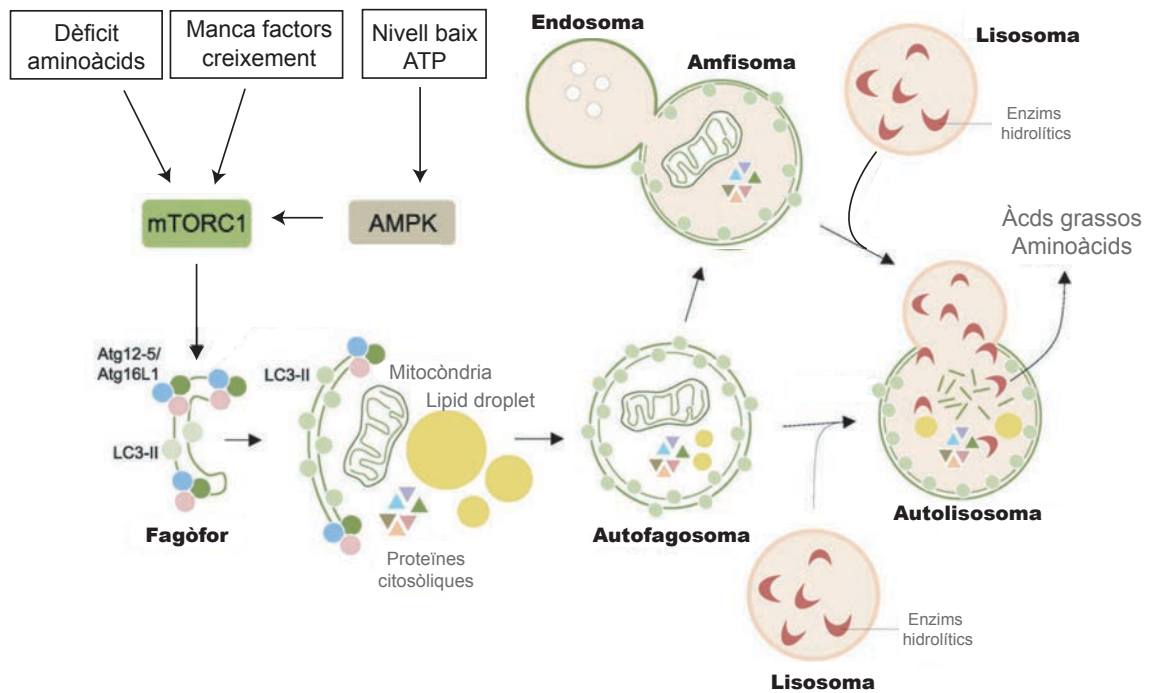
dinàmica i s'adapta a les necessitats de nutrients de la cèl·lula. Un factor clau implicat en aquesta maquinària sensible als nutrients es el regular mTORC1. En condicions de privació de nutrients, mTORC1 activa el factor TFEB, que al seu torn activa la biogènesi d'autofagosomes conjuntament amb la degradació lisosomal per un increment de la funció dels mateixos. Quan les cèl·lules tenen el nivell adequat de nutrients, mTORC1 inhibeix el factor TFEB evitant que aquest es transloqui al nucli (Lawrence and Zoncu 2019).

### **1.3.2. L'autofàgia**

L'homeòstasi cel·lular s'aconsegueix mantenint el correcte balanç entre la biosíntesi i el reciclatge, i en aquest equilibri, l'autofàgia presenta un paper molt important (He and Klionsky 2009). El terme autofàgia va ser encunyat l'any 1966 i es defineix com un procés d'autodigestió en el qual material citoplasmàtic aberrant o danyat és entregat als lisosomes per al seu reciclatge (Lindqvist, Simon, and Baehrecke 2015). És un procés altament conservat entre espècies que es dona de manera basal a les cèl·lules per conservar-ne el balanç energètic i l'homeòstasi. Malgrat això diversos estímuls extracel·lulars o intracel·lulars poden promoure l'autofàgia representat així un mecanisme essencial a través del qual les cèl·lules s'adapten a les condicions d'estrès (Gerónimo-olvera 2019).

En les cèl·lules de mamífer es coneixen tres tipus d'autofàgia: l'autofàgia mitjançada per xaperones, en la qual determinades proteïnes són reconegudes per la presència de pèptids senyal i importades directament al lisosoma (Cuervo and Wong 2014), la microautofàgia en la qual el lisosoma capta directament partícules citosòliques de forma indiscriminada (Santambrogio and Cuervo 2011) i la macroautofàgia, en la qual el material que cal reciclar és envoltat per una doble membrana formant una vesícula de reciclatge que posteriorment es fusionarà amb el lisosoma. El procés de macroautofàgia, d'ara en endavant serà referit com autofàgia, és la versió més complexa d'autofàgia i és un procés amb múltiples etapes estrictament regulades en les que els gens relacionats amb l'autofàgia hi tenen un paper molt rellevant (Y. Feng et al. 2014).

El procés de d'autofàgia s'inicia gràcies a l'activitat del complex ULK i PI3K que activen la creació d'una doble membrana lipídica que envoltarà el material que ha de ser degradat posteriorment al lisosoma. Aquesta vesícula naixent rep el nom de fagòfor i la seva síntesi es basa en la utilització de teixit membranós de diferents orígens, principalment reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i mitocondri (Lindqvist, Simon, and Baehrecke 2015; Tooze and Yoshimori 2010). L'elongament de la nova membrana naixent així com l'escissió transformen el fagòfor en un autofagosoma madur. En aquest pas del procés són molt important les proteïnes Atg, i d'especial importància el complex Atg12-Atg5-Atg16 conjuntament amb la proteïna LC3, que estan implicats en la correcte elongació de la nova membrana generada i l'escissió de l'origen de creació. Un cop l'autofagosoma és madur, el factor Atg12-Atg5-Atg16 s'elimina de la seva superfície, en canvi LC3 pateix una lipidació al llarg de la membrana amb l'addició de fosfatidiletanolamida convertint-se així amb LC3-II. LC3-II constitueix un dels marcadors més acceptats actualment d'autofagosomes i més utilitzats en l'estudi de l'autofàgia (Saha et al. 2018). L'autofagosoma madur pot fusionar-se directament amb el lisosoma generant un autofagolisosoma, o bé en un pas previ de fusió amb endosomes tardans, generat un amfisoma que es fusionarà eventualment amb el lisosoma. Un cop es doni la fusió, el contingut àcid de l'òrganul digestiu degradarà el contingut autofàgic que serà posteriorment reciclat (Ward et al. 2016). Un esquema representatiu del procés d'autofàgia es pot trobar a la Figura 6.



**Figura 6. Esquematització del procés d'autofàgia.** Adaptat de (Ward et al., 2016)

L'autofàgia malgrat ser un procés cel·lular basal, en determinades condicions pot activar-se o reprimir-se. Així doncs la regulació a la qual està subjecta aquest procés és extremadament complexa i implica múltiples vies de senyalització però existeixen dos reguladors claus d'especial importància: el complex mTORC1, que s'ha descrit també la seva importància en el compartiment lisosomal (Neufeld 2010), i APMK (Mihaylova and Shaw 2011; Yu, Chen, and Tooze 2018).

Quant el paper d'aquest procés en cèl·lules T, l'autofàgia ha estat identificat com un procés important involucrat en el correcte desenvolupament de les cèl·lules T, implicat en la maduració i activació. Les cèl·lules T de forma indirecta depenen de l'autofàgia en la regulació de la presentació d'antígens durant la selecció negativa i positiva dels timòcits. La regulació del desenvolupament i supervivència dels timòcits CD4- i CD8- també ha demostrat tenir una relació amb l'autofàgia (Bronietzki, Schuster, and Schmitz 2015). Paral·lelament al correcte desenvolupament de les cèl·lules T, l'autofàgia és també un procés important en el manteniment del metabolisme resulta de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC per les sigles en anglès). L'autofàgia és vital per controlar els nivells d'espècies reactives d'oxigen (ROS per les sigles angleses) en les HSC i assegurar així la correcta

producció de limfòcits T, entre altres poblacions (Constantinescu et al. 2011). Estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que el bloqueig o deleció de l'autofàgia en les HSC porta associada una pèrdua de les propietats de les HSC així com una reducció en nombre, que a llarg termini es tradueix en displàsies i dèficits en les diferents poblacions sanguínies (Mortensen, Watson, and Simon 2011; Stranks et al. 2011).

### **1.3.2.1. Mort cel·lular dependent d'autofàgia**

La classificació i nomenclatura dels diferents tipus de mort cel·lular programada han estat font de controvèrsia en l'àmbit de la biologia cel·lular. Malgrat això, el Comitè de Nomenclatura de la Mort Cel·lular (NCCD per les seves sigles angleses) l'any 2018 va publicar l'últim recull dels tipus de mort cel·lular avui en dia acceptats. En aquest treball s'hi inclouen fins a una dotzena de tipus de mort cel·lular diferents (Galluzzi et al. 2018). Per la importància i implicació en aquest treball, només es tractarà la mort cel·lular dependent d'autofàgia (ADCD per les sigles angleses) que es troba recollida en aquesta darrera classificació.

Tal com s'ha descrit a l'apartat anterior, l'autofàgia és un procés que actua de forma basal a les cèl·lules i que pot activar-se, en resposta d'estímuls d'estrès o dèficit de nutrients. La mort cel·lular dependent d'autofàgia és sens dubte el tipus de mort cel·lular que més controvèrsia ha generat al llarg dels anys. El concepte ADCD va ser introduït l'any 1980 per descriure un tipus de mort, que es va anomenar mort cel·lular tipus II, en què s'observen nombrosos autolisosomes i autofagosomes i que no presentava característiques pròpies dels altres tipus de mort cel·lular acceptats (apoptosi i necrosi) (Clarke and Puyal 2012).

Malgrat la determinació d'alguns científics d'apostar per l'existència de l' ADCD com a tipus de mort cel·lular, hi ha alguns científics que creuen que l'ADCD no existeix com a entitat, ja que no existeixen evidències que l'autofàgia sigui un mecanisme de mort per ell mateix, al·legant la inespecificitat dels inhibidors de l'autofàgia i els múltiples papers de les proteïnes implicades (Shen, Kepp, and Kroemer 2012). Les últimes recomanacions del NCCD han inclòs la mort cel·lular dependent d'autofàgia com a entitat intentant aportar així un final a la controvèrsia generada. Es considerarà ADCD sempre que la maquinària autofàgica sigui la que desencadena



la mort cel·lular, i per tant, inhibidors específics de l'autofàgia, atenuïn la inducció d'aquesta mort. Dins del concepte ADCD no s'inclourien aquelles situacions en les quals el compartiment autofàgic simplement acompanya la mort cel·lular o modula altres vies com la ferroptosi, l'apoptosi o la necrosi (Galluzzi et al. 2018).

Conjuntament amb la mort cel·lular dependent d'autofàgia i malgrat no presentar la mateixa rellevància en el present treball, cal mencionar l'apoptosi com a procés de mort cel·lular programada més àmpliament estudiat. Es tracta d'un programa de mort cel·lular que serveix als organismes multicel·lulars per a eliminar cèl·lules danyades o senescentes. Es distingeixen dues vies principals d'apoptosi: l'extrínseca i la intrínseca. La via extrínseca té el seu origen en alteracions del microambient que activen els receptors *death* o bé receptors de dependència de la membrana plasmàtica. L'activació d'aquests receptors desencadena el programa de mort cel·lular del qual cal destacar l'acció de les caspases executores 3 i 7 (Galluzzi et al. 2018). En el cas de l'apoptosi intrínseca, l'origen es troba al interior de la cèl·lula, concretament al mitocondri i s'activa en resposta a diversos estímuls com ara l'excés de ROS, dany al DNA, estrès fisiològic (Fulda and Debatin 2006). La mecànica del procés té com a pas crític la permeabilització irreversible de la membrana mitocondrial externa que es troba controlada per proteïnes de la família de Bcl-2. En aquest tipus d'apoptosi també tenen un paper rellevant les caspases executores 3 i 7 (Galluzzi et al. 2018).

### **1.3.3. Els lisosomes i el càncer**

La proliferació descontrolada de les cèl·lules tumorals porta associada un elevat ritme de creixement, que es tradueix en una necessitat imperiosa de les cèl·lules de generar grans quantitats de biomassa. En aquest sentit els lisosomes juguen un paper molt important. La sobreactivació dels lisosomes en el càncer ha estat àmpliament descrita i alguns dels canvis més importants que porta associats és un augment del volum i del pH lisosomal, canvis en la composició. (Davidson and Vander Heiden 2016; Hämälistö and Jäättelä 2016). Les proteases que conformen el lisosoma també són objecte d'alteracions en el càncer.



En nombrosos tipus de càncer s'ha confirmat una sobreexpressió de les hidrolases lisosomals, especialment de les catepsines, així com un alliberament d'aquestes a l'espai extracel·lular afavorint així metàstasi i la invasió tumoral. Aquest alliberament de catepsines és possible pels canvis de disposició dels lisosomes, que se situarien estratègicament molt pròxims a la membrana plasmàtica podent-se fusionar eventualment i alliberar així el contingut fora del citoplasma (Kallunki, Olsen, and Jäättelä 2013; Piao and Amaravadi 2016).

Les alteracions lisosomals també s'han relacionat amb la resistència a quimioteràpia, el reciclatge de receptors relacionats amb la proliferació o la inflamació pro-tumoral (Zhitomirsky and Assaraf 2016).

L'híperactivació lisosomal però, també s'ha vist que porta associada una major vulnerabilitat, característica que els fa més sensibles a l'acció de certs fàrmacs les cèl·lules tumorals de forma selectiva. En aquesta inestabilitat de l'òrgànul, són importants les espècies reactives d'oxigen (ROS), que es troben incrementades en les cèl·lules tumorals, així com els canvis en les proporcions dels esfingolípidis de la membrana lisosomal (acumulació d'esfingosina i ceramida) (Piao and Amaravadi 2016). Seguint en aquesta línia de fragilitat, les cèl·lules tumorals serien més propenses a patir un alliberament del contingut lisosomal, especialment les abans anomenades catepsines, activant així el procés de mort associat a la permeabilització de la membrana lisosomal (LMP per les seves sigles en anglès) (Kirkegaard and Jäättelä 2009; Kroemer and Jäättelä 2005).

Considerant totes les alteracions del lisosoma en el càncer i les conseqüències de cada una d'elles, especialment aquelles implicades en la invasivitat tumoral, s'ha produït un canvi en la visió del lisosoma com únicament una estació de reciclatge cel·lular, convertint-se en una diana terapèutica en el càncer. Les estratègies proposades són molt variades: inhibició de la bomba de protons per evitar l'acidificació de l'ambient, inhibició de l'acció de les catepsines, augment del pH lisosomal, bloqueig de l'activitat d'enzims lisosomals entre altres (Davidson and Vander Heiden 2016).

#### 1.3.4. Autofàgia i càncer

L'autofàgia com a via de degradació cel·lular ha demostrat la seva importància en molts aspectes diferents de la biologia del càncer incloent el metabolisme, el reciclatge de proteïnes i orgànuls així com la supervivència cel·lular. El paper de l'autofàgia en el càncer és complex, ja que s'ha demostrat en diferents estudis que la maquinària autofàgica pot actuar promovent o bé inhibint la tumorogènesi (Yun and Lee 2018). Aquesta paradoxa però no és contradictòria, l'autofàgia pot tenir un paper inhibitori evitant el desenvolupament del càncer. En aquest context, l'autofàgia actuaria, doncs, com element inhibitori del creixement tumoral evitant la generació i acumulació de grans quantitats de ROS, que en conseqüència generen una inflamació constant en els teixits que pot donar lloc a la transformació. També resulta vital el paper de l'autofàgia en el manteniment de l'estabilitat tissular i genòmica, evitant l'acumulació d'agregats proteics, orgànuls danyats o bé alteracions en el DNA que poden desencadenar la transformació (E. White, Mehnert, and Chan 2015; Eileen White 2012). Estudis a nivell *in vivo* i *in vitro* han demostrat que una inhibició de l'autofàgia ja sigui farmacològica o bé genètica pot desencadenar el creixement tumoral en models càncer de fetge i estómac (X. Qu et al. 2003; Yue, Zhenyu; Jin, Shengkan; Yang, Chingwen; J. Levine 2003).

A banda d'aquest paper anti-tumoral de l'autofàgia previ a la transformació, també és important l'increment del flux autofàgic, un cop el tumor està establert, que pot afavorir el creixement tumoral i la supervivència (Eileen White 2012). En aquest paper pro-tumoral, la sobreactivació del compartiment autofàgic està promoguda per múltiples factors, entre ells per la demanda metabòlica i de biosíntesi imposada per la proliferació descontrolada. En la fase de manteniment i propagació de la malaltia, l'autofàgia té un paper crucial ja que promou el creixement i la supervivència en condicions de dèficit de nutrients i hipòxia, afavoreix la tumorogènesi, la invasió i la metàstasi (S. S. Singh et al. 2018; Eileen White 2012; Wilde et al. 2018). Múltiples estudis han centrat l'atenció en aquesta sobre activació de l'autofàgia en càncer i han demostrat que la inhibició farmacològica disminueix la proliferació tumoral en múltiples models. També s'ha vist que la inhibició selectiva de l'autofàgia sensibilitza les cèl·lules a l'acció dels quimioterapèutics (Mulcahy Levy 2017).

El paper de l'autofàgia en càncer també s'ha relacionat amb el metabolisme lipídic. En càncer, en episodis d'estrès cel·lular, elevats fluxos d'autofàgia encarats a satisfer els requeriments energètics de la cèl·lula tumoral, s'han relacionat amb una major lipotoxicitat i, conseqüentment una elevada generació de *lipid droplets*. (Nguyen et al. 2017; R. Singh et al. 2009).

La importància de l'autofàgia en les cèl·lules mare del càncer (CSC) ha estat validada en models com ovari, mama, cervical i leucèmia mieloide crònica. S'ha demostrat una sobreactivació del compartiment autofàgic en aquests tipus de càncer així com també, una reducció del potencial regeneratiu de la població CSC amb la inhibició selectiva de l'autofàgia (Bousquet et al. 2017; Calabretta and Salomoni 2011; Peng et al. 2017; Y. Yang et al. 2017).

### **1.3.5. El compartiment de reciclatge i el metabolisme lipídic en càncer**

Com s'ha descrit en els apartats anteriors, els lisosomes representen els òrgans digestius per excel·lència de la cèl·lula. La seva importància en el correcte funcionament cel·lular no és la digestió merament, sinó que també actuen com a estómac cel·lular, mantenint l'estat metabòlic ideal en funció dels requeriments (Lawrence and Zoncu 2019). Els lisosomes degut a la seva importància en múltiples processos de la progressió tumoral, han estat objecte d'estudi convertint-se en una diana interessant. La inhibició selectiva de proteïnes lisosomals, hidrolases selectives i altres elements de l'òrganul han demostrat ser estratègies efectives en diferents models de càncer (Davidson and Vander Heiden 2016; Piao and Amaravadi 2016).

Conjuntament amb la inhibició selectiva de dianes moleculars específiques, existeixen compostos que presenten altres mecanismes d'afectació selectiva dels lisosomes. En aquesta categoria s'hi inclourien aquells compostos que presenten un **lisosomotropisme**. Aquest concepte, emprat per primera vegada per De Duve als anys 70, defineix aquells compostos que són captats pels lisosomes, presentant concentracions molt elevades al compartiment endolisosomal, i que s'havia

observat que provocaven diverses alteracions a nivell cel·lular i sistèmic (de Duve et al., 1974).

Els primers indicis de compostos lisosomotròpics es remunten als anys 40, quan Nelson i Fitzhugh van detectar una extensa vacuolització en macròfags tractats amb cloroquina. Amb el pas dels anys, l'extens coneixement sobre els lisosomes i les millores tecnològiques han permès reinterpretar les observacions com l'acumulació de fosfolípids en vacúols o cossos lamel·lars, que d'una banda generava una resposta adaptativa de la cèl·lula i de l'altra impedia el catabolisme dels fosfolípids. Aquest procés rep el nom de fosfolipidosi (Kodavanti and Mehendale 1990; Reasor, Hastings, and Ulrich 2006). Atesa la importància de la fosfolipidosi en aquest treball, a continuació es detallarà amb més profunditat.

#### **1.3.5.1. Fosfolipidosi**

La fosfolipidosi es defineix com l'acumulació intracel·lular aberrant de fosfolípids agrupats en cossos lamel·lars amb origen preferencialment lisosomal. El procés presenta reversibilitat amb la discontinuació del tractament (Anderson 2006; Kodavanti and Mehendale 1990; Reasor, Hastings, and Ulrich 2006). El temps i l'eficiència de la reversió depenen del sistema cel·lular utilitzat, el compost inductor, el temps de tractament al que s'ha sotmès entre altres característiques (Reasor, Hastings, and Ulrich 2006).

El mecanisme associat al procés no s'explica sense la caracterització dels compostos responsables d'iniciar-lo. La majoria de compostos inductors de la fosfolipidosis posseeixen una estructura amfifílica, formada per un cap hidròfob i una estructura lateral amb una amina protonable que actua de base feble. Atesa la seva estructura, aquests compostos s'han anomenat fàrmacs catiónics amfifílics (CAD per les seves sigles en anglès), i constitueixen un grup molt heterogeni format sobretot per antimalàrics, antiarrítmics, antidepressius, antipsicòtics i antihistamínics (Kazmi et al. 2013). L'estructura fisicoquímica és per tant un element fonamental que determina que els CADs puguin creuar membranes amb facilitat i protonar-se en medi àcid, mecanisme anomenat atrapament iònic. El compost presentaria

permeabilitat a pH fisiològic (citosol) i menys a pH àcid (lisosoma) el que comporta una acumulació als orgànuls àcids (Kuzu et al. 2017).

Malgrat l'estructura dels CADs i la seva acumulació en orgànuls àcids és un aspecte central, el mecanisme associat a la fosfolipidosi és complex, i engloba també altres afectacions importants com la inhibició correcta de fosfolipases del lisosoma (Lowe et al. 2012), la intercalació dels CADs en les bicapes lipídiques (Kodavanti and Mehendale 1990) formant agregats indigeribles així com també desregulacions en la síntesi i reciclatge dels fosfolípids (Sawada, Takami, and Asahi 2005).

Considerant les múltiples vies que es veuen afectades en la inducció de la fosfolipidosis, les conseqüències cel·lulars que provoca són també en consonància (Anderson 2006). La inhibició de les fosfolipases lisosomals provoca una acumulació dels fosfolípids als orgànuls però a la vegada també altera l'homeòstasi lipídica cel·lular, induint canvis importants a nivells d'expressió gènica en les vies de síntesi de colesterol, àcids grassos, fosfolípids així com també en gens implicats en el tràfic lipídic. Els agregats fosfolipídics generats, alteren l'expressió gènica de síntesi així com el correcte reciclatge dels mateixos (Kodavanti and Mehendale 1990; Sawada, Takami, and Asahi 2005). En definitiva, la inducció de la fosfolipidosi és una alteració amb conseqüències molt ramificades en tot el sistema cel·lular que provoca canvis en la totalitat del metabolisme lipídic.

La inducció de la fosfolipidosi ha estat considerada com un efecte secundari de certs compostos que cal evitar en el desenvolupament de nous fàrmacs. Nombrosos estudis han posat especial atenció al desenvolupament de tècniques que permetin la detecció de compostos inductors de la fosfolipidosi de forma primerenca com efecte secundari tòxic (Lienemann, Plötz, and Sabine 2008; N. Liu et al. 2014; Vejux, Malvitte, and Lizard 2008; X. Zhao et al. 2014). Així doncs, malgrat l'ampli coneixement del procés i del mecanisme associat (Lowe et al. 2012), els compostos inductors de la fosfolipidosi han estat durant anys vistos amb mals ulls i conseqüentment la recerca realitzada s'ha encarat a evitar-ne l'ús i facilitar-ne la detecció (Kasahara et al. 2006; Sawada, Takami, and Asahi 2005). Per altra banda, i malgrat l'existència de molts treballs destinats a la detecció precoç de la

fosfolipidosi, existeixen estudis en els que compostos inductors de la fosfolipidosi han demostrat efectes citotòxics en models tumorals. Compostos com siramesina o bé amiodarona han demostrat induir citotoxicitat en càncer de mama (Ostenfeld et al. 2008; Petersen et al. 2013) o limfoma (Piccotti et al. 2005).

## **1.4. La leucèmia limfoblàstica aguda**

### **1.4.1. Conceptes generals**

La leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) és una neoplàsia hematològica clonal caracteritzada pel bloqueig en la maduració dels limfòcits que porta associada una proliferació aberrant dels limfòcits immadurs o limfoblasts. Aquesta transformació leucèmica provoca una acumulació de limfoblast a la medul·la òssia i sang perifèrica així com d'altres òrgans (tals com fetge, melsa o ganglis limfàtics), desplaçant així l'hematopoesi sana. Durant el procés d'hematopoesi sana, en el llinatge limfoide es generen dos limfòcits majoritaris diferents, els limfòcits B i T. D'igual manera en l'hematopoesi sana, existeixen dos tipus de LLA en funció del progenitor limfoide afectat, LLA de precursors B (LLA-B, representa un 75% de les LLA) i la LLA de precursors T (LLA-T, representa un 25% de les LLA) (Vadillo et al. 2018). La leucèmia limfoblàstica aguda té una incidència global de 1,7 casos/100000 habitants a l'any, sent així considerada com una malaltia rara. Aproximadament un 80% dels casos diagnosticats de LLA són pediàtrics i el 20% restant són pacients adults.

### **Classificació de la LLA**

L'organització mundial de la salut (OMS) en la seva darrera revisió del 2016 classifica la LLA de la següent manera (Terwilliger 2017).

- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B sense especificar
- Leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb alteracions genètiques recurrents
- Leucèmia/limfoma T
  - *Entitat provisional: Leucèmia limfoblàstica de precursors T primerencs (ETP-ALL).*

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi del subtipus de LLA de precursors T, la leucèmia limfoblàstica aguda T. Per poder entendre millor gran part de la biologia de la malaltia així com aplicar els tractaments més acurats a cada subtipus, cal primer conèixer els precursors que inicien en cada cas la malaltia i el procés segons el qual ho fan.

#### **1.4.2. Leucèmia limfoblàstica aguda T (LLA-T)**

Com s'ha explicat abans, la LLA-T és una neoplàsia clonal caracteritzada per l'expansió de precursors limfoides, en aquest cas del llinatge T. Representa un 15% dels casos pediàtrics i un 25% dels casos adults dins de les LLA sent una malaltia més prevalent en homes que en dones. Actualment, en l'era de les combinacions en quimioteràpia conjuntament amb els trasplantaments de medul·la òssia, els percentatges de curació han millorat enormement, però tot i així aproximadament un 20% dels casos pediàtrics i un 50% dels adults no sobreviuen a llarg termini. Per tal de poder reduir aquests percentatges, és necessari un millor coneixement de la biologia molecular i una millor comprensió de l'origen de la malaltia (Vadillo et al. 2018).

A nivell clínic la LLA-T presenta sovint un nombre elevat de limfòcits en sang amb infiltració medul·lar de ganglis limfàtics així com altres òrgans com el sistema nerviós central (CNS), i la presència d'una massa mediastínica derivada de la melsa (Belver and Ferrando 2016; Bongiovanni, Saccomani, and Piovan 2017).

#### **1.4.3. Maduració de limfòcits T en el tim**

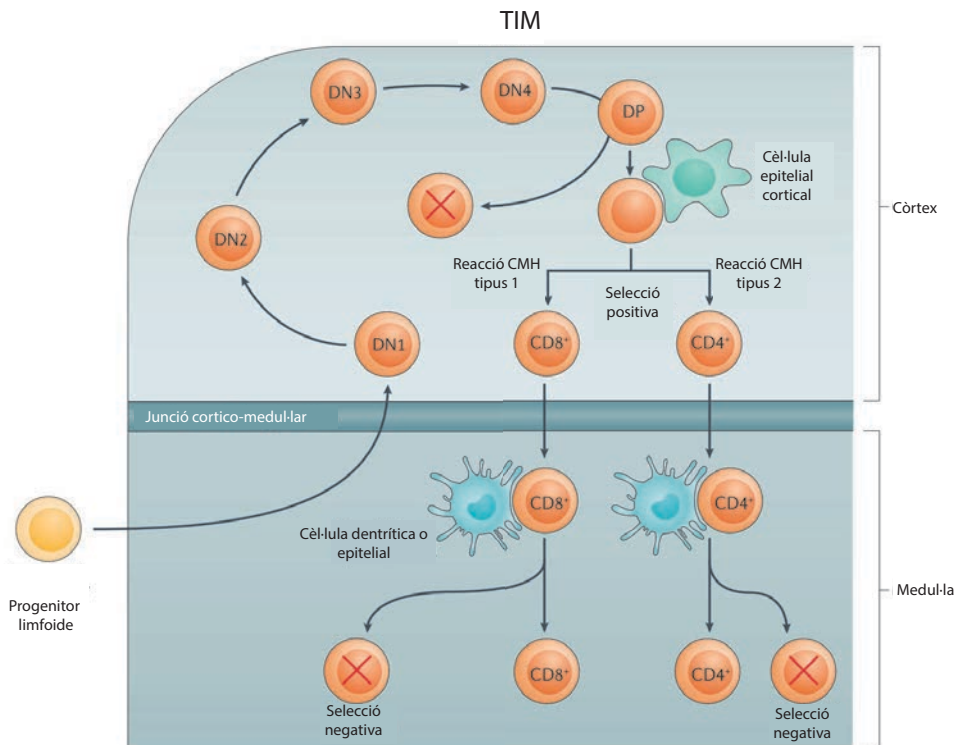
A principis del segle XX John Beard va suggerir que el tim s'havia de considerar com font de totes les estructures limfoides del cos, un òrgan que actuava com a lloc on naixien els limfòcits per després penetrar la resta del cos (i així generar el que avui coneixem com òrgans limfàtics) (Miller 2007). Des d'aquesta primera afirmació, els estudis sobre la implicació del tim en el procés de maduració dels limfòcits han avançat enormement i actualment sabem que el paper del tim és vital per al correcte desenvolupament hematopoètic. Gràcies a l'actuació de cèl·lules epitelials i estromals especialitzades, el tim presenta una "micro-arquitectura" que ofereix la combinació de senyals requerida per a la maduració dels limfòcits T.

El procés de desenvolupament dels precursors limfoides s'inicia amb un progenitor limfoide, que es sotmet a una diferenciació per passos, classificada en funció de l'expressió dels antígens CD4 i CD8 a la superfície cel·lular. Els precursors limfoides entren al tim per les unions cortico-medul·lars i un cop dins inicien una migració durant la qual també maduren. La migració va des del lloc d'entrada fins a les regions subcapsulars del còrtex i després torna a la medul·la, que és el lloc des d'on abandona el tim un cop completada la maduració. Els precursors limfoides que inicien el procés es caracteritzen per la no-expressió dels antígens, el que es coneix com a doble negatiu (DN). Els timòcits DN es poden dividir en quatre estadis de diferenciació en base a l'expressió de CD44 i CD25 (DN1, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>; DN2, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>; DN3, CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>; DN4, CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>).

La primera selecció es dona en els limfòcits en l'estat de DN3 i només els timòcits que expressin correctament la cadena  $\beta$  del TCR (TCR $\beta$ ) podran esdevenir doble positiu (DP). Aquells timòcits que passin a l'estat de DP es sotmetran a la primera selecció positiva, en la que es requereix un reconeixement adequat del complex major d'histocompatibilitat (CMH) propi. En el cas de ser seleccionats positivament, els timòcits se sotmetran a l'última selecció, en aquest cas negativa. En aquest últim pas en la maduració, aquells timòcits que reconeguin el CMH propi amb alta afinitat entraran en apoptosi i s'eliminaran. Un esquema representatiu es troba a la Figura 7.

D'aquesta manera el procés en la maduració tímica, es van seleccionant de forma esglaonada només aquells limfòcits que són capaços de reconèixer el CMH propi amb l'afinitat adequada i presenten l'expressió d'antígens en superfície correcte en cada estadi. És un procés altament regulat, amb amplitud de punts de control i en el que intervenen gran quantitat de senyals, estímuls i cèl·lules. És un procés amb molts punts susceptibles de ser desregulats en la transformació leucèmia. (Belver and Ferrando 2016; Carpenter and Bosselut 2010; Zúñiga-pflücker 2004).





**Figura 7. Maduració cèl·lules T en el tim.** Procés maduratiu que segueixen els limfòcits T precursors en el tim.

#### 1.4.4. Subgrups de LLA-T

Conjuntament amb la classificació de la OMS, al llarg dels anys s'han utilitzat altres criteris de classificació que a la vegada, aporten informació molt valuosa sobre el fenotip, genotip i immunofenotip de cada LLA-T i permeten una caracterització molt acurada de cada pacient, oferint així les millors aproximacions terapèutiques a cada cas. Una d'aquestes classificacions és la que es basa en les similituds fenotípiques dels blasts leucèmics amb els timòcits en cada un dels estadij de maduració que presenten de forma normal (Belver and Ferrando 2016; Coustan-Smith et al. 2009; Girardi et al. 2017; Ribera 2004; Sanda et al. 2012; Tremblay 2010; J. Zhang et al. 2012) :

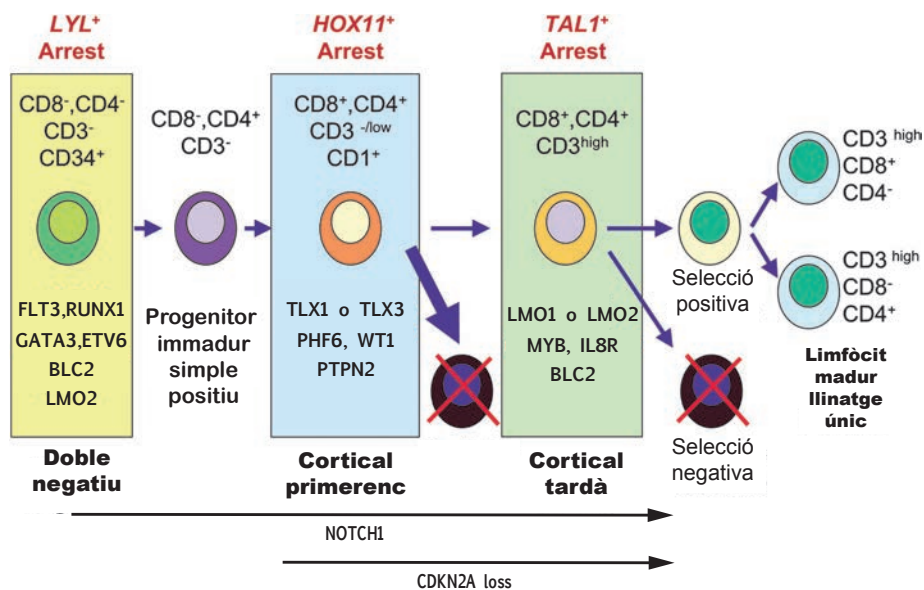
- **Early lineage progenitors (ETP):** Constitueixen el subtipus de LLA-T més proper a les cèl·lules mare hematopoètiques amb expressió de marcadors com CD34<sup>+</sup> conjuntament amb una estreta relació amb el llinatge mieloide, CD11b<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup> i CD33<sup>+</sup>. Són considerats limfòcits doble negatiu (CD4<sup>-</sup> i CD8<sup>-</sup>). A nivell genètic presenten alteracions que activen factors de transcripció

tals com FLT3, relacionada amb NRAS , conjuntament amb sobreexpressió factors de transcripció vinculats amb el desenvolupament com RUNX1, GATA3, ETV6.

El seu perfil genètic també inclou sobreexpressió d'oncogens tals com LYL que regulen positivament MYCN, LMO2, BCL2, que confereixen als limfoblasts certa quimio-resistència.

- **Progenitors corticals primerencs:** Se'ls anomena també els *early cortical*, són lleugerament més madurs que l'anterior grup. Immunològicament es caracteritzen per l'expressió de CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> així com CD1<sup>+</sup>. Genèticament representen l'entitat amb el percentatge de mutacions en Notch1 i deleció de CDKN2A més elevat, així com activacions de TLX1 i TLX3. Presenten sobreexpressió de l'oncogen HOX11 que regula el creixement cel·lular i la proliferació. Els limfoblasts pertanyents a aquest subtipus poden portar associades alteracions genètiques que no s'observen en cap altre grup tals com PHF6, WT1, PTPN2.
- **Progenitors corticals tardans:** Se'ls anomena també *late cortical*, són també immunològicament doble positius (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>). A nivell genètic es caracteritzen per sobre-expressió de l'oncogen TAL1 que porta associada expressió de LMO1/2 i altres alteracions en MYB, IL8R, BCL2. Els limfoblasts d'aquest subgrup presenten mutacions i delecions en PTEN en major freqüència .

Un esquema sistemàtic de les desregulacions genètiques de cada subgrup de LLA-T es troba en la Figura 8.



**Figura 8. Correlació de subgrups de LLA-T amb el desenvolupament tímic.**  
Adaptat de Sanda *et al.*, 2012

#### 1.4.5. Biologia de la malaltia

Biològicament parlant, la LLA-T és una malaltia altament complexa que resulta d'un procés de transformació, en el qual a través de successives alteracions genètiques coordinades, es desregulen vies metabòliques clau en processos tals com el control del creixement cel·lular, la proliferació, la supervivència i diferenciació durant el desenvolupament dels timòcits (Belver and Ferrando 2016) (Vadillo *et al.* 2018). En el procés de transformació de la LLA-T hi estan implicades moltes vies metabòliques diferents que poden actuar aïlladament però que en molts casos es troben interconnectades tant a nivell d'elements de resposta, com de subproductes generats com també d'oncogens diana comuns.

Referent a la senyalització, les vies que resulten més rellevants per a la biologia de la LLA-T són:

- **NOTCH1:** La via més important en el procés de transformació de LLA-T, aproximadament un 75% dels casos de LLA-T tenen mutacions en NOTCH1 i alteracions en les vies de senyalització associades (Yu Liu *et al.* 2017). NOTCH1 es considera que té un paper crucial en el desenvolupament normal dels limfòcits T. Presenta acció reguladora sobre la població i funcionalitat del tim així com en mantenir-ne l'homeòstasi.

En LLA-T les mutacions en NOTCH1 es tradueixen amb l'activació d'un programa oncogènic que promou el creixement, la proliferació i la supervivència dels limfoblasts. Una de les dianes genètiques més importants de NOTCH és l'oncogen MYC, implicat en l'augment del creixement cel·lular i la proliferació així com en mantenir l'activitat leucèmica (King et al. 2013). La interacció entre NOTCH1-MYC és una de les més rellevants en LLA-T. Conjuntament amb MYC, existeixen moltes altres dianes sobre les quals actua NOTCH1 tals com PTEN, NFAT, NF- $\kappa$ B cadascuna de les quals té associada una via metabòlica important, que al troncar-se confereix al limfoblast capacitats rellevants en la transformació tals com, la sobre activació del metabolisme i biosíntesis de proteïnes (PTEN – PI3K/AKT/mTOR) així com, contrarestar la mort cel·lular programada i la inducció de la proliferació cel·lular (NF- $\kappa$ B- BCL2/ICAM1). (Aifantis, Raetz, and Buonamici 2008; Belver and Ferrando 2016; Bongiovanni, Saccomani, and Piovan 2017; Neuberger et al. 2009; Oliveira et al. 2017; Vilimas et al. 2007)

- IL-7R: La interleucina 7 és un element essencial pel normal desenvolupament de les cèl·lules T sanes implicades en l'homeòstasi promovent la supervivència cel·lular i la progressió del cicle cel·lular (Bongiovanni, Saccomani, and Piovan 2017). El receptor de la IL-7 està format per dues cadenes alfa i gamma i ambdues presenten un domini extracel·lular i un intracel·lular. A nivell intracel·lular, les cadenes estan unides a les proteïnes de senyalització JAK1 i JAK3 respectivament. Paral·lelament a la via de senyalització JAK/STAT, el IL-7R també presenta acció reguladora a través de la via PI3K/AKT així com RAS/MAPK. Durant el normal desenvolupament dels limfòcits T, l'expressió de IL-7R està altament regulada i està associada a la correcta supervivència i maduració de poblacions específiques en el tim (Elkassar and Gress 2010; Mazzucchelli and Durum 2007) Contràriament, en LLA-T, els limfoblasts expressen IL-7R de forma aberrant així com també ho fan les cèl·lules estromals i el moll d'os. D'aquesta manera, el microambient en el qual es dona la transformació leucèmica en LLA-T, presenta expressió de IL-7R aberrant i això, confereix als limfoblasts un augment de l'entrada del cicle cel·lular així com una

alteració la viabilitat cel·lular a través de la regulació aberrant de p27<sup>kip1</sup> i BCL2. Les mutacions en expressió de IL-7R alfa s'han identificat en un 10% dels pacients i normalment estan associades als subgrups de LLA-T HOXA<sup>+</sup>, TLX1/3<sup>+</sup> així com *ETP*. També s'ha observat que en un 6% dels casos de LLA-T, la sobre estimulació de IL-7R presenta estreta relació amb la inactivació de PTPN2 (Joao T Barata et al. 2008; Boussiotis et al. 2004; Gírio et al. 2011; Yu Liu et al. 2017).

- PI3K/AKT/mTOR: En les cèl·lules T sanes, la cascada de senyalització PI3K/AKT/mTOR es troba regulada per NOTCH1, IL-7R i el pre-TCR i permet la correcta integració en l'estadi de maduració DN3 dels limfòcits en el tim. En LLA-T, representa una de les vies de senyalització més importants ja que aproximadament un 85% dels casos presenten alteracions. Aquestes alteracions es poden traduir en l'activació de la via de forma constitutiva, probablement com a conseqüència de la inactivació del major regulador de la via, PTEN. L'activació aberrant porta associada una millora en el metabolisme cel·lular, una anormal proliferació, supervivència, entrada en cicle cel·lular així com la resistència a quimioteràpia (João T. Barata et al. 2018; Hunger et al. 2009; Neri et al. 2014; Porta, Paglino, and Mosca 2014).

Conjuntament amb aquestes vies de senyalització detallades anteriorment, existeixen altres que també presenten alteracions en LLA-T tals com RAS, quinasa ABL, NF- $\kappa$ B, Hedgehog, NFAT, WNT entre altres. En els últims anys s'han fet grans esforços per desenvolupar inhibidors específics de dianes moleculars que presenten mutacions en les diferents vies de senyalització. Estudis pre-clínic mostren que inhibidors tals com rapamicina (inhibidor mTOR) (Araki et al. 2014; den Boer et al. 2006), LY924002, NVP-BKM120 (inhibidors PI3K/AKT) (Lonetti et al. 2014; Martelli et al. 2015), ruxolitinib (inhibidor JAK1/JAK2) (Horstmann et al. 2016; Maude et al. 2015) presenten efecte anti-leucèmic en LLA-T i podrien constituir en el futur un tractament alternatiu. Malgrat els esforços però, actualment el tractament utilitzat en LLA-T es basa en quimioteràpia.

#### **1.4.6. Tractament de LLA-T**

Avui en dia el tractament utilitzat en LLA-T es basa principalment en quimioteràpia. Actualment el tractament presenta diferents blocs clarament diferenciats en els que s'utilitzen fàrmacs i dosis variables. El primer bloc es coneix com inducció, en aquesta primera fase es pretén assolir una remissió completa de la malaltia i restaurar l'hematopoesi normal. S'utilitza vincristina, glucocorticoides i antraciclínic que s'administren durant 4-5 setmanes. Post-inducció, el tractament presenta una fase de consolidació que és variable en funció de les pautes seguides així com del risc del tipus de LLA-T. En la consolidació del tractament, es pretén aconseguir la remissió completa així com eliminar la malaltia residual. Els compostos utilitzats són els mateixos que en la fase d'inducció però en aquesta etapa el tractament s'allarga entre 3 i 4 mesos. L'última fase del tractament es coneix com la fase de manteniment i és la més llarga de totes. Pot allargar-se entre 18 i 24 mesos en funció de la durada de les etapes anteriors (Bassan and Hoelzer 2011; Fielding 2011; Gökbuget and Hoelzer 2009; Ribera 2004; Terwilliger 2017). Per abordar la infiltració de LLA-T en el CNS, paulatinament s'ha anat substituint la irradiació corporal per la quimioteràpia intratecal conjuntament amb altes dosis de metotrexat intravenós. La quimioteràpia intratecal s'administra conjuntament en totes les fases del tractament (Terwilliger 2017).

Actualment, les recaigudes en LLA-T tant en els casos pediàtrics com adults segueixen representant el major repte en el tractament. La cinètica de la recaiguda té una estreta relació amb el pronòstic, sent de pitjor pronòstic les recaigudes més primerenques. De manera general, el tractament utilitzat en les recaigudes es basa en la inclusió en un assaig clínic, el transplantament al·logènic de cèl·lules mare (SCT de les seves sigles en anglès), o bé en repetir les pautes utilitzades al diagnòstic, ja que actualment no es disposa d'un esquema de quimioteràpia de rescat (Gökbuget and Hoelzer 2009; Pierro et al. 2017).

Per tal de poder millorar els percentatges de curació en recaiguda així com evitar les recaigudes seriades, els esforços s'han intensificat en la cerca de fàrmacs amb nous mecanismes d'acció cel·lular diferents de la quimioteràpia, així com en la millor caracterització de la població cel·lular responsable d'iniciar i mantenir la

leucèmia (Bassan and Hoelzer 2011; Fielding 2011; Gökbuget and Hoelzer 2009; Ribera 2004; Terwilliger 2017).

#### **1.4.7. Cèl·lules mare leucèmiques**

La patologia del càncer és un procés extremadament complex i amb el propòsit de poder descobrir les bases moleculars i biològiques que té associades, al llarg dels anys s'han desenvolupat moltes teories. Entre aquestes, existeix la teoria de les cèl·lules mare del càncer (CSC), que pretén explicar l'heterogeneïtat tumoral, i postula la presència d'unes cèl·lules responsables d'iniciar i propagar la malaltia. El model de les CSC suggereix que en el càncer, les cèl·lules s'organitzen seguint una jerarquia caricaturitzant les organitzacions normals de molts teixits sans. Les CSC posseeixen la capacitat d'auto-renovació i situades a l'origen de la jerarquia són les responsables de donar lloc a totes les diferents poblacions cel·lulars cancerígenes que engloba cada càncer. En el model també s'atribueix un paper important a les CSC en les recaigudes, donat que les CSC són les úniques capaces d'iniciar i mantenir la malaltia, són les responsables dels episodis de les recaigudes. Per tant, l'eradicació és imprescindible per evitar la reaparició de la malaltia (Aguilar-Gallardo and Simón 2007; De Francesco, Sotgia, and Lisanti 2018; Prasetyanti and Medema 2017; Visvader 2011) Aquest model ha estat demostrat en molts tipus de càncer tals com cervell (Piccirillo et al. 2006), còlon (O'Brien et al. 2007), mama (Al-Hajj et al. 2003), pàncrees (C. Li, Lee, and Simeone 2009), estómac (Eramo et al. 2008) i en neoplàsies hematològiques tals com la leucèmia mieloide aguda (LMA) (Bonnet and Dick 1997).

En LLA-T s'han fet grans esforços per determinar si les cèl·lules mare del càncer poden tenir un paper rellevant en la malaltia i poder així millorar els percentatges de supervivència i sobretot les recaigudes. A dia d'avui, la presència de les CSC en LLA-T així com el seu paper en la malaltia, segueix sense gaudir d'un consens. Al llarg dels anys molts autors han intentat determinar el perfil immunològic així com el paper de les CSC (Agliano et al. 2008; Armstrong et al. 2009; Chiu, Jiang, and Dick 2010; C. V. Cox et al. 2006; Charlotte V. Cox et al. 2004; Gerby et al. 2011; Ma et al. 2012). Avui en dia, el coneixement sobre aquesta població és molt limitat però, es postula que en la LLA-T existeix una població de cèl·lules capaces de regenerar i mantenir la malaltia tant a nivell *in vitro* com en ratolins immunodeficients (*in vivo*)

(Chiu et al., 2010; C. V. Cox et al., 2006; Vadillo et al., 2018). En estudis *in vitro* de cultiu durant setmanes i *in vivo* amb xenotransplantaments en ratolins NSG, es van identificar dues poblacions cel·lulars amb capacitat de repoblació (CD34<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> i CD34<sup>+</sup>/CD7<sup>-</sup>) en LLA-T (C. V. Cox et al. 2006). Estudis posteriors, amb l'ús de dos models *in vivo* diferents, van determinar que la població de cèl·lules iniciadores de la leucèmia en LLA-T presenten el fenotip CD7<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup>. El model també descriu que aquesta població primitiva iniciadora de la leucèmia evoluciona en els xenotransplantaments amb la identificació de una població CD7<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> també amb potencial iniciador (Chiu, Jiang, and Dick 2010). Malgrat existeixen discrepàncies en el immunofenotip de les CSC, els estudis detallats suggereixen l'existència d'aquesta població en LLA-T.





## **2. Objectius**



La leucèmia limfoblàstica aguda T malgrat els avenços, és una malaltia de mal pronòstic, el tractament de la qual es basa en quimioteràpia. La necessitat de desenvolupament de noves teràpies respon a la toxicitat de les actualment establertes així com als percentatges d'èxit que, malgrat les grans millores, segueix sent baix.

Abans de l'inici d'aquesta tesi doctoral, es va determinar per Sachlos et al que el receptor de dopamina podria ser una possible diana terapèutica per atacar selectivament les cèl·lules mare del càncer. Conjuntament amb aquest important precedent, al laboratori existien evidències prèvies que compostos anti-dopaminèrgics selectius presentaven efecte antileucèmic en altres models d'estudi com la leucèmia mieloide aguda, les síndromes mielodislàstiques i la leucèmia mielomonocítica crònica. En base a aquestes observacions es va construir la hipòtesi que els compostos antidopaminèrgics podrien esdevenir tractaments potencials per la LLA-T i que el receptor de dopamina (DR per les sigles en anglès) podria ser rellevant per a les cèl·lules leucèmiques.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat determinar la rellevància per la LLA-T del receptor de dopamina i l'acció dels seus antagonistes. Per a la posada en pràctica de l'objectiu principal es van proposar els següents objectius específics:

1. Estudi preclínic del potencial dels agents anti-dopaminèrgics
2. Estudi de l'expressió del DR en LLA-T i de la seva rellevància patofisiològica
3. Estudi dels mecanismes d'acció dels anti-dopaminèrgics associats a la seva acció anti-leucèmica



### **3. Metodologia**



### 3.1. Materials

#### 3.1.1. Línies i cultius cel·lulars

Totes les cèl·lules humanes utilitzades en aquest treball van ser cultivades a 37°C i al 5% de CO<sub>2</sub> en medi suplementat amb 5% de sèrum fetal boví (FBS) (Biowest), 2mM de L-glutamina (Gibco) i 1mM d'aminoàcids no essencials de MEM (Biowest). Les línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques (CCRF-CEM, Jurkat, RPMI-8402, HL-60, MonoMac-1, KG-1 i THP-1) es van cultivar en medi RPMI1641 (Biowest). La línia cel·lular HS-5 es va cultivar en medi DMEM (Biowest). La informació principal d'aquestes línies es troba recollida a la Taula 5:

Línia cel·lular	Patologia	Procedència	Referència
Jurkat	LLA-T	IMIM (Dra. Bigas)	(Foley et al. 1965; Huang et al. 1974; Weiss, Wiskocil, and Stobo 1984)
RPMI-8402			
CCFR-CEM			
HL-60	LMA	DSMZ	Dalton et al.,1988; Gallagher et al., 1979; Koefler & Golde, 1978; Steube, Teepe, Meyer, Zaborski, & Drexler, 1997; Tsuchiya et al., 1982
KG-1			
MonoMac-1			
THP-1			
HS-5	Estroma de MO	ATCC	(Roeklein and Torok-Storb 1995)

**Taula 5. Informació de les línies cel·lulars.** LLA-T, leucèmia limfoblàstica aguda T; LMA, leucèmia mieloide aguda; IMIM: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques; DSMZ, col·lecció alemanya de microorganismes i cultius cel·lulars.

#### 3.1.2. Mostres primàries

Les mostres de pacients de LMA van ser obtingudes de les col·leccions de mostres de l'Hospital Clínic de Barcelona (C.0000397) i de l'Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Campus ICO-IGTP (C.0002922). L'estudi va ser aprovat pels comitès ètics de recerca clínica dels hospitals corresponents, i es va obtenir el consentiment informat dels pacients d'acord amb la Declaració de Hèlsinki.



La mostra de LLA-T va ser generosament cedida pel grup del Dr. Felipe Prósper (Vilas-Zornoza et al. 2012). Les mostres de sang de cordó umbilical i les capes leucocitàries de donants sans van ser obtingudes del Banc de Sang i Teixit, amb l'aprovació del comitè ètic de l'Hospital universitari Vall d'Hebron.

La sang perifèrica, sang de cordó umbilical i sang de medul·la òssia, van ser barrejats amb PBS, i es van aïllar les cèl·lules mononucleades (MNC) per centrifugació en gradient de Ficoll( Ficoll-Paque, GE Healthcare). En les mostres de sang de cordó umbilical, es va dur a terme una depleció de llinatge en columna mitjançant per anticossos emprant el *Linage cell Depletion kit* (Milteny Biotec) i els estudis es van realitzar amb la fracció negativa (Lin-), enriquida en la població primitiva.

Per al cultiu de cèl·lules de mostres primàries de LMA es va emprar el medi IMDM (Biowest) suplementat amb el 3% de FBS, 2mM L-glutamina (Gibco), 1mM aminoàcids no essencials de MEM (Biowest), 100U/mL penicil·lina (Biowest), 100 µg/mL estreptomicina (Biowest), 1mM piruvat sòdic (Gibco), 20% de BIT9500 (Stem Cell Technologies), 5ng/ml IL-3 (PeproTech) i  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich). Per al cultiu de cèl·lules primàries de LLA-T es va emprar el medi IMDM suplementat amb 2mM L-glutamina, 1mM aminoàcids no essencials de MEM, 100U/mL penicil·lina, 100 µg/mL estreptomicina, 50ng/ml IL-2 (PeproTech), 20ng/ml IL-3 (PeproTech), 50ng/ml SCF (PeproTech), 20ng/ml FLT3 (PeproTech) i  $5 \times 10^{-5}$  M BME. Per al cultiu de les cèl·lules de mostres de sang de cordó umbilical es va emprar el medi IMDM suplementat amb 1% de BSA (Sigma-aldrich), 1mM aminoàcids no essencials de MEM (Biowest), 1mM piruvat sòdic, 100U/mL penicil·lina, 100 µg/mL estreptomicina, 20 ng/ml TPO (PeproTech), 100ng/ml FLT3L (PeproTech), 100ng/ml SCF i  $5 \times 10^{-5}$  M BME.

### **3.1.3. Compostos**

Tots els compostos emprats al present estudi es van resuspendre en H<sub>2</sub>O (Thermo Fischer Scientific), DMSO (Sigma-aldrich) o etanol (VWR), seguint les instruccions del proveïdor, i es van conservar a -80°C a una concentració d'entre 5 i 10mM segons les característiques de solubilitat de cada compost Taula 6.

<b>Nom</b>	<b>Proc.</b>	<b>Acció</b>	<b>Referència</b>	<b>Núm. CAS</b>	<b>Solv.</b>
SCH-23390	Toc	Ant. DRD1 i DRD5	(Bourne 2001)	12594-1-87-9	H <sub>2</sub> O
SKF-38393	Toc	Ag. DRD1 i DRD5	(Sibley, Leff, and Creese 1982)	20012-10-6	DMSO
UH-232	Toc	Ant. DRD2	(Svensson et al. 1986)	12174-73-50-1	H <sub>2</sub> O
Sulpiride	Toc	Ant. DRD2 i DRD3	(Trabucchi, Longoni, and Fresia 1975)	23672-07-3	DMSO
Sonepipazrole	Toc	Ant. DRD4	(Merchant et al. 1996)	17085-8-33-0	DMSO
Nemonaprida	Toc	Ant. DRD4	(Terai et al. 1983)	75272-39-8	DMSO
L741-742	Toc	Ant. DRD4	(Rowley et al. 1996)	87488-2-93-6	DMSO
RBI-257	SCBT	Ant. DRD4	(Kula, Baldessarini, and Keabian 1997)	19403-8-94-3	DMSO
Prednisona	SA	Ag. Glucocorticoides	(Warburg, Wind, and Negelein 1927)	53-03-2	H <sub>2</sub> O
Vincristina sulfat	Ab	Inhibidor Tubulina I	(Jordan, Hirnes, and Wilson 1985)	2068-78-2	H <sub>2</sub> O
Busulfan	SA	Mieloblador	(Galton 1953)	55-98-1	DMSO
Dopamina	SA	Ag. Receptor de dopamina	(Carlsson, Lindqvist, and	51-61-6	H <sub>2</sub> O

			Magnusson n.d.)		
LY-233053	Toc	Ant. GluN2A-D	(Schoepp, David, and Lilly 1990)	12554 6-04-5	H <sub>2</sub> O
L701324	Toc	Ant. GluN1 GluN2A-D	(Bristow et al. 1995)	14232 6-59-8	DMSO
Donepezil	Toc	Inhibidor ACHE	(Galli et al. 1994)	12001 1-70-3	H <sub>2</sub> O
Neostigmina	Toc	Inhibidor ACHE	(Eastman et al. 1995)	59-99- 4	DMSO
Levallorphan	SA	Ant. $\mu$ -receptor	(Hamilton and Cullen 1953)	152- 02-3	H <sub>2</sub> O
Almivopan	SA	Ant. $\mu$ -receptor	(Schmidt and Ph 2001)	15605 3-89-3	DMSO
NE-100	Toc	Ant. $\sigma$ -no opioide receptor	(Okuyama et al. 1993)	149409- 57-4	DMSO
BD-1047	Toc	Ant. $\sigma$ -no opioide receptor	(Matsumoto et al. 1995)	138356- 21-5	H <sub>2</sub> O
PRE-084	Toc	Ag. $\sigma$ -no opioide receptor	(Su et al. 1991)	138847- 85-5	H <sub>2</sub> O
Etopòsid	SCBT	Inh. TopoII	(Minocha and Long 1984)	33419- 42-0	DMSO
Rotenona	Toc	Inh. CTEM	(Cherednichen ko et al. 2004)	83-79- 4	DMSO
Cloroquina	Enzo	Lisosomòtrop	(Djehiche, Segalen, and Chambon 1996; Suzuki et al. 2002)	54-05- 7	H <sub>2</sub> O

3-Metiladenina	SA	Inh. Autofàgia	(Seglen and Gordon 1982)	5142-23-4	H <sub>2</sub> O
DEUP	SA	Inh. Lipòlisi	(Gocze and Freeman 1992)	897.83.6	DMSO
Etomoxir	SA	Inh. CPT-1	(Agius, Meredith, and Sherratt 1991)	82893-4-41-4	H <sub>2</sub> O
$\alpha$ -tocoferol	SA	Captador ROS lipídic	(Ágoston et al. 2003)	10191-41-0	EtOH

**Taula 6. Relació de compostos emprats.** Solv., solvent; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; SA, Sigma-aldrich; Toc, Tocris; Ab, Abcam; Enzo, Enzo Life Science; Ag, agonista; Ant, antagonista o agonista invers; Inh, inhibidor; ACHE, acetilcolinesterasa; CTEM, cadena transportadora d'electrons mitocondrial.

### 3.1.4. Anticossos acoblats a fluoròfor

Els anticossos acoblats a fluoròfor emprats per a citometria de flux es troben recollits a la Taula 7.

Anticòs	Clon	Proveïdor	Fluorocrom
CD3	HIT3a	BD	APC
CD4	RPA-T4	BD	FITC
CD8	HIT8a	BD	PE
CD11b/Mac-1	ICRF44	BD	PE
CD13	WM15	BD	PE
CD13	WM15	AB D serotec	Alexa 647
CD14	M5E2	BD	FITC
CD45	HI30	BD	FITC, PE, APC, V450

**Taula 7. Informació dels anticossos de marcadors humans.**

Els anticossos emprats per a la detecció de proteïna via Western Blot. Per a la immunodetecció, es van emprar els anticossos primaris llistats a la Taula 8, i

anticossos secundaris *IRDye*® 800 CW i *IRDye*® 680 CW (LI-COR) seguint les indicacions del sistema d'immunodetecció Odyssey (LI-COR).

Anticòs	Clon	Casa Comercial
LC3	#2775	Cell Signaling Technology
GAPDH	6C5	Thermo Fischer Scientific

**Taula 8. Llistat d'anticossos emprats per a Western Blot.**

Per a l'anàlisi de l'expressió de DRD4 a la membrana per citometria de flux es va emprar l'anticòs primari de conill anti-DRD4 humà (324405, MERK), i l'anticòs secundari *P-phycoerythrin goat anti-rabbit IgG (H+L)* (Life Technologies).

Per a l'anàlisi de l'expressió del receptor no opioide  $\sigma$  és va fer servir l'anticòs primari de conill anti-SIGMAR1 humà (ABIN6147770, Antibodies Online), i l'anticòs secundari *P-phycoerythrin goat anti-rabbit IgG (H+L)* (Life Technologies).

## 3.2. Mètodes

### 3.2.1. Generalitats i estadística

Tots els experiments de citometria de flux de la present tesi s'han realitzat amb el citometre FACSCanto II (Becton Dickinson) i els resultats han estat analitzats en tots els casos amb el software FloJo (Tristar). Als experiments per citometria de flux es va fixar el negatiu de tinció amb un control unstained (sense cap tinció), i es van compensar adequadament els diferents canals d'emissió amb controls unitaris de tinció per corregir els *spillover* de fluorescència entre ells. Els test estadístics s'han realitzats amb el programa GraphPad Prism® 6.01 (GraphPad software). Per als experiments en línies cel·lulars s'ha assumit una distribució gaussiana i s'han realitzats proves t de Student no aparellades bilaterals amb un nivell de confiança del 95%. En algun cas (experiments de proliferació) s'han realitzats test ANOVA de mesures repetides de dos factors. Totes les barres d'error mostrades als gràfics de barres d'aquest treball corresponen a l'error estàndard de la mitjana (SEM), mesura adoptada com a estàndard al grup de recerca en tenir en compte tant la variabilitat com la mida de la mostra representat per tant la certesa relativa sobre aquell valor. S'han considerat estadísticament significatius valors de  $p < 0,05$ , i s'ha emprat la

següent nomenclatura de significació: \*o # p<0,05; \*\*o ## p<0,01; \*\*\*o ### p<0,001; \*\*\*\*o #### p<0,0001.

### **3.2.2. Estudis de supervivència i proliferació**

El comptatge de cèl·lules vives per a la preparació d'experiments es va efectuar en un hemocitòmetre (cambra de Neubauer, VWR) amb la tinció de blau tripan (Sigma-Aldrich) per a la discriminació de viabilitat. En els experiments de citometria de flux, els anàlisis es van realitzar dins la població de cèl·lules vives, identificades pel perfil característic de FSC-SSC, negatives per a 7-AAD (eBioscience) i amb un patró correcte de la tinció positiva per Hoechst33342 (Sigma-Aldrich), per detectar les partícules amb nucli i descartar les cèl·lules fusionades. El comptatge és possible per l'existència d'un comptatge volumètric. En alguns casos i per motius de solapament amb altres tincions es va emprar només una de les dues mesures de viabilitat. .

#### **3.2.2.1. Citotoxicitat**

Per a l'estudi de l'efecte citotòxic dels compostos en línies cel·lulars, es van sembrar en plaques de 96 pous. El nombre de cèl·lules sembrades depèn del temps de tractament, sent aquesta relació inversament proporcional. Així doncs, es van sembrar  $2 \times 10^5$ ,  $3,5 \times 10^5$  i  $5 \times 10^5$  cèl·lules/mL en experiments de 72h, 48h i 24h de tractament respectivament amb els compostos a la concentració indicada. Es van emprar sempre controls de vehicle afegint volums equivalents de solvent (generalment 1:500). Passat el temps adient, es va analitzar la viabilitat cel·lular per comptatge volumètric i considerant el perfil adequat de FSC-SSC i el marcatge amb els marcadors de viabilitat anteriorment esmentats. En el cas de les mostres primàries, el procediment va ser similar, sembrant-se però entre  $5-10 \times 10^5$  cèl·lules/mL i distingint les diferents poblacions mitjançant anticossos per a marcadors de diferents llinatges.

##### **3.2.2.1.1. Càlcul de concentracions efectives mitjanes (EC<sub>50</sub>)**

El càlcul de les EC<sub>50</sub> (concentració a la qual un compost indueix la meitat del seu efecte màxim) es va realitzar en base a dades de citotoxicitat després del tractament amb un ampli ventall de concentracions d'un compost, obtingudes com s'ha descrit

a l'apartat 3.2.5.1. Els valors de EC50 es van obtenir mitjançant el software GraphPad Prism (*Variable slope-four parameters*).

### **3.2.2.2. Efecte citotòxic de combinació de compostos**

Per analitzar l'efecte citotòxic de la combinació de compostos (vincristina, DEUP) amb els antidopaminèrgics (L741-742, nemonaprida i RBI-257). Es va mesurar l'efecte citotòxic de les diferents (veure l'apartat 3.2.5.1) i es va estudiar la naturalesa de la combinació mitjançant el càlcul dels EOBA (*Excess over Bliss Additivism*)(Berenbaum 1981; Roecklein and Torok-Storb 1995).

### **3.2.2.3. Anàlisi de reversions de la citotoxicitat**

Al llarg del present treball s'ha volgut analitzar la capacitat de diversos compostos de revertir els efectes citotòxics induïts per els antidopaminèrgics. Aquests experiments s'han realitzat seguint el procediment descrit a l'apartat 3.2.2.1., tractant amb combinacions de compostos simultània (dopamina, 3MA) o pretractat les cèl·lules durant 1h ( $\alpha$ -tocoferol).

### **3.2.2.4. Co-cultiu amb cèl·lules d'estroma**

Cèl·lules de la línia cel·lular estromal HS-5 ( $2 \times 10^5$  cèl·lules/mL), es van tenyir 30 minuts amb  $2,5 \mu\text{M}$  de la sonda CFSE (Thermo Fischer Scientific) per a la posterior identificació per citometria i es van cultivar 24h. Passat aquest temps d'adhesió a la placa, es van afegir cèl·lules de línies cel·lulars limfoides en contacte directe ( $2 \times 10^5$  cèl·lules/mL), es van aplicar els tractaments corresponents i es van analitzar per citometria de flux la viabilitat cel·lular a les 72h de les cèl·lules de LLA-T (identificades com a CFSE negatives).

### **3.2.2.5. Assaig proliferació amb CFSE**

Per a l'anàlisi de la proliferació cel·lular de línies cel·lulars, es va emprar el colorant vital CFSE (CellTrace™ CFSE Proliferation kit, Thermo Fischer), que tenyeix de forma inespecífica els lípids de la membrana plasmàtica. Al dividir-se la cèl·lula, la tinció es distribueix de forma homogènia entre la progènie i es redueix la intensitat per cèl·lula. Un total de  $3 \times 10^5$  cèl·lules/mL per condició es van tenyir amb CFSE  $2,5 \mu\text{M}$  30' a  $37^\circ\text{C}$  i posteriorment es van rentar, resuspendre en medi complet i sembrar

en plaques. Es van afegir els compostos indicats a les concentracions corresponents i als dies 1, 2,3,4 es va retirar la meitat del medi, es va analitzar la tinció per CFSE per citometria de flux i es va afegir el mateix volum de medi complet que havia estat sostret.

### **3.2.2.6. Assaig del cicle cel·lular**

Per estudiar els canvis en el cicle cel·lular induïts per certs estímuls, es van cultivar cèl·lules en medi sense FBS durant 24h per aconseguir-ne la sincronització. Les cèl·lules sincronitzades es van tractar 24h amb els diferents estímuls. Posteriorment, van ser rentades amb tampó Sali fosfat (PBS) + 0,5mM EDTA i fixades amb etanol al 70% fred durant 18h. Transcorregut aquest temps, es van rentar i tenyir amb Hoechst33342 a 100nM i posteriorment adquirir per citometria de flux. Les diferents fases del cicle cel·lular es van discriminar pel contingut de DNA seguint el model Dean-Jett-Fox (Dean and Jett 1974). Després de descartar els doblats. Les cèl·lules en fase subG0 i super G2/M es van descartar de l'anàlisi, i es va recalculer el 100% com la suma de G0/G1, S i G2/M.

### **3.2.3. Anàlisi d'expressió de proteïnes en superfície**

#### **3.2.3.1. Anàlisi d'expressió de DRD4 en superfície**

Per a l'anàlisi de l'expressió del receptor DRD4 a la membrana per citometria de flux es va utilitzar l'anticòs anti-DRD4 anteriorment especificat. Després de l'adquisició citomètrica de les cèl·lules, es van analitzar dins les cèl·lules vives segons el cas el percentatge de cèl·lules que expressaven DRD4 i segons el cas la mitjana d'intensitat de la fluorescència (MFI). En la mostra primària de PDX de LLA-T es va realitzar l'anàlisi dins de les diverses poblacions, CD3.

### **3.2.4. Estudis de mort cel·lular i apoptosi**

#### **3.2.4.1. Tinció amb annexina V**

Per estudiar una de les característiques associades a la mort cel·lular per apoptosi, la translocació de fosfatidilserina a la cara exterior de la membrana plasmàtica, es va emprar la tinció amb annexina V acoblada a fluoròfor (Annexina V-PE apoptosi detection kit, BD) que es reconeix la fosfatidilserina. Es van tractar  $2,3 \times 10^5$  cèl·lules de les línies cel·lulars de LLA-T/mL amb els compostos a les concentracions



indicades i es van tenyir amb annexina V seguint les instruccions del proveïdor. Es va afegir, també, la sonda vital 7AAD, i es van analitzar les tincions per citometria de flux.

#### **3.2.4.2. Anàlisi de l'activació de caspases efectores**

Per analitzar l'activació de caspases efectores es va emprar el kit basat en luminescència *CaspaseGlo® 3/7 Assay* (Promega). Es van sembrar  $4 \times 10^5$  cèl·lules/mL en plaques de 96 adients per a assaig de luminescència (Thermo Fisher) i es van tractar 6 o 24h amb els compostos indicats (50µL volum final). Es va analitzar la luminescència mitjançant un aparell Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek) seguint les indicacions del fabricant.

#### **3.2.5. Estudi del compartiment autofàgic**

Per a l'estudi del compartiment autofàgic, es va emprar la sonda fluorescent *CytoID* (CYTO-ID® Autophagy detection kit, Enzo life Sciences). La sonda CytoID s'acumula a pre-autofagosomes, autofagosomes i autolisosomes, però no als lisosomes, permetent una tinció específica de vacúols autofàgics.

Per a l'anàlisi via citometria de flux es van tractar cèl·lules de línies cel·lulars de LLA-T o bé PDX LLA-T en les condicions indicades als temps indicats, es van rentar amb PBS i es van incubar 30' a 37°C amb PBS amb 5% FBS, Hoechst 33342, 7-AAD i CYTO-ID green fluorescent dye a una dilució 1:4000. Passat aquest temps les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van adquirir per citometria de flux, analitzant-se la fluorescència del canal FITC dins de la població de cèl·lules vives.

Per a l'anàlisi via microscòpia de fluorescència, es van tractar 200.000 cèl·lules el temps indicats. Les cèl·lules es van adherir a cobreobjectes compartimentats de 8 pous µ-Slide (Ibidi) prèviament tractats amb 50 µg/ml poli-L-lisina. Les cèl·lules es van rentar amb medi complet i es van incubar 1h amb 1/4000 de CytoID i 100nM Hoechst33342 a 37°C en foscor.

Les cèl·lules es van observar en viu, a 37°C i CO<sub>2</sub> 5%. Es va emprar el microscopi confocal Zeiss LSM880 amb un objectiu plan apocromàtic 63x amb obertura numèrica 1,4.

### **3.2.6. Estudi del compartiment lisosomal**

Per a l'estudi del compartiment lisosomal, es va emprar la sonda fluorescent *Lysotracker Deep Red* (Thermo Fisher). Aquesta consisteix en un fluoròfor vinculat a una base feble només parcialment protonada a pH neutre. Això permet que aquestes sondes creuin membranes amb facilitat i es localitzin amb alta selectivitat a orgànuls àcids en cèl·lules vives.

Per a l'anàlisi via citometria de flux, es van rentar amb Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), es van incubar amb 50nM Lysotracker DeepRed (Thermo Fisher) i Hoechst 33342. Les condicions d'incubació són les mateixes utilitzades en el compartiment autofàgic. Passat el temps les cèl·lules es van rentar amb HBSS i es van adquirir per citometria de flux, analitzant-se la fluorescència de la població de cèl·lules vives.

Per a l'anàlisi via microscòpia de fluorescència, es van utilitzar els mateixos cobreobjectes esmentats en el compartiment autofàgic. Les cèl·lules es van rentar amb medi complet i es van incubar 1h amb 100nM Lysotracker Deep Red i Hoechst33342 a 37°C en foscor.

### **3.2.7. Estudi del compartiment mitocondrial**

#### **3.2.7.1. Anàlisi d'espècies reactives d'oxigen mitocondrials mitjançant MitoSOX**

Per a la detecció d'espècies reactives d'oxigen mitocondrials (mitROS), es van tractar línies cel·lulars de LLA-T amb els compostos a la concentració indicada als temps indicats i es va determinar el nivell de superòxids mitocondrials mitjançant el MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Thermo Fischer Scientific). Les cèl·lules es van rentar amb HBSS, es van incubar amb HBSS+MitoSOX 5 µM + Hoechst 33342 10' a 37°C i es van rentar de nou amb HBSS abans de ser adquirides per citometria de flux.

### **3.2.7.2. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial mitjançant rodamina-123**

Per analitzar els efectes dels fàrmacs sobre el potencial de membrana, es va emprar el colorant fluorescent catiònic rodamina-123, que s'acumula als mitocondris i la fluorescència del qual es desactiva de manera proporcional a la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial. Es van sembrar cèl·lules de línies cel·lulars de LLA-T i es van tractar amb els compostos indicats a XX. Passat aquest temps, es va realitzar un rentat amb PBS i es van tenyir les cèl·lules amb rodamina-123 (10  $\mu$ M, Thermo Fischer) 20' a 37°C. Es va realitzar un altre rentat amb PBS i se'n va analitzar la fluorescència per citometria de flux.

### **3.2.8. Estudi dels lípids neutres cel·lulars**

Per a l'estudi del contingut lipídic total cel·lular, es va emprar la sonda fluorescent Bodipy 493/503 (Sigma-aldrich). Aquesta sonda presenta una estructura hidrofòbica que permet l'entrada ràpida i fàcil en ambients no-polars de la cèl·lula com els *lipid droplets*.

Per a l'anàlisi via citometria de flux, es van tractar cèl·lules de línies cel·lulars en les condicions indicades als temps indicats. Passat aquest temps, es va realitzar un rentat amb PBS + 5% FBS i es va tenyir les cèl·lules amb Bodipy 493/503 a 2,5  $\mu$ M 7AAD i Hoechst33342 durant 20' a 37°C. Es va realitzar un altre rentat amb PBS + 5% FBS i se'n va analitzar la fluorescència per citometria de flux.

Per a l'anàlisi via microscòpia de fluorescència, es van seguir les mateixes indicacions de sembra i preparació de les cèl·lules esmentades anteriorment. Les condicions de tinció van ser exactament iguals que les emprades per citometria de flux.

### **3.2.9. Estudi dels fosfolípids**

Per a l'estudi dels fosfolípids es va emprar la sonda fluorescent  $\beta$ -Bodipy C12 500/510 (Thermo Fischer). Aquesta sonda presenta una estructura de fosfolípids, és intrínsecament lipofílica el que permet mimetitzar més fàcilment les propietats dels lípids. El seu ús està descrit per l'estudi de membrana i pel seguiment lipídic. La

incubació d'aquesta sonda a concentració 1µM es va realitzar al mateix moment que el tractament amb els compostos els temps indicats en cada condició.

En els anàlisis de citometria de flux, les cèl·lules es van rentar amb PBS + 5% FBS i es van tenyir amb 7AAD i Hoechst33342 durant 15' a 4°C. Es va realitzar un altre rentat amb PBS + 5% FBS i s'en va analitzar la fluorescència per citometria de flux.

En els anàlisis de microscòpia, es van utilitzar els mateixos cobreobjectes esmentats anteriorment. Les cèl·lules es van rentar amb medi complet i es van incubar durant 15' amb 100nM Hoechst33342 a 37°C en foscor.

### **3.2.10. Estudi dels fosfolipidosi**

Per a l'estudi de la fosfolipidosi es va emprar la sonda *HCS LipidTOX Phospholipidosis Green* (Thermo Fischer). Aquesta sonda està descrita per la caracterització de la fosfolipidosi induïda en resposta la tractament amb compostos sobre el metabolisme lipídic en línies cel·lulars de mamífer.

Per a l'anàlisi de citometria de flux, les cèl·lules es van tractar amb els compostos indicats durant el temps indicats, posteriorment es van rentar PBS + 5% FBS i es van tenyir amb HCS LipidTOX Phospholipidosis Green a 1/1000 , 7AAD i 100nM Hoechst33342 durant 45' a 37°C. Es va realitzar un altre rentat amb PBS + 5% FBS i s'en va analitzar la fluorescència per citometria de flux.

Per a l'anàlisi per microscòpia de fluorescència, es van seguir les mateixes indicacions de sembra i preparació de les cèl·lules esmentades anteriorment. La tinció realitzada es va dur a terme d'igual manera que per als experiments de citometria de flux excloent l'ús de 7AAD.

### **3.2.11. Assaig de clonogeneicitat**

Per a l'estudi de la capacitat d'autorenovació i diferenciació es van realitzar assaig de clonogeneicitat. Un total de 1.000 cèl·lules de línies cel·lulars de LMA, 1.000 cèl·lules lin- sang de cordó umbilical o 50.000 cèl·lules de mostres primàries de LMA es van tractar a la concentració indicada en el medi corresponent durant 18h. Passat aquest temps, es van barrejar amb 1 mL de *MethoCult H4435 Enriched* (Stem Cell

Technologies) i es van sembrar per duplicat en plaques de 24 pous, Les unitats formadores de colònies (CFU) es van comptar en base a la seva morfologia i cel·lularitat a dia 7 (línies cel·lulars) o a dia 14 (mostres primàries de LMA, mostres cordó umbilical).

### **3.2.12. Estudis *in vivo***

Tota la recerca amb implicació d'animals d'experimentació descrita en aquest estudi s'ha realitzar d'acord amb els procediments aprovats pel corresponents Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona, i en compliment d'allò establert al Reial Decret 53/2013, pel qual s'estableixen les normes bàsiques aplicables per a la protecció dels animals utilitzats en experimentació i altres finalitats científiques.

Per a l'estudi *in vivo* s'ha treballat amb ratolins immunodeficients NOD-*scid* IL2R gamma<sup>null</sup> (NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ*, NSG) procedents del Jackson Laboratory. Aquest model de ratolins és el que s'ha descrit fins al dia d'avui que permet un empelt de poblacions hematopoètiques amb major eficiència (Agliano et al. 2008; Sarry et al. 2011).

Els animals es van mantenir en condicions estèrils, estabulats en gàbies ventilades amb aire filtrat i manipulats en campanes de flux laminar. Es va subministrar una dieta ordinària de laboratori, amb accés a aigua i menjar *ad libitum*. La temperatura es va trobar controlada entre 22-24°C i es va aplicar un cicle de llum-fosc de 12h.

Els experiments es van realitzar amb ratolins d'entre 6 i 8 setmanes d'edat, i es van mieloblacionar amb l'administració intraperitoneal de 30mg/kg de busulfan (Sigma-Aldrich) 24h abans de la injecció de cèl·lules.

#### **3.2.12.1. Xenotransplantaments amb línies cel·lulars**

Es van injectar per via intravenosa  $2 \times 10^6$  cèl·lules de la línia cel·lular Jurkat resuspesa en solució fisiològica (0,9% NaCl, Sigma Aldrich) i es van deixar 6 dies sense tractar per permetre l'empelt de les cèl·lules humanes. Passat aquest temps es van administrar 4 dies en dies consecutius L741-742 5mg/kg, nemonaprida i RBI-

257 20mg/kg per via intraperitoneal. Atesa la baixa solubilitat dels compostos, es va preparar un estoc en DMSO, que es va diluir 1:10 en sèrum salí. El volum total va ser injectat de 10 µl per gram de ratolí. Passats els 4 dies de tractament es van sacrificar els ratolins per dislocació cervical i se'n va extreure tíbies i fèmurs i melses. Les cèl·lules de del moll d'aquests ossos es van obtenir per mòlta en tampó PBS + 0,5mM EDTA + 0,5% BSA, i les poblacions presents es van analitzar per citometria de flux, identificant les cèl·lules leucèmiques mitjançant anticossos de CD45 humà i considerant l'empelt com el percentatge de cèl·lules hCD45+ d'entre totes les cèl·lules vives del moll i melsa.

### **3.2.12.2. Xenotransplantaments amb mostra derivada de pacient (PDX) de LLA-T**

Cèl·lules provinents de la mostra pseudoprimària derivada de pacient de LLA-T (PDX LLA-T), es van tractar amb 18h amb el L741-742 i es van injectar intravenosament a ratolins mieloablacionats 24h abans. Es van injectar entre 0,5 i  $1 \times 10^6$  cèl·lules per ratolí, segons la disponibilitat de cèl·lules. Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical al cap de 21 dies i se'n van extreure tíbies, fèmurs, crestes ilíaqües i melsa. El processament dels ossos i melses i l'anàlisi per citometria de flux, va ser anàleg al seguit en els experiments amb línies cel·lulars.

### **3.2.12.3. Xenotransplantaments amb mostres de cordó umbilical de donant sa**

Cèl·lules mononucleades de cordó umbilical lin- (com s'ha descrit a l'apartat 3.1.2) es van tractar 18h amb L741-742 i es van injectar intravenosament a ratolins mieloblacionats 24h abans. Es van injectar entre 1,4 i  $5,5 \times 10^5$  cèl·lules per ratolí, segons la mostra emprada. Els ratolins es van sacrificar per dislocació cervical al cap de 8-10 setmanes i se'n van extreure tíbies, fèmurs, crestes ilíaqües i melses. El processament dels ossos i melses va ser anàleg al seguit en els experiments amb línies cel·lulars. Les poblacions presents es van analitzar per citometria de flux, identificant les cèl·lules humanes mitjançant anticossos de CD45 humà i considerant l'empelt com el percentatge de cèl·lules hCD45 d'entre totes les cèl·lules vives del moll. Les diferents poblacions (CD3+, CD13+, CD19+, CD34+) es van estudiar dins la població de cèl·lules vives empeltades.

### 3.2.13. Determinació de quantitat de proteïnes via *Western Blot*

Es van tractar  $10 \times 10^6$  cèl·lules de línies cel·lulars de LLA-T per condició durant 72h en medi complet amb els compostos indicats. Subseqüentment, es van lissar amb el tampó RIPA suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases (1mM benzamidina, 1mM DTT, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml aprotinina, 1mM PMSF, 1mM ortovanadat de sodi, 20 mM NaF) i es van quantificar els extractes proteics amb el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific) fent ús de l'espectrofotòmetre *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek) a 562nm.

Els extractes (fins a 60 µg per pou) es van sotmetre a una electroforesi en gel de poliacrilamida en presència d'agents desnaturalitzats i reductors (SDS i β-mercaptoetanol) i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 µm (BIO-RAD). Es van emprar anticossos primaris i secundaris detallats anteriorment per a la detecció específica de proteïnes. Les imatges es van obtenir mitjançant l'*Odyssey Infrared Imaging System*® (LI-COR). Es van fer servir GAPDH com a referència, i les bandes es van quantificar mitjançant el software Fiji.

### 3.2.14. Anàlisis bioinformàtics

#### 3.2.14.1. *Screening Mind The Byte*

Per a l'*screening* de dianes alternatives *Mind The Byte*, va emprar tres mètodes diferents de cribratge.

Mètode **Hurakan** *3D ligand-based target*, permet la selecció de dianes en base a l'estructura tridimensional del lligand. La similitud molecular es calcula a partir de la superposició de molècules mitjançant l'avaluació de la complementaritat de forma, i tenint en compte, la disposició diferencial dels grups farmacològics a l'espai tridimensional.

Mètode **Cabrakan** *2D ligand-based target*, permet la selecció de dianes en base a l'estructura 2D del lligand utilitzant la similitud molecular per predir perfils biològics de les molècules. Aquest model integra tres empremtes digitals moleculars diferents, que descriuen la molècula des de perspectives diferents. La base de dades biològica de *Mind The Byte* conté casi tres mil dianes proteiques i mig milió de lligands. El mètode Cabrakan combina la rapidesa de computació d'alt rendiment (5min/mol aproximadament) amb un alt poder de detecció.

Mètode ***Ixchel docking-based target profiling***, permet la selecció de dianes en base a l'estructura del compost. Amb l'ús de la base de dades MTB PockBD amb més de 700 models de proteïna i 2.000 butxaques d'unió, Ixchel identifica amb precisió noves dianes moleculars pel compost d'interès i detecta el mètode d'unió amb la diana (butxaca d'unió).

Es van seleccionar aquelles dianes coincidents en els tres models d'*screening* utilitzats.

#### **3.2.14.2. Array d'expressió gènica Clariom™ S**

Per a l'anàlisi d'expressió gènica es va realitzar l'*array* d'expressió Clariom™ S. Per dur a terme els *arrays* es va utilitzar la plataforma especialitzada de l'Institut de Recerca Josep Carreras.

RNA total de les cèl·lules en les condicions d'interès es va aïllar fent ús del *Total RNA Purification Kit* (Norgen Biotek) seguint les indicacions del proveïdor. L'ARN obtingut va ser sotmès a un control de qualitat doble: nanodrop i Bioanalyzer.



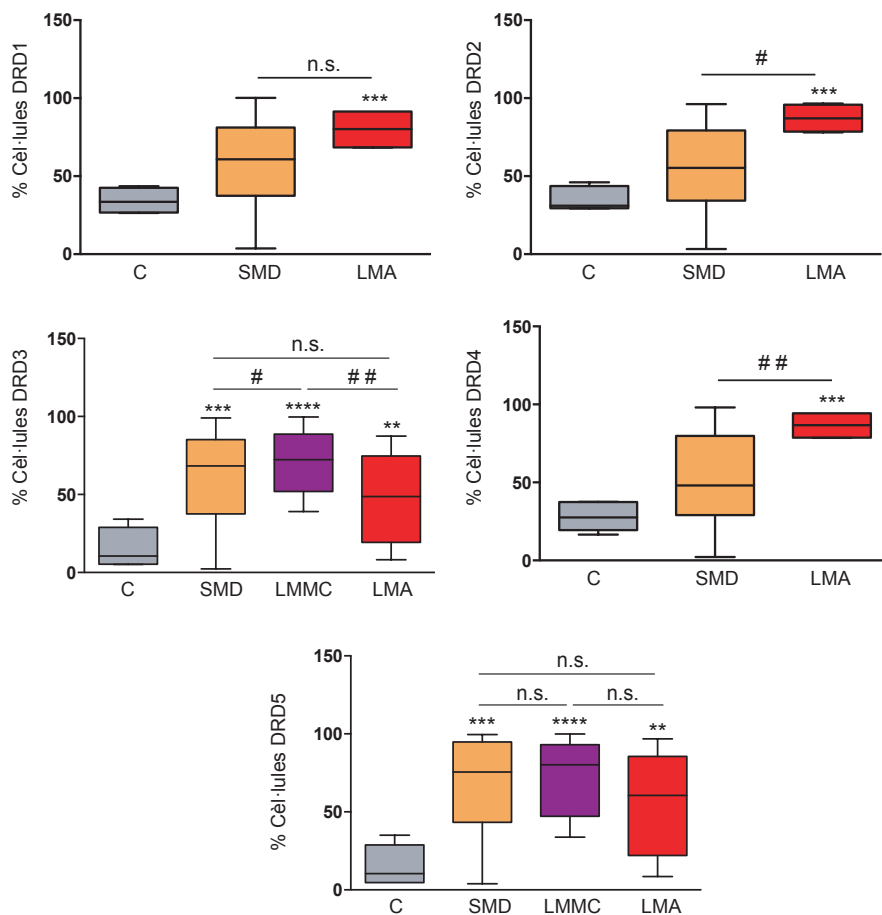


## **4. Resultats**



#### 4.1 Resultats preliminars

El present treball sorgeix a partir d'estudis realitzats anteriorment al grup de recerca conjuntament amb dades bibliogràfiques. D'una banda es parteix del precedent de la identificació del receptor de dopamina com a potencial diana terapèutica present en les cèl·lules mare del càncer, i la validació de la seva capacitat citotòxica en càncer de mama i en LMA utilitzat un antagonista del receptor de dopamina d'ampli espectre (thioridazina) (Sachlos et al. 2012). D'altra banda, en base a l'experiència del grup en neoplàsies hematològiques, es va estudiar l'expressió de la família del receptor de dopamina t en SMD i LMMC (Banús-Mulet et al. 2018)(Figura 9).



**Figura 9. Mostres primàries de SMD, LMMC i LMA expressen el receptor de dopamina tipus 1, 2 i 4.** L'expressió de DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 i DRD5 es va analitzar a la superfície cel·lular mitjançant citometria de flux. Es mostra el percentatge de cèl·lules positives en cada grup. Les caixes i els bigotis han estat creats seguint el mètode Tukey, la barra central representant la mediana. L'expressió de DRD1-DRD5 es va analitzar en cèl·lules sanes (gris) per duplicat en

cèl·lules d'entre 1-4 capes leucocitàries. L'expressió de DRD1-DRD5 en SMD (taronja) es va obtenir per duplicat i triplicat d'entre n=23-47 mostres primàries. L'expressió de DRD3 i DRD5 en LMMC (lila) es va obtenir per duplicat i triplicat en 19 mostres primàries. L'expressió de DRD1-DRD5 en LMA (vermell) es va obtenir per duplicat i triplicat d'entre 2-14 mostres primàries.

D'avant d'aquestes evidències d'expressió en SMD, LMMC i LMA, conjuntament amb el paper de dopamina com a possible diana terapèutica en cèl·lules mare del càncer, (Sachlos et al. 2012), es va hipotetitzar que antagonistes específics d'aquest receptor podrien presentar efecte citotòxic en neoplàsies hematològiques.

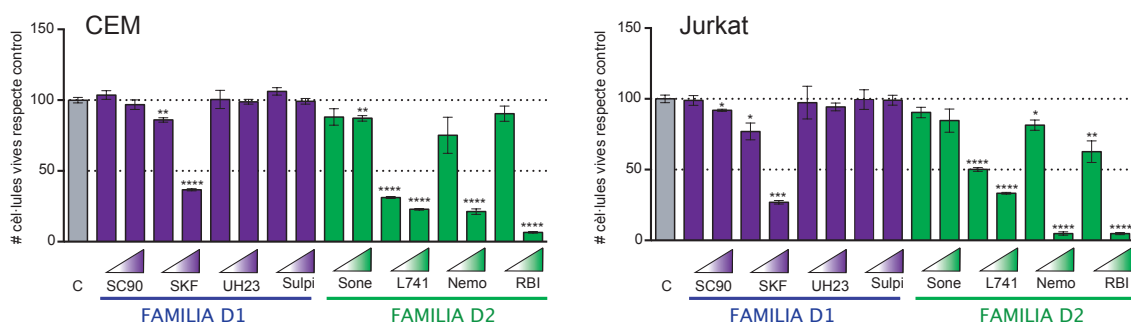
Tenint en compte que a nivell de transcriptoma la LMA presenta un elevat grau de similitud amb la LLA de llinatge T més que del llinatge B, es va decidir ampliar l'estudi dels receptors de dopamina a LLA-T (Haydu and Ferrando 2013).

## **4.2 Estudi preclínic del potencial dels antidopaminèrgics tipus 4 en LLA-T**

### **4.2.1 Estudi citotòxic en línies cel·lulars de LLA-T**

El receptor de dopamina pertany al grup de receptors amb set dominis transmembrana acoblats a proteïnes G (GPCRs). Existeixen dues famílies de receptors de dopamina. La família de dopamina tipus 1 (D1), a la qual pertanyen els subtipus DRD1 i DRD5 i l'activació dels quals es a través de la senyalització per  $G\alpha_{s/olf}$  induint l'activació de l'adenilciclasa i la producció de AMPc. La família de dopamina tipus 2 (D2), a la qual pertanyen els subtipus DRD2, DRD3 i DRD4, senyalitzen a través de  $G\alpha_{i/o}$  i inhibeixen la producció d'adenilciclasa i AMPc (Garau, et al. 1978; Keabian, et al. 1972).

Com a primera validació es va estudiar la capacitat citotòxica dels antagonistes dels diferents subtipus del receptor de dopamina en LLA-T. Cèl·lules CCRF-CEM i Jurkat es van tractar durant 72h amb antagonistes específics de les dues famílies de receptors de dopamina a 10 i 25 $\mu$ M. De la família D1, es van testar els antagonistes específics SCH-23390 (SCH23), UH-232 (UH23) i agonistes parcials SKF-38393 (SKF). De la família D2, es van avaluar els antagonistes específics sulpiride (Sulpi), sonopirazole (Sone), L741-742 (L741), nemonaprida (Nemo) i RBI-257 (RBI).



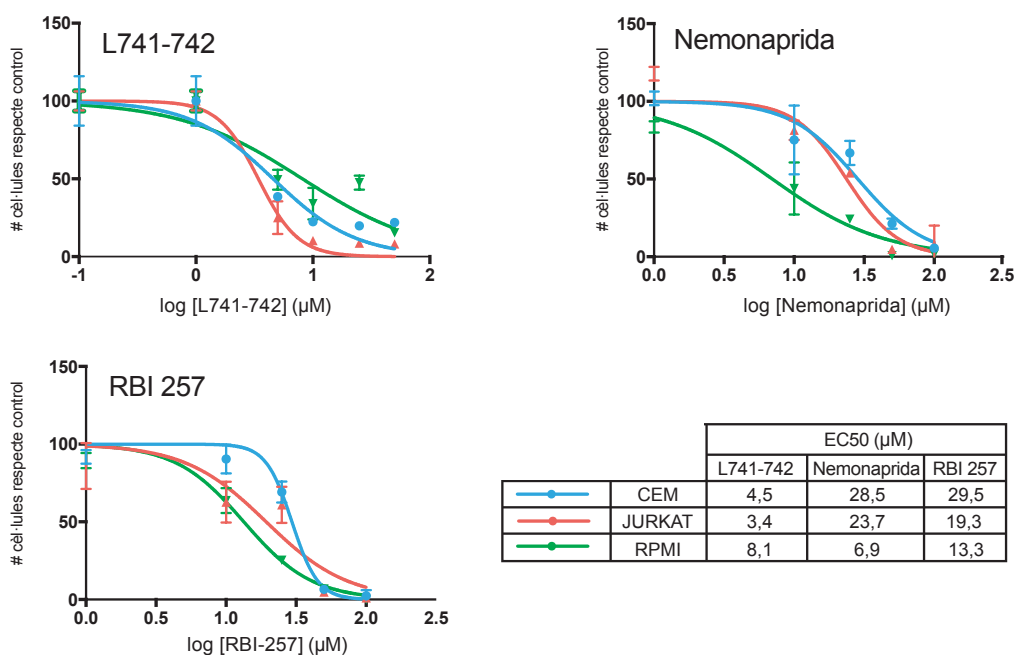
**Figura 10. Efecte antileucèmic dels agonistes i antagonistes del receptor de dopamina en línies cel·lulars de LLA-T.** Cèl·lules CEM i Jurkat es van tractar durant 72h amb control de vehicle (C) o SCH-23390 (SC90), SKF-38393 (SKF), UH-232 (UH23), sulpiride (sulpi), sonopirazole (sone), L741-742 (L741), nemonaprida (nemo) i RBI-257 (RBI) a 10 i 25  $\mu$ M. La viabilitat cel·lular es va determinar per citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats de dos experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (t-test).

Com es recull a la Figura 10, de tots els antagonistes testats, els que presentaven efecte citotòxic eren SKF-38393 i L741-742, nemonaprida i RBI-257. D'aquests 4 compostos, tres d'ells (L741-742, nemonaprida i RBI-257) són antagonistes específics del receptor de dopamina tipus 4, mentre que SKF-38393 és agonista parcial de DRD3 i DRD5. Per tant, en base als resultats obtinguts, es va decidir seguir investigant el paper del receptor de dopamina tipus 4 com a diana terapèutica, i el potencial antileucèmic dels seus antagonistes específics: L741-742, nemonaprida i RBI-257.

El primer que es va avaluar per poder assentar les bases d'aquesta tesi doctoral, va ser la toxicitat en la resta de línies cel·lulars de LLA-T així com el perfil preclínic al complet dels tres antagonistes amb activitat antileucèmica. Es van emprar 3 línies cel·lulars de LLA-T amb característiques diverses: Jurkat, la línia amb el grau de maduració més alt ( $CD2^+$ ,  $CD3^+$ ,  $CD8^-$ ,  $TCR \alpha/\beta^+$  i  $TCR \gamma/\delta^-$ ), CCRF-CEM d'en endavant CEM, una línia també madura però no al mateix grau que l'anterior ( $CD2^-$ ,  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^-$ ,  $TCR \alpha/\beta^+$  i  $TCR \gamma/\delta^-$ ) i per últim, RPMI-8402 d'en endavant RPMI, la línia més primerenca ( $CD2^+$ ,  $CD3^-$ ,  $CD4^-$ ,  $CD8^-$ ,  $TCR \alpha/\beta^-$  i  $TCR \gamma/\delta^-$ ). Cèl·lules d'aquestes línies es van tractar 72h a diferents concentracions dels antagonistes de DRD4 per establir una corba de toxicitat dosi-resposta i determinar les

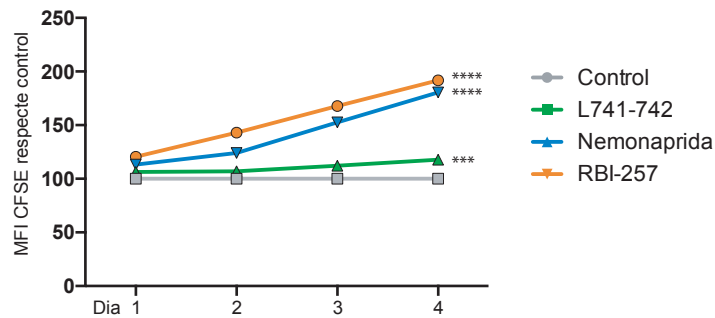
concentracions efectives 50 ( $EC_{50}$ ), i per tant, la sensibilitat d'aquestes línies cel·lulars al tractament amb els antagonistes del DRD4.

Com recull la Figura 11, les  $EC_{50}$  es trobaven en rang micromolar oscil·lant entre 3 i  $28\mu\text{M}$ . En general la línia cel·lular més sensible als tractaments va ser RPMI, i l'antagonista del receptor de dopamina més efectiu L741-742.



**Figura 11. Els antagonistes de DRD4 tenen efectes antileucèmics al rang micromolar** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb concentracions creixents de L741-742, Nemonapride i RBI-257, i la viabilitat es va analitzar a les 72h. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista, i les  $EC_{50}$  es troben recollides a la taula inferior. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM.

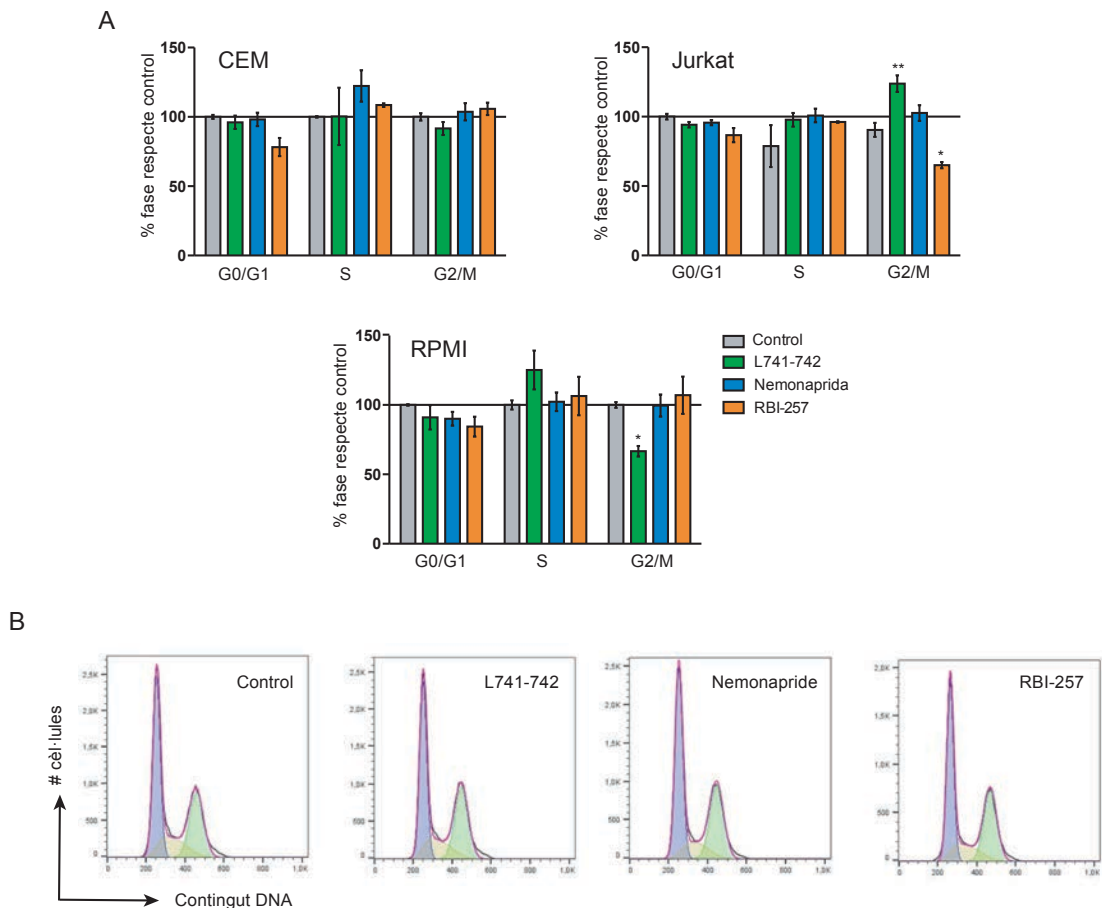
La reducció en el nombre de cèl·lules vives amb el tractament, pot ser deguda a una reducció de la proliferació o a un augment de la taxa de mortalitat. Per estudiar com afectaven els antagonistes a la proliferació cel·lular, es van realitzar experiments de proliferació utilitzant la tinció de lípids inespecífica CFSE, la qual redueix la seva intensitat amb la proliferació cel·lular. Es va utilitzar només la línia cel·lular CEM, per una manca de disponibilitat temporal de RPMI i Jurkat. Tal com s'observa a la Figura 12, els tres antagonistes avaluats indueixen una disminució de la proliferació, com s'evidencia per la disminució de la fluorescència del marcador.



**Figura 12. Els antagonistes de DRD4 disminueixen la proliferació de les línies cel·lulars de LLA-T.** Cèl·lules CEM es van tenyir amb CFSE i es van tractar amb L741-742 (10 $\mu$ M), nemonaprida (25 $\mu$ M) i RBI-257 (25 $\mu$ M). Es representa la mitjana de la intensitat de fluorescència (MFI) de CFSE analitzada per citometria respecte al control tractat amb vehicle  $\pm$  SEM a dia 1,2,3,4. \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 en test ANOVA de mesures repetides de dos factors.

Donat que els antagonistes induïen una disminució de la viabilitat i una reducció de la proliferació, el següent pas va ser determinar quina fase del cicle cel·lular s'estava afectant. Es va estudiar en les línies cel·lulars de LLA-T l'efecte sobre el cicle cel·lular per citometria de flux a les 24h de tractament. Tal com s'observa en la Figura 13, no hi ha grans canvis en el cicle cel·lular induïts amb el tractament dels antagonistes en cap línia cel·lular de LLA-T. Per tant, la disminució en la proliferació no era conseqüència d'una parada en G0/G1, sinó una inducció de la mort cel·lular.

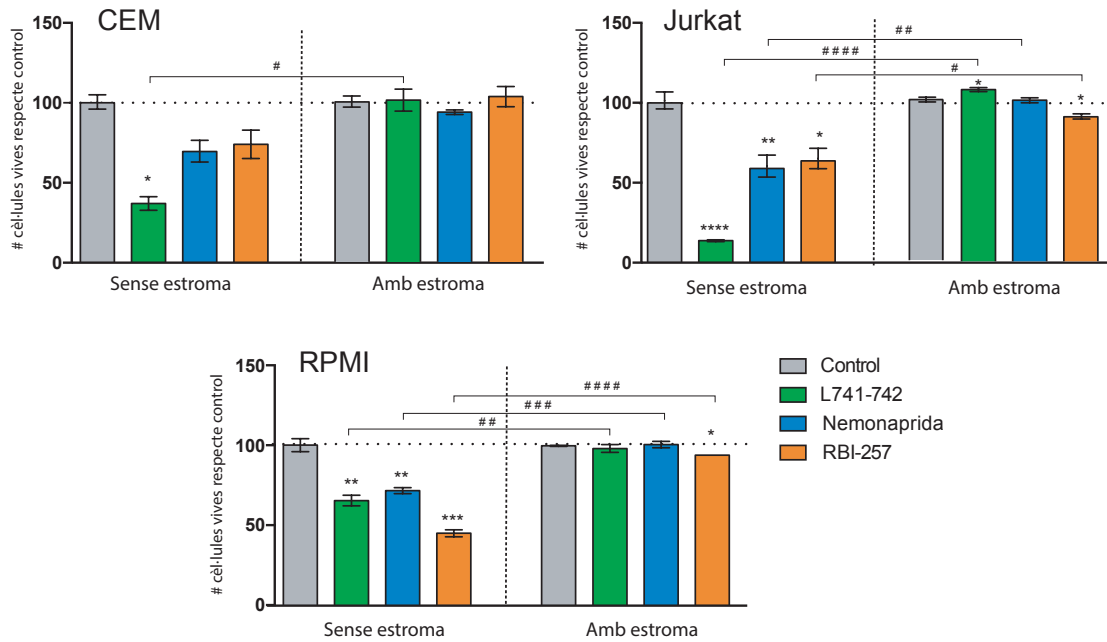




**Figura 13. Els antagonistes DRD4 no indueixen canvis importants en el cicle cel·lular.** Es van tractar cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI amb L741-742 10  $\mu$ M o nemonaprida 25  $\mu$ M i RBI-257 a 25  $\mu$ M a 24h i es va quantificar el percentatge de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular per citometria de flux. **A.** Percentatge de cèl·lules en cada fase respecte al control  $\pm$  SEM de triplicats de tres experiments independents. **B.** Imatges representatives de citometria de cèl·lules Jurkat control i tractades amb L741-742, nemonaprida i RBI-257. Fases del cicle determinades per Dean-Jett-Fox. Blau, G0/1; groc, S; verd, G2/M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (t-test).

Conjuntament amb els estudis preclínic detallats anteriorment, es va considerar rellevant analitzar l'efecte del microambient medul·lar sobre l'acció dels antagonistes de DRD4. Les cèl·lules de LLA-T es troben fisiològicament localitzades a l'estroma medul·lar i estan altament influenciades per aquest (Veiga et al. 2006). L'estroma medul·lar també protegeix les cèl·lules leucèmiques de la quimioteràpia (Meads, Hazlehurst, and Dalton 2008). La manera per abordar aquesta qüestió doncs, es basa en la utilització de la línia cel·lular humana d'estroma de medul·la òssia HS5, la qual no és tumoral i creix en cultiu. Així doncs, es van cultivar cèl·lules

de línies de LLA-T soles o en cocultiu amb HS5, i es va analitzar l'efecte citotòxic dels antagonistes de DRD4 passades 72h per citometria de flux. Com es pot observar a la Figura 14, la presència de l'estroma reverteix per complet l'efecte citotòxic dels antagonistes de DRD4. L'efecte anti-leucèmic dels DRD4 es veu reduït en presència de cèl·lules estromals que actuen com a protecció, d'igual manera que ho fan en presència d'agents quimioterapèutics.

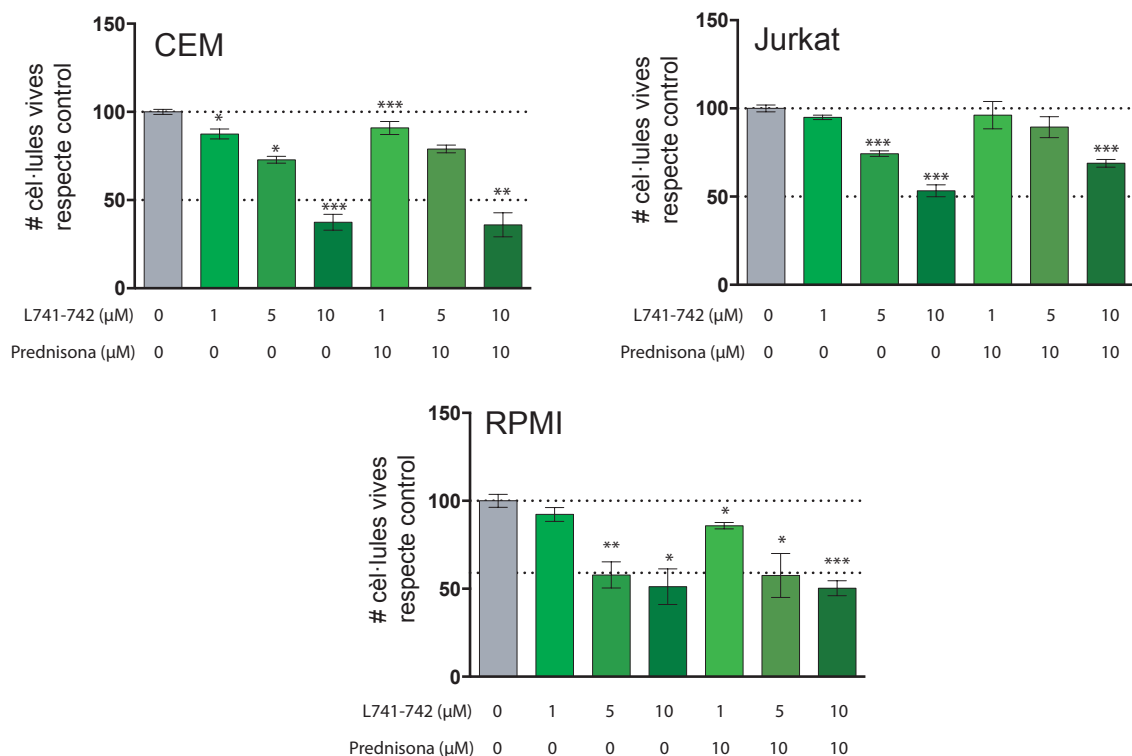


**Figura 14. L'estroma reverteix els efectes dels antagonistes de DRD4.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 72h amb L741-742 10  $\mu$ M, nemonaprida 25  $\mu$ M i RBI 257 25  $\mu$ M en presència o absència de la línia cel·lular d'estroma de medul·la òssia HS-5. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de cèl·lules vives de cada línia de LLA-T respecte el respectiu control, estudiats en triplicats en dos experiments independents per citometria de flux. \*o #  $p < 0,05$ ; \*\* o ##  $p < 0,01$ ; \*\*\* o ###  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* o ####  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.1.1. Interacció dels antagonistes de DRD4 amb tractaments actuals:

El tractament actual de la LLA-T es basa en quimioteràpia amb l'ús diversos compostos administrats en blocs diferents (Terwilliger 2017). D'entre els agents més comunament utilitzats destaquen, vincristina i prednisona. Un dels problemes més importants que té el tractament de la LLA-T actualment, és la resistència adquirida per les cèl·lules leucèmiques a alguns agents actualment utilitzats en el tractament. Un exemple molt útil en aquest context són les tres línies cel·lulars de

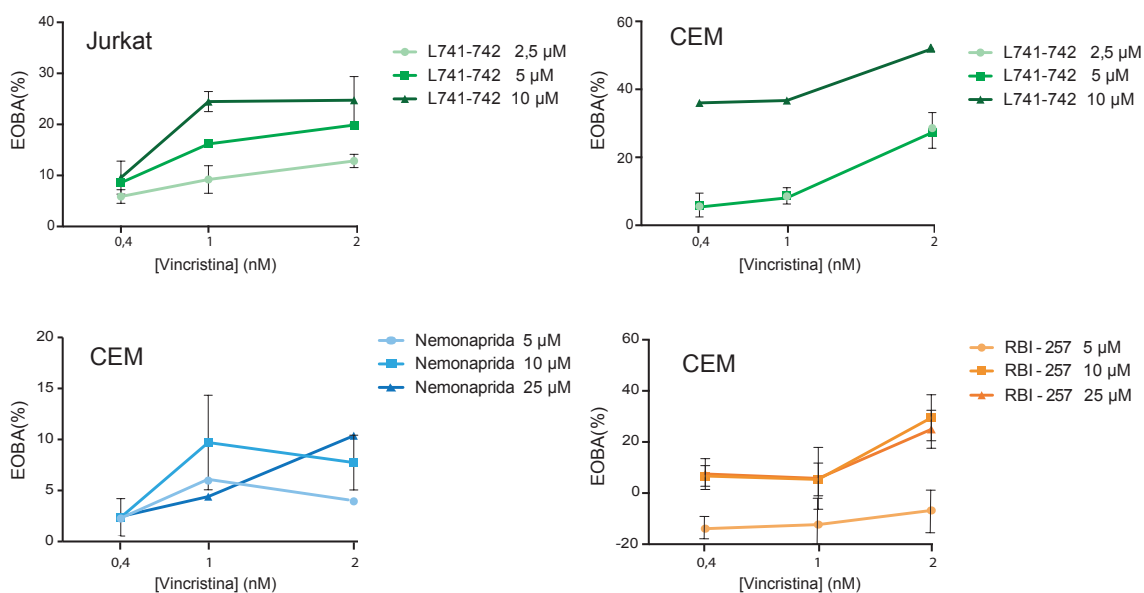
LLA-T utilitzades en aquest treball, atès que les tres presenten resistència als glucocorticoides, concretament a la prednisona, un dels fàrmacs que s'inclouen en les pautes actuals de tractament de la malaltia. Així doncs, partint d'aquesta premissa, es va considerar important estudiar si els antagonistes de DRD4 tenien un efecte sensibilitzant de les línies cel·lulars de LLA-T davant de l'efecte de la prednisona. Primerament, es va seguir l'estratègia de tractar les línies cel·lulars de LLA-T durant 24h amb els antagonistes de DRD4, i passat aquest temps de tractament sensibilitzador, es va afegir el tractament de prednisona o vehicle durant 48h i es va avaluar la citotoxicitat per citometria de flux. Tal com s'observa a la Figura 15, el tractament amb L741-742 o nemonaprida no sensibilitzen les línies cel·lulars de LLA-T a l'acció de la prednisona, donat que l'efecte citotòxic dels compostos era equivalent en presència d'aquest glucocorticoide. Per altra banda, es va seguir una segona estratègia de co-tractament en la que els dos compostos s'afegien al mateix moment i es deixava el tractament durant 72h. Els resultats obtinguts van ser molt similars als de la Figura 15.



**Figura 15. Els antagonistes DRD4 no tenen efecte sensibilitzador a la prednisona.** Es van tractar les cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI amb diverses concentracions de L741-742 i prednisona, i es va analitzar la viabilitat a les 72h per citometria de flux. Les barres mostren la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu (de tres realitzats). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (t-test).

La vincristina, conjuntament amb la prednisona, és un dels agents més àmpliament utilitzat actualment en les pautes de tractament de LLA-T, i les línies cel·lulars de LLA-T no són resistents al seu efecte citotòxic. Així doncs, es van realitzar en línies cel·lulars de LLA-T experiments de citotoxicitat de L741-742/nemonaprida/RBI en combinació amb vincristina.

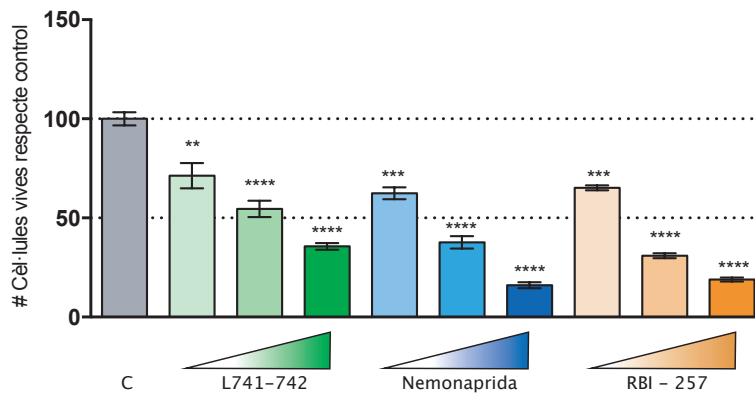
Tal com es mostra en la Figura 16, es va observar, que l'efecte citotòxic provocat pels antagonistes de DRD4 presentava una forta correlació amb els efectes de la vincristina. Així, de manera combinada, induïen un percentatge de mort més elevat a dosis més baixes que en monoteràpia. Com a mesura quantitativa del sinergisme, es va calcular l'Eoba (Berenbaum 1981) (valors positius indiquen sinergismes, negatius antagonisme) i en totes les línies cel·lulars de LLA-T s'indueix un efecte sinèrgic que oscil·la entre un 5 i 45 d'Eoba en funció de la línia cel·lular i la dosi de L741-742 utilitzada. El rang molar de vincristina:L741-742 seria 1:5000 a 1:25000. El tractament conjunt indueix un efecte citotòxic de fins al 45% no explicable per la suma dels efectes de cada un dels tractaments per separat. En el cas de nemonaprida, els efectes sinèrgics són més limitats, els valors d'Eoba oscil·len entre 2 i 10. En rang molar equivaldria a 1:10000 a 1:12500. I per últim, RBI-257 presenta efectes molt dispersos en funció de la concentració utilitzada. La més baixa ( $5\mu\text{M}$ ) presenta efectes antagònics, contràriament a la més alta ( $25\mu\text{M}$ ) que el sinergisme oscil·len entre 10 i 30. El rang molar en aquest cas equivaldria a 1:5000 a 1:12500. Els efectes antagònics observats amb RBI-257 a  $5\mu\text{M}$  amb vincristina podrien explicar-se atès que a aquesta concentració RBI-257 no indueix efecte citotòxic.



**Figura 16. Els antagonistes de DRD4 mostren sinergisme amb vincristina.** Es van testar els efectes citotòxics a les 48h en cèl·lules CEM i Jurkat al combinar vincristina (vin 0,4;1;2 nM) amb L741-742 ( 2,5; 5; 10 μM) o Nemonapride (Nemo) o RBI-257 (5; 10; 25 μM) . Es representen els Eoba calculats a partir de la mitjana de triplicats de 6 experiments diferents.

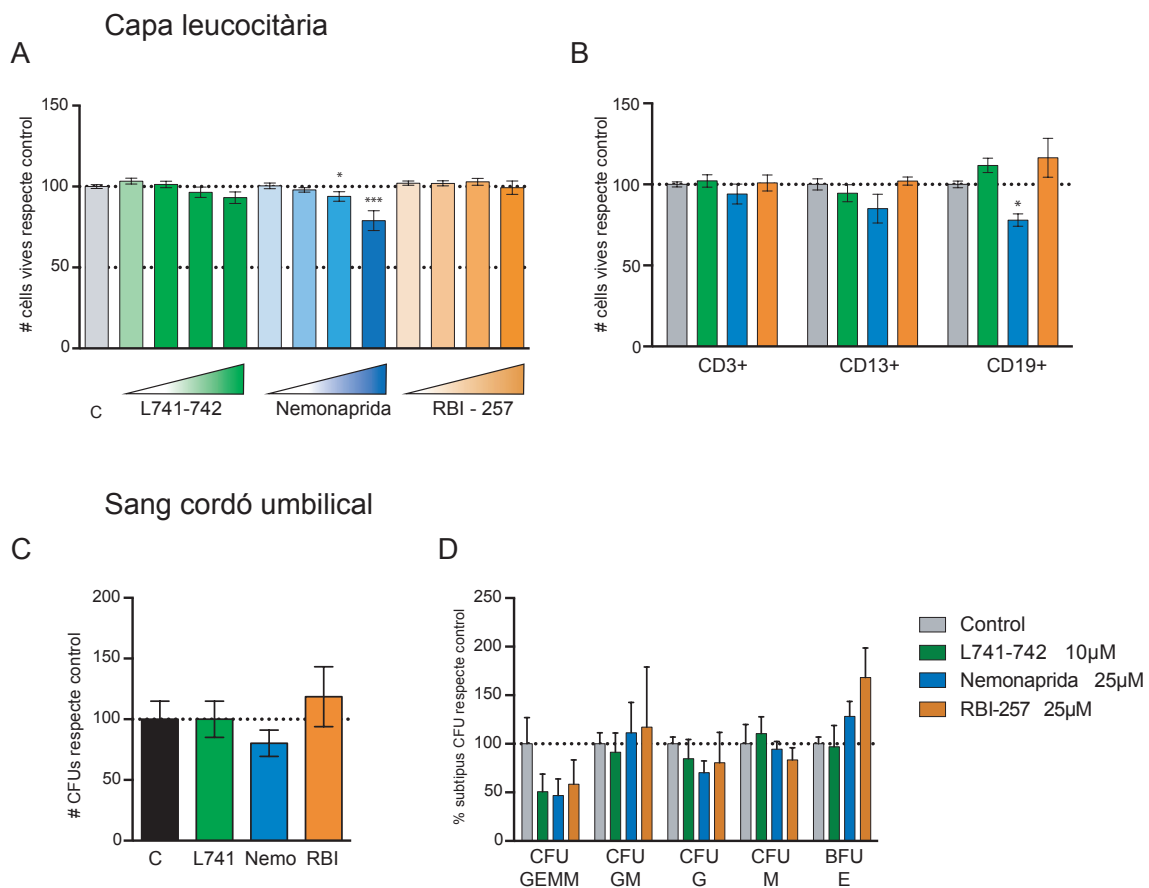
#### 4.2.2. Estudi citotòxic en cèl·lules mostres primàries tumorals i sanes

Havent validat l'efecte antileucèmic dels antagonistes de DRD4 en línies cel·lulars, es va prosseguir amb els estudis en mostres primàries. Degut a la manca de mostres primàries de LLA-T disponibles pel grup de recerca per a realitzar aquest estudi, es va fer servir una mostra derivada de pacient (PDX) de LLA-T cedida pel laboratori del Dr. Felipe Prósper (CIMA, Pamplona) (Vilas-Zornoza et al. 2012). Donat que l'efecte citotòxic dels antagonistes de DRD4 en línies cel·lulars de LLA-T és a les 72h de tractament, amb la mostra PDX es va seguir el mateix temps de tractament. Tal com es mostra a la Figura 17, els antagonistes de DRD4 presenten efecte citotòxic en la mostra de PDX de forma depenent de dosi, en concordança amb els resultats obtinguts en línies cel·lulars.



**Figura 17. Els antagonistes del DRD4 mostren efecte antileucèmic *ex vivo*.** Es va tractar la mostra de PDX amb L741-742 (5, 10, 25 μM), nemonapride i RBI-257 (10, 25, 50 μM) la viabilitat dels limfoblasts es va analitzar a les 72h de tractament. Les barres representen la mitjana ± SEM de triplicats d'un experiment representatiu de tres realitzats. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (t-test).

Per comprovar que l'efecte citotòxic dels antagonistes del DRD4 era específic de les cèl·lules de LLA-T i no afectava a les cèl·lules sanes, es van replicar els experiments anteriors amb mostres sanes. D'una banda es va analitzar l'efecte citotòxic sobre capes leucocitàries de donants sans, concretament, l'efecte sobre el global de cèl·lules així com sobre les població mieloide i limfoide B i T. Les cèl·lules es van tractar durant 3 dies en un ampli rang de concentració de L741-741, nemonaprida i RBI-257 (5, 10, 25, 50 μM). Com es mostra a la Figura 18A-B, els antagonistes no presentaven cap efecte sobre el total de cèl·lules vives en mostres sanes en cap de les dosis de tractament. En l'estudi de les poblacions, només està representada la dosi més alta de tractament (50 μM), a la que pràcticament no hi ha cap efecte citotòxic en cap població, sent d'especial interès la població de limfòcits T (CD3+). Paral·lelament a l'anàlisi sobre les cèl·lules madures, es van realitzar assajos per abordar analitzar possibles efectes sobre la funcionalitat de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC). Així doncs, es va estudiar la funcionalitat de la fracció cel·lular més primitiva de cèl·lules hematopoètiques amb cèl·lules de sang de cordó umbilical negatives per marcadors de llinatge (lin-), enriquit per les cèl·lules mare hematopoètiques. En aquest estudi, els resultats van mostrar concordança amb els de la capa leucocitària: cap dels antagonistes tenia efecte rellevants ni en el nombre de colònies totals com tampoc a nivell de proporció dels diferents tipus de progenitor Figura 18C-D.



**Figura 18. Els antagonistes de DRD4 no afecten les cèl·lules hematopoètiques sanes.** Es van tractar cèl·lules mononucleades de cades leucocitàries de 6 donants sans amb L741-742, nemonaprida i RBI-257 a 5, 10, 25, 50µM, **A.** sobre la població total; **B.** Sobre la població mieloide (CD13+), limfoide B (CD19+) i limfoide T (CD3+). Les barres mostren la mitjana ± SEM de triplicats de les 6 capes. Cèl·lules de lliniades de 5 mostres de sang de cordó umbilical es van tractar 18h amb L741-742 10 µM, nemonaprida 25 µM, RBI-257 25 µM i es van cultivar 15 dies en medi semisòlid *Methocult*. **C.** Nombre total de colònies. **D.** Nombre de colònies dels diferents subtipus. Les barres mostren la mitjana ± SEM de triplicats de les 5 mostres. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 (t-test).

#### 4.2.3. Estudis preclínic *in vivo*

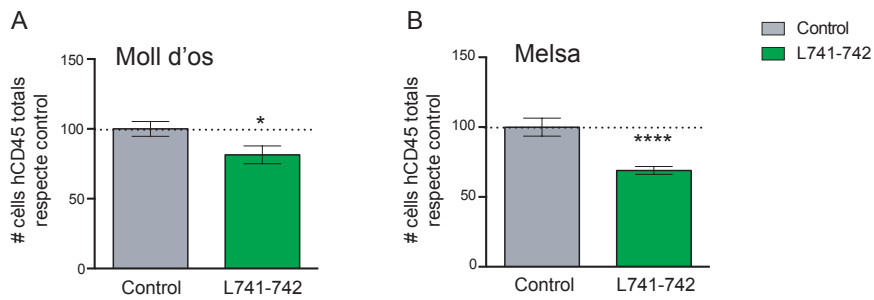
Validada l'efectivitat antileucèmica dels antagonistes de DRD4 així com la selectivitat per les cèl·lules de LLA-T, l'últim pas per completar el perfil preclínic no regulatori, era l'avaluació de l'efectivitat en models animals. En aquesta última etapa es va seleccionar l'antagonista amb el perfil més atractiu, L741-742. En aquest

darrer objectiu, es va treballar amb models de xenotransplantament de cèl·lules humanes en ratolins immunodeficients NSG (NOD.CgPrkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) condicionats amb busulfan per a l'acceptació de l'empelt.

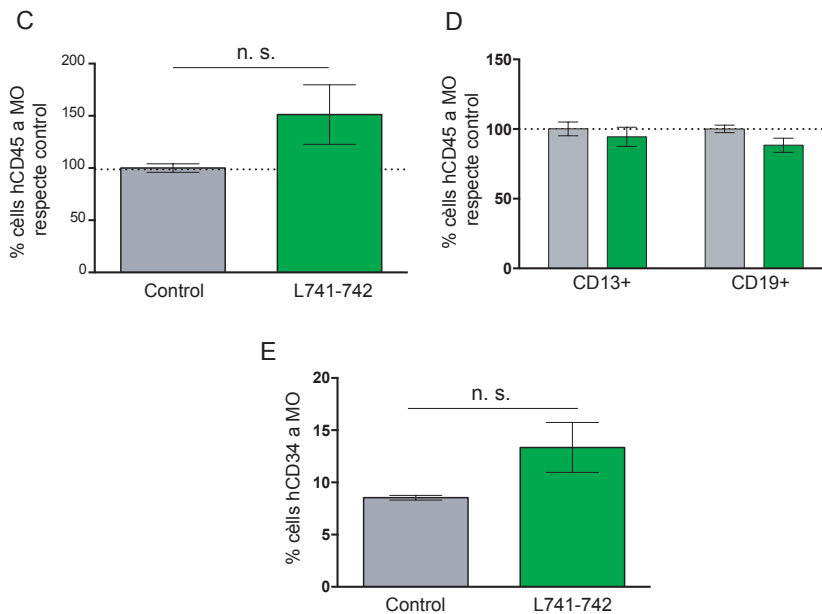
El primer experiment que es va dur a terme va ser amb la mostra derivada de pacient (PDX) de LLA-T. Les cèl·lules del PDX es van tractar amb L741 10µM o vehicle (DMSO) durant 18h i es van injectar intravenós les cèl·lules als ratolins en els quals es van deixar 21 dies per a que es produís l'empelt. Tal com es mostra a la Figura 19, el tractament amb L741-742 redueix aproximadament un 20% el nombre total de cèl·lules humanes en moll d'os (Figura 19A) i un 30% en melsa (Figura 19B) respecte els animals tractats amb vehicle. De forma anàloga als estudis realitzats ex-vivo, es va voler validar la selectivitat antileucèmica dels antagonistes de DRD4 també a nivell in-vivo. Així doncs, es va repetir el mateix procediment que amb les cèl·lules de PDX amb cèl·lules de lin- de sang de tres cordons umbilicals. En aquest experiment, de forma concordant amb els experiments realitzats ex vivo, no s'observa cap efecte citotòxic, fins i tot el percentatge de cèl·lules humanes totals (Figura 19C) així com el percentatge de progenitors hematopoètics (CD34+) (Figura 19E), presenta una tendència a incrementar l'empelt amb el tractament de L741-742. També, seguint amb la tònica dels experiments ex-vivo, les subpoblacions mieloide (CD13+) i limfoide B (CD19+) avaluades dins de la sang de cordó no es veuen afectades pel tractament amb L741-742 (Figura 19D). La població CD3+ no es va estudiar, atès que el desenvolupament de les cèl·lules T és més tardà i per tant no es detecten al temps de l'anàlisi.



### Mostra PDX LLA-T

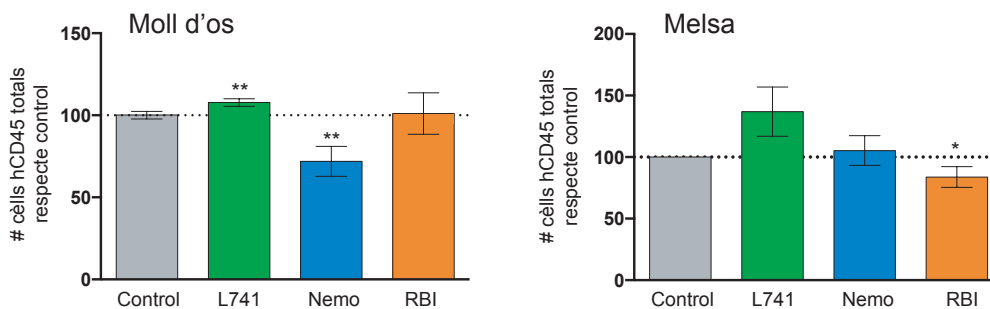


### Sang cordó



**Figura 19. Els antagonistes de DRD4 afecten selectivament a les cèl·lules leucèmiques in-vivo.** Es van transplantar per via intravenosa a ratolins NSG condicionats (n=12) la mostra de PDX de LLA-T prèviament tractats 18h amb L741-742 10 $\mu$ M. Després de 21 dies, el grau d'empelt es va analitzar la medul·la òssia (**A**) i melsa (**B**). Es representa el nombre total de cèl·lules humanes respecte al control  $\pm$  SEM. Es van transplantar per via intravenosa a ratolins NSG condicionats (n=19) cèl·lules lin- provinents de sang de tres cordons umbilicals prèviament tractats 18h amb L741-742 10 $\mu$ M. Després de 8 setmanes, el grau d'empelt es va analitzar en moll d'os i melsa. Es representa la mitjana de la freqüència de cèl·lules humanes a MO respecte al control  $\pm$  SEM (**C**). Les cèl·lules humanes empeltades en MO a (**C**) es van analitzar en funció de la presència dels marcadors CD13 i CD19 (**D**) així com CD34 (**E**) per determinar els canvis en la freqüència cèl·lules mieloides, cèl·lules limfoides i progenitors hematopoètics respectivament. Les barres mostren la mitjana del percentatge de cada població respecte el control  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$  (t-test).

Paral·lelament als estudis realitzats amb la mostra de PDX de LLA-T, es van realitzar experiments amb la línia cel·lular Jurkat. Es van injectar les cèl·lules deixant 6 dies per a l'establiment de la leucèmia. Passat aquest temps, es van realitzar tractaments diaris durant 4 dies amb L741-742 a 5mg/kg, nemonaprida i RBI a 20mg/kg. Les dosis dels compostos utilitzades són l'equivalent a les concentracions dels estudis in vitro. Com mostra la Figura 20, els fàrmacs no van tenir una eficàcia en termes de reducció de l'empelt. Cal tenir en compte dues consideracions: d'una banda la ràpida metabolització dels fàrmacs a metabòlits probablement no antileucèmic i de l'altra la seva baixa solubilitat, que impedeix augmentar la concentració administrada. Aquests motius, probablement suposarien un impediment per a l'efectivitat dels fàrmacs en pacients. Malgrat això existeixen estratègies de vesicularització basades en liposomes que podrien ser utilitzades com a via d'administració mantenint l'estructura i efectivitat dels compostos.



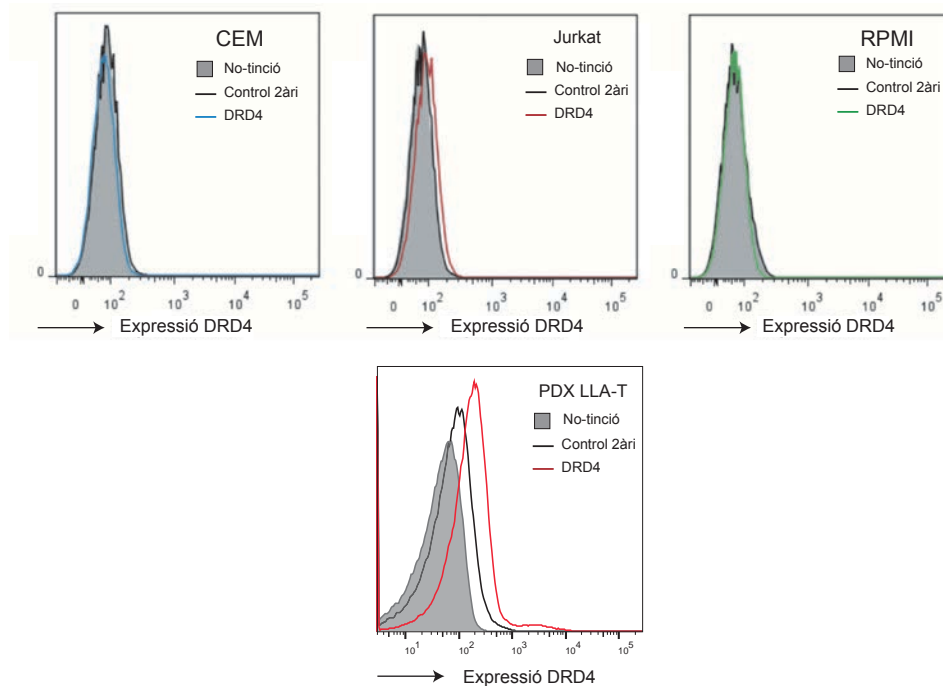
**Figura 20. Els antagonistes de DRD4 no són efectius en experiments in vivo amb Jurkat.** Es van injectar per via intravenosa cèl·lules Jurkat (n=16) a ratolins NSG condicionats i es van deixar empeltar durant 6 dies. Al cap d'aquest temps es van tractar els ratolins intraperitonealment amb L741-742, nemonaprida, RBI-257 o vehicle cada dia durant 4 dies, després dels quals es van analitzar l'empelt a medul·la òssia i melsa. Es representa la freqüència de cèl·lules humanes respecte al control  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (t-test).

### 4.3 Estudi de la diana antileucèmica

Un cop validat el perfil preclínic i comprovada la efectivitat dels antagonistes de DRD4 i la seva selectivitat per les cèl·lules de LLA-T, es va encarar el segon objectiu d'aquesta tesi doctoral, l'estudi de la diana molecular associada a aquest efecte antileucèmic.

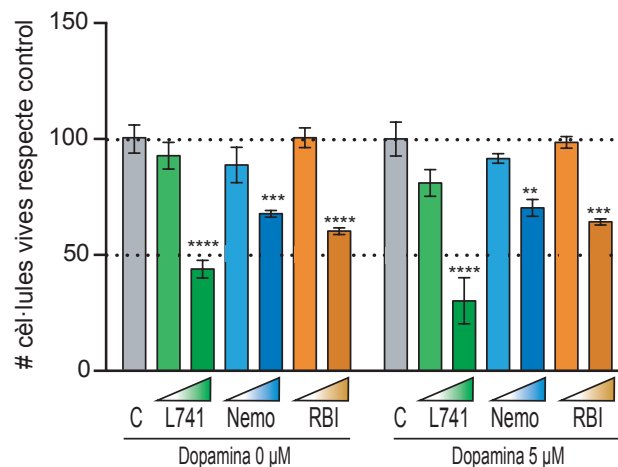
#### 4.3.1 Mecanisme dependent de DRD4

La primera diana candidata a estudiar va ser la descrita per als compostos que presentaven efecte antileucèmic. Com a primer pas, es va realitzar un estudi de l'expressió de DRD4 en superfície ja que es tracta d'un receptor de membrana. Per citometria de flux es va determinar el percentatge de cèl·lules que expressaven DRD4 en les línies de LLA-T. Sorprenentment cap de les línies de LLA-T presentaven expressió del DRD4 en superfície. L'expressió de DRD4 també es va avaluar en les cèl·lules de la mostra de PDX de LLA-T, sent en aquestes últimes una expressió minoritària (Figura 21). La manca d'expressió de DRD4 en línies cel·lulars de LLA-T i en el PDX, no semblava indicar que el receptor de dopamina estigués vinculat amb l'efecte antileucèmic provocat pels antagonistes de DRD4.



**Figura 21. Les línies cel·lulars de LLA-T i PDX de LLA-T no expressen el receptor de DRD4.** L'expressió de DRD4 va ser analitzada per citometria de flux en CEM, Jurkat i RPMI-8402 (panell superior) i en les cèl·lules de PDX de LLA-T en vermell (panell inferior). El percentatge de expressió de DRD4 es mostra en blau, vermell o verd en cadascuna de les línies cel·lulars respectivament i vermell en PDX de LLA-T del panell inferior.

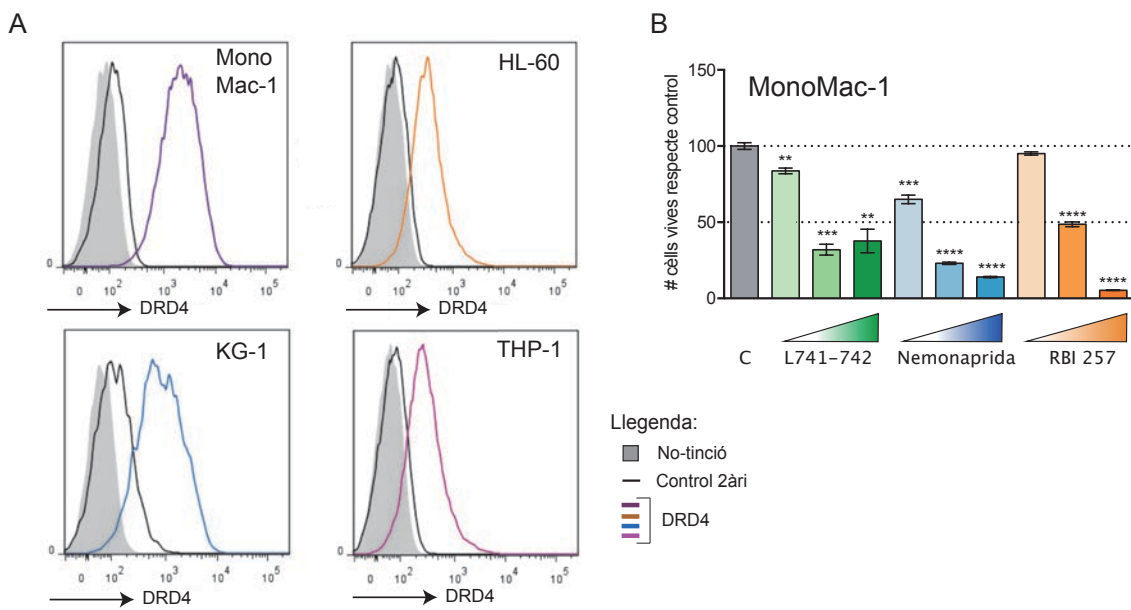
Es va voler comprovar la importància del DRD4 en la citotoxicitat dels antagonistes en les línies cel·lulars de LLA-T. Per analitzar amb més profunditat el possible paper de DRD4 en l'efecte citotòxic dels seus antagonistes, es van fer assajos de reversió en presència del lligand endogen del DRD4, la dopamina. En la Figura 22, tal com s'observa els efectes citotòxics induïts pels antagonistes de DRD4 són els mateixos en ambdues condicions avaluades. Això indicava que el receptor de dopamina tipus 4 semblava no estar implicat en la via per la qual els antagonistes indueixen l'efecte anti-leucèmic.



**Figura 22. La dopamina no reverteix els efectes dels antagonistes de DRD4.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 72h amb L741-742 a 5 i 10µM, Nemonapride (Nemo) i RBI-257 a 10 i 25µM en absència o presència de dopamina a 5µM. La viabilitat de les cèl·lules va ser analitzada per citometria de flux. Les barres representen la mitjana ± SEM de triplicats d'un experiment representatiu dut a terme en Jurkat de dos realitzats en cada línia cel·lular. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. (t-test).

Al grup de recerca es disposa de línies cel·lulars de LMA, les quals sabíem que expressen DRD4 (Sachlos et al. 2012) (Figura 23A). Es va voler comprovar si els antagonistes específics de DRD4 tenien més efectivitat en les línies cel·lulars de LMA

que expressen alt percentatge del receptor. Com a mesura indirecte de la implicació del DRD4, es va seleccionar la línia cel·lular MonoMac-1 atès que és la que més alta expressió de DRD4 presenta de les disponibles al grup de recerca, i es van tractar amb control de vehicle o L741-742, nemonaprida i RBI-257 durant 72h. L'efecte antileucèmic dels antagonistes de DRD4 en LMA es produeix en el mateix rang (10-25  $\mu$ M) que en LLA-T (Figura 23B) Suggestint que l'efecte citotòxic era independent de la presència del receptor.



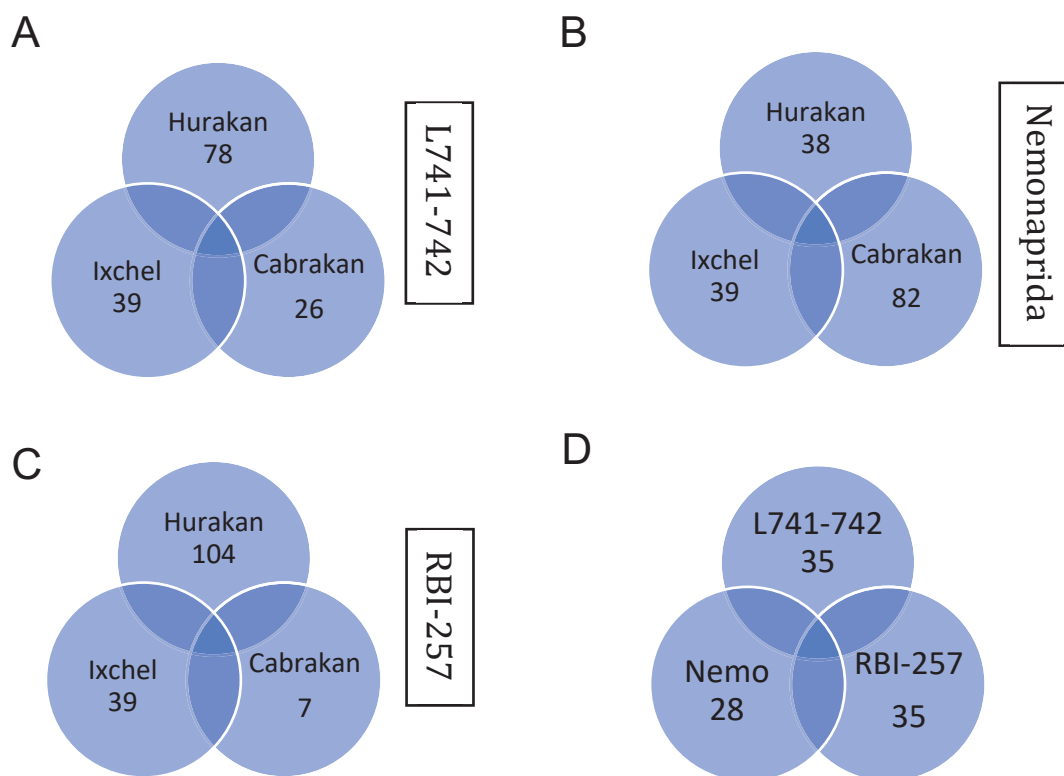
**Figura 23. Les línies cel·lulars de LMA expressen el DRD4 i els antagonistes presenten efecte citotòxic.** A. Les línies cel·lulars de LMA (Monomac-1, HL60, KG1 i THP1) expressen el DRD4. B. Les cèl·lules MonoMac-1 i HL60 es van tractar durant 72h amb L41-742 (5, 10, 25 $\mu$ M), nemonaprida i RBI-257 (10, 25, 50  $\mu$ M) i es va analitzar la viabilitat per citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (t-test).

Les evidències obtingudes suggereixen que el receptor de dopamina no està implicat en l'efecte antileucèmic observant per dues raons fonamentals: Absència d'expressió del DRD4 en LLA-T i no reversió en presència de dopamina. Per tant, l'efecte citotòxic es degut a la afectació d'una altre via de senyalització associada a una altre diana terapèutica.

### 4.3.2 Identificació de dianes alternatives

En els apartats anteriors s'ha conclòs que els antagonistes de DRD4 presenten un efecte antileucèmic selectiu en LLA-T que al mateix temps no sembla tenir relació amb el DRD4 com a diana antileucèmica. Amb l'objectiu doncs d'elucidar la diana antileucèmica implicada en aquest efecte citotòxic, es va seguir una estratègia bioinformàtica. Es va establir una col·laboració científica amb l'empresa *Mind The Byte*, una biotech experts en la predicció de dianes moleculars i disseny dirigit de fàrmcs. Utilitzen models de compatibilitat entre diana-lligand, basats en estructura tridimensional, bidimensional i predicció basada en eines bioinformàtiques per tal de poder identificar possibles dianes terapèutiques de la manera més refinada possible.

En la col·laboració que es va realitzar, es va identificar una llista de possibles dianes. D'aquesta llista es van seleccionar aquelles coincidents en els tres models (Hurakan, cabrakan i Ixchel) per cada antagonista de DRD4 (Figura 24 A,B i C). De les dianes coincidents en els tres models per cada compost, es va generar una llista de les coincidents en els tres compostos (Figura 24 D).



**Figura 24. Cribratge de les potencials dianes predites per *Mind The Byte*.** Es representen en forma de diagrama de Venn les dianes predites per a cadascun dels models (Hurakan, Cabrakan i Ixchel) per L741-742 (A), Nemonapride (B), RBI-257 (C). Diagrama de les dianes coincidents en A,B i C de cada compost (D).

La llista definitiva de dianes seleccionades en els tres compostos pels tres antagonistes de DRD4 es troba a la Taula 9:

Dianes
Acetilcolinesterasa
Receptor Cannabinoide - I
Cadena lleugera ferritina
Isoenzim corticoesteroid 11-beta-deshidrogenasa
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA1
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA2A
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA2B
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA2C

Receptor glutamat ionotròpic, NMDA2D
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA3A
Receptor glutamat ionotròpic, NMDA3B
Receptor hormonal concentrador melanina 1
Proteïna tau associada als microtúbuls
Proteïna musculació tipus 1
Receptor $\mu$ -opioide
Canal de potassi tipus 2
Receptor intracel·lular $\sigma$ no-opioide.
Proteïna dits de zinc mex-5

**Taula 9. Llista de dianes coincidents en l'*screening* de *Mind The Byte*.** Llistades les dianes coincidents en els tres models de predicció pels tres antagonistes de DRD4.

D'aquesta llista de dianes refinada, es van descartar aquelles en les que s'havia descrit que no s'expressaven en el nostre model, sobre les que s'havien realitzats experiments previs al grup de recerca i s'havia validat la manca d'efectes citotòxics i aquelles que era molt laboriós trobar eines per la validació. Considerant doncs, les premisses pel descart de les dianes, es van seleccionar com a potencials dianes el receptor de glutamat, el receptor d'acetilcolinesterasa, el receptor  $\mu$ -opioide i el receptor  $\sigma$  no-opioide.

Una vegada seleccionades les possibles dianes terapèutiques, es va procedir a la validació. Es van testar antagonistes selectius de les dianes proposades i es va estudiar si induïen el mateix efecte citotòxic que els antagonistes de DRD4.

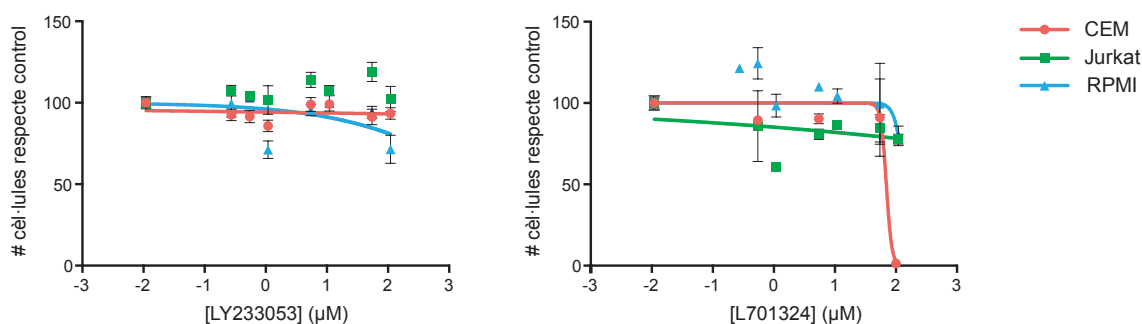
### **Receptor glutamat**

El glutamat és un neurotransmissor clau en el sistema nerviós central responsable de la senyalització sinàptica cerebral. Per la correcte funcionalitat del glutamat, aquest necessita la presència dels seus receptors que es divideixen en dos grups: receptors de glutamat metabotròpics (mGluRs) els quals pertanyen a la família de receptors acoblats a proteïnes G, i els receptors de glutamat ionotròpics (iGluRs)



que formen canals de ions. En càncer però, l'expressió del receptor de glutamat s'ha descrit àmpliament més enllà del CNS i el cervell, en multitud d'òrgans perifèrics tals com pàncrees, pròstata, estómac, ovari, així com també s'ha destacat la seva importància en limfomes i leucèmia (Ganor et al. 2009; Stepulak et al. 2014)

Per avaluar el receptor de glutamat com a diana terapèutica, es van testar dos antagonistes, LY233053 i L701324, els quals tenen efecte inhibidor sobre la majoria dels receptors de glutamat. Cèl·lules de les línies de LLA-T es van tractar 72h a diferents concentracions dels antagonistes del receptor de glutamat en un rang de concentracions per establir una corba de toxicitat dosi-resposta i determinar la EC<sub>50</sub>. Dels dos antagonistes avaluats, cap d'ells induïa cap efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T avaluades. La única EC<sub>50</sub> que es va poder calcular va ser la de L701324 en CEM que era de 64 µM però no es representatiu ja que en les altres dues línies cel·lulars avaluades no hi ha efecte citotòxic (Figura 25). Donat que els dos antagonistes avaluats actuaven sobre la majoria dels subtipus de receptors de glutamat, es va descartar que el receptor de glutamat estigués implicat en els efectes citotòxics induïts pels antagonistes de DRD4.



**Figura 25. Els antagonistes del receptor de glutamat no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb concentracions creixents de LY233053 i L701324, i la viabilitat es va analitzar a les 72h per citometria de flux. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat ± SEM.

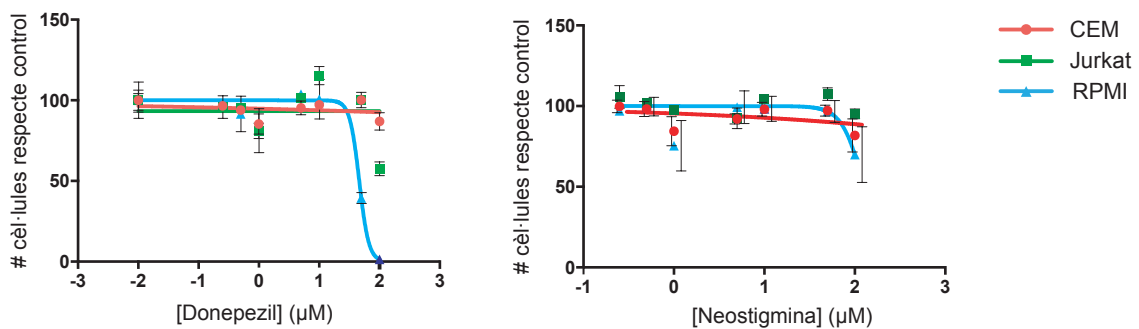
## **Acetilcolinesterasa**

L'acetilcolinesterasa (AChE), és un enzim catalític essencial per al funcionament bàsic dels mamífers. El seu paper principal és la catàlisi de l'acetilcolina en lactat i colina i altres esters de colina que funcionen com a neurotransmissors (Colovic et al. 2013). La seva funció principal és evitar l'acumulació d'acetilcolina que desencadenaria en una estimulació muscular repetida i descontrolada (Lazarevic-Pasti et al. 2017).

Malgrat la funció canònica de l'acetilcolinesterasa, s'han descrit moltes altres funcions per aquest enzim entre les quals s'inclou el seu paper en la diferenciació de cèl·lules mare (Sperling et al. 2008), el creixement cel·lular, senyalització i reconeixement cel·lular, o també són importants en el procés d'hematopoesi i tumorogènesi entre altres (Lazarevic-Pasti et al. 2017; Soreq and Seidman 2001).

El gen que codifica per l'AChE s'ha vist que freqüentment està amplificat, mutat o eliminat en pacients amb leucèmia (AML, SMD), així doncs s'ha proposat la seva relació amb la proliferació mieloide (Lapidot-Lifson et al. 1989).

Per avaluar l'acetilcolinesterasa com a diana terapèutica es van testar dos inhibidors específics: donepezil i neostigmina, ambdós actualment utilitzats en pacients amb Alzheimer. Cèl·lules de les línies cel·lulars de LLA-T es van tractar durant 72h a concentracions creixents dels inhibidors per establir una corba de toxicitat dosi-resposta i determinar la  $EC_{50}$ . Cap dels dos inhibidors van presentar efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T. Només en el cas de donepezil es va poder tancar la corba  $EC_{50}$  en RPMI però a una concentració molt elevada ( $EC_{50}$ :  $46\mu\text{M}$ ) (Figura 26). Així doncs, no es va poder mimetitzar l'efecte citotòxic induït pels antagonistes de DRD4 per tant, es va descartar que l'acetilcolinesterasa fos la diana molecular responsable de l'efecte antileucèmic.



**Figura 26. Els inhibidors de l'acetilcolinesterasa no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb concentracions creixents de donepezil i neostigmina, i la viabilitat es va analitzar a les 72h per citometria de flux. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM.

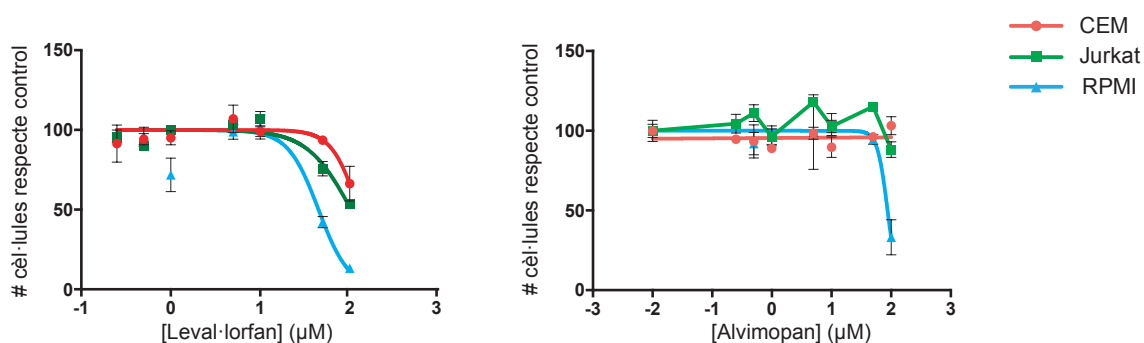
### Receptor opioide $\mu$

El receptor opioide  $\mu$  (MOR) forma part de la gran família de receptors acoblats a proteïnes G. Són receptors integrals de membrana àmpliament distribuïts per tot el sistema nerviós central i perifèria. (Spetea et al. 2014).

La importància de MOR en el càncer està àmpliament estudiada i s'ha relacionat principalment amb l'afavoriment de l'angiogènesi, del creixement tumoral i de la metàstasi. En múltiples models de càncer tals com estómac, pròstata, ganglis i pell entre d'altres i revisions anteriors ja han destacat el receptor opioide  $\mu$  com a potencial diana terapèutica en càncer (Lennon, Moss, and Singleton 2012; Singleton et al. 2015).

En la validació del MOR com a potencial diana terapèutica, es van testar dos inhibidors específics: leval·lorfan i alvimopan. Les línies cel·lulars de LLA-T, CEM, Jurkat i RPMI, es van tractar durant 72h a concentracions creixents de leval·lorfan i alvimopan per establir una corba dosi-resposta i determinar la  $EC_{50}$  per citometria de flux. En el cas de leval·lorfan, no es va poder tancar la corba dosi-resposta en cap de les línies cel·lulars utilitzades, els rangs de les  $EC_{50}$  en les línies avaluades oscil·la entre 45 i 126  $\mu$ M. El tractament amb alvimopan, només es va poder determinar la  $EC_{50}$  en RPMI (88  $\mu$ M) (Figura 27).

Aquestes concentracions són extremadament altes com per considerar un efecte selectiu dels antagonistes sobre el receptor de MOR.



**Figura 27. Els antagonistes del receptor opioide  $\mu$  no indueixen efecte citotòxic en les línies cel·lulars de LLA-T.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb concentracions creixents de leval·lorfan i alvimopan, i la viabilitat es va analitzar a les 72h per citometria de flux. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM.

### Receptor no opioide $\sigma$

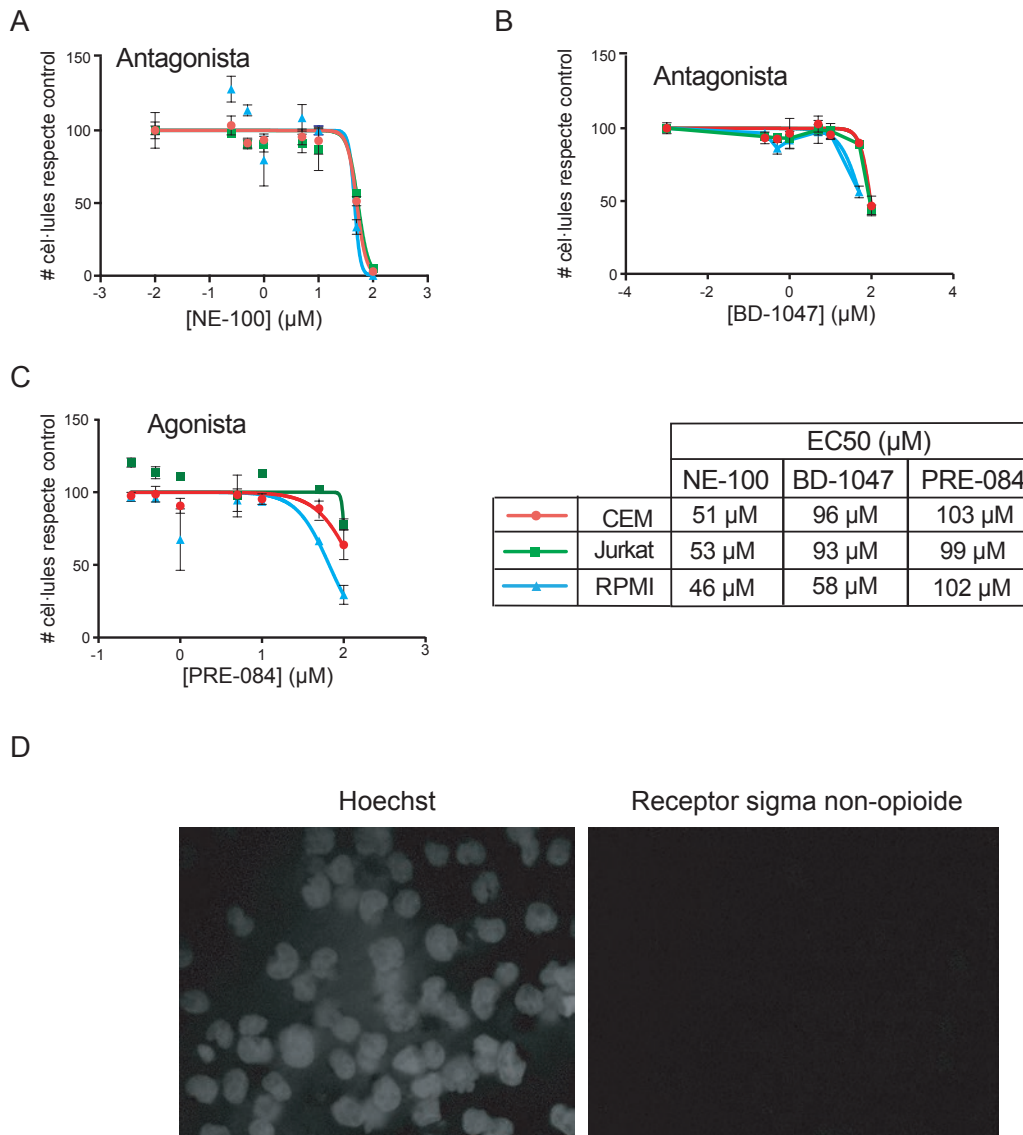
El receptor sigma consisteix en dos subtipus,  $\sigma$  1 i 2, que regulen gran varietat de funcions cel·lulars tals com la senyalització a través de calci, la translocació/activació de les proteïnes quinases, la diferenciació e inflamació cel·lular. Són receptors intracel·lulars amb alta presència al reticle endoplasmàtic. (Hayashi 2015; Hayashi et al. 2011; Maurice and Su 2009).

En càncer, la presència dels receptors sigma non-opioide s'ha caracteritzat en models com càncer de mama, estómac, pròstata (Maurice and Su 2009) així com també s'ha determinat que el tractament amb antagonistes específics del receptor indueixen un increment de l'apoptosi en les cèl·lules tumorals que es veu lleugerament atenuat en presència d'agonistes específics (Spruce et al. 2004).

Per la validació del receptor no opioide  $\sigma$  es va seguir la mateixa estratègia que en les anteriors dianes avaluades. Es van testar dos antagonistes específics: NE-100 i BD-1047. Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 72h en un ampli ventall de concentracions creixents per determinar una corba dosi-resposta. Tal com es pot

observar en la figura Figura 28A-B, ambdós antagonistes presenten efecte citotòxic en les tres línies cel·lulars avaluades en un rang que oscil·la entre 51 i 96  $\mu\text{M}$ .

Es va repetir el mateix procediment d'avaluació a través d'una corba dosi-resposta però amb el tractament d'un agonista del receptor sigma (PRE-084). En aquest cas, tal com es pot observar en la Figura 28C, l'efecte citotòxic del agonista es troba en el mateix rang que el induït pels antagonistes. Les dades de citotoxicitat dels antagonistes i agonistes no semblava que anessin encaminades a confirmar el receptor sigma non-opioide com la diana. Malgrat això, es va voler investigar amb més profunditat, i es va estudiar l'expressió del receptor no opoide  $\sigma$  en CEM. Es van realitzar els estudis en CEM únicament per una manca de disponibilitat temporal al grup de recerca de RPMI i Jurkat. Com s'observa a la Figura 28D, les cèl·lules CEM no presenten expressió del receptor no opioide  $\sigma$ . D'aquesta manera, sense l'expressió del receptor en el nostre model d'estudi, es va descartar el receptor sigma non-opioide com la diana molecular. L'efecte citotòxic observat pels antagonistes i agonistes podria ser un efecte *off-target* ja que les concentracions de les  $\text{EC}_{50}$  eren molt elevades.



**Figura 28. El receptor sigma non-opioide no és la diana molecular.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb concentracions creixents de NE-100 (A), BD-1047 (B) i PRE-084 (C) i la viabilitat es va analitzar a les 72h per citometria de flux. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM. D. Cèl·lules CEM es van fixar i permeabilitzar i posteriorment se'n va tenyir el nucli cel·lular (Dapi, panell esquerre) i el receptor sigma non-opioide (anticòs específic, panell dret).

Les dianes moleculars proposades a l'*screening* de *Mind The Byte* finalment no van resultar estar implicades en el mecanisme d'acció. Per aquest motiu els estudis en aquesta direcció es van aturar.

#### **4.4. Estudi del mecanisme de mort cel·lular regulada**

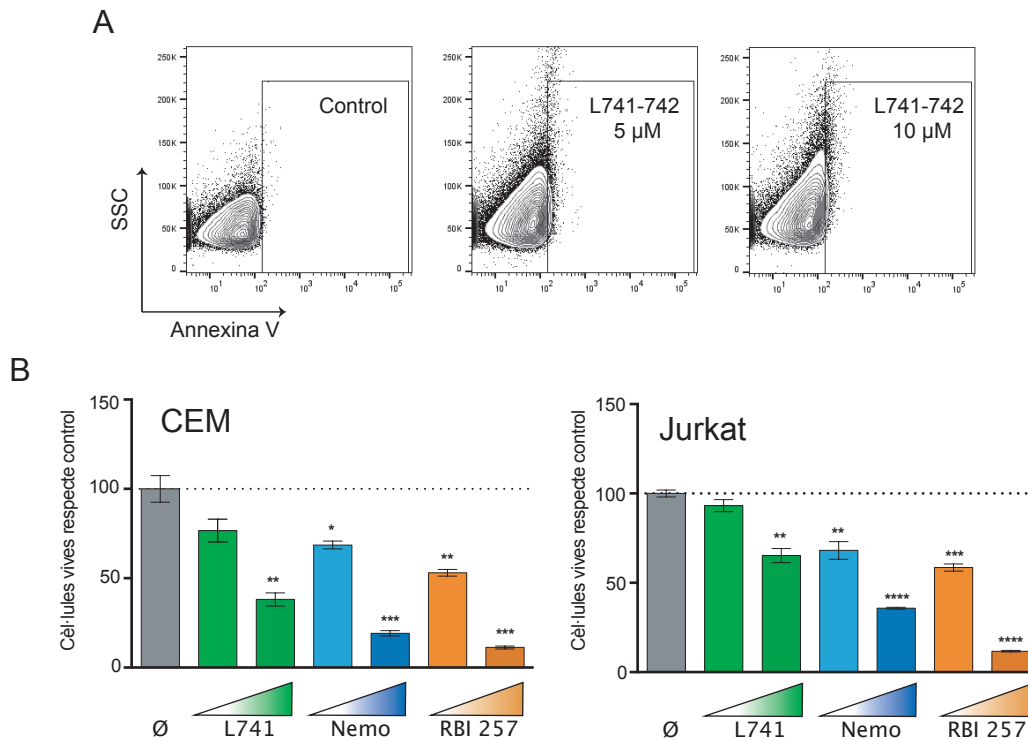
Els estudis detallats fins ara sobre el mecanisme d'acció no havien conclòs en cap resultat favorable. Així doncs, paral·lelament al mecanisme d'acció es va decidir estudiar diferents mecanismes de mort cel·lular regulada o programada per així assegurar que els antagonistes de DRD4 induïen una mort cel·lular programada i no hi havia implicació de la necrosis com a mort cel·lular patològica.

##### **4.4.1 Apoptosi**

Per estudiar si el mecanisme de mort cel·lular programada dels antagonistes de DRD4 era compatible amb l'apoptosi, es va realitzar en primer lloc un estudi de les línies cel·lulars de LLA-T amb annexina V, que s'uneix a la fosfatidilserina a la part exterior de la membrana plasmàtica durant l'apoptosi. L'addició de 7aad va permetre, a més, distingir l'apoptosi primerenca de la tardana. Cèl·lules Jurkat i CEM es van tractar durant 72h amb L741-742 a 5 i 10  $\mu$ M, nemonaprida i RBI a 12 i 25  $\mu$ M. Els estudis en RPMI no van tenir-se adequadament i no es podien considerar. Com es pot observar a la

Figura **29A**, no es detecta un increment de la tinció d'Annexina V, per tant no hi ha activació de l'apoptosi, encara que si hi ha inducció de mort cel·lular mesurada per la positivitat de la tinció 7AAD. En la

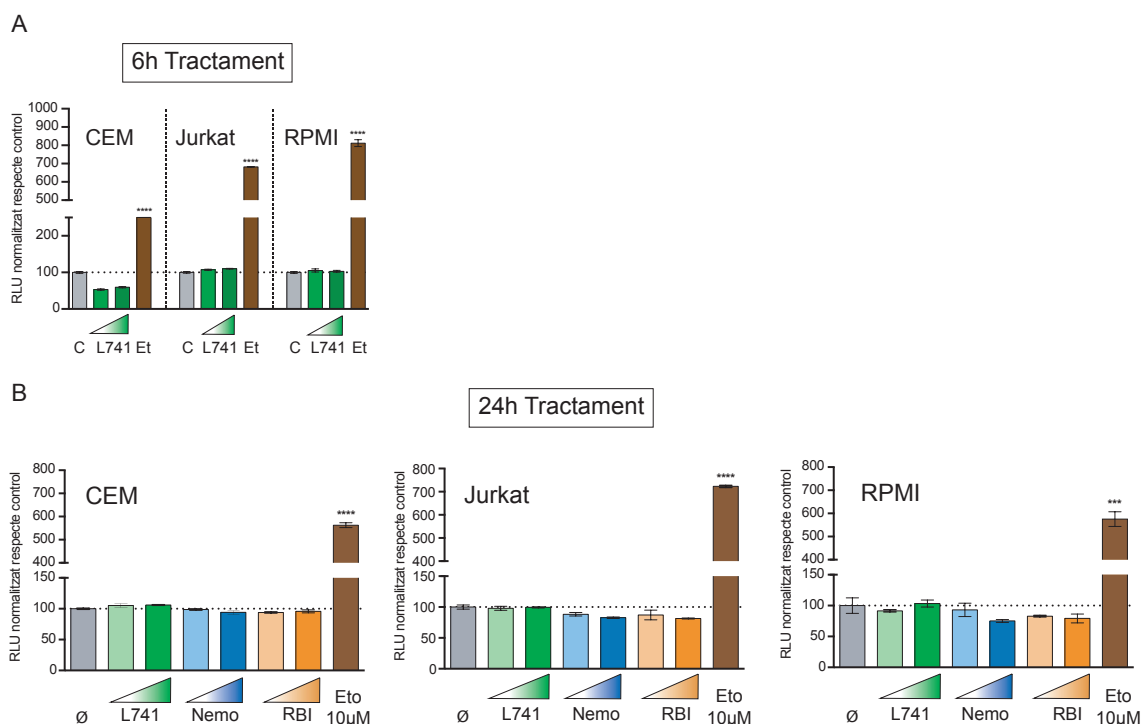
Figura **29B**, es troba recollida la viabilitat cel·lular amb els tractaments a diferents concentracions dels antagonistes de DRD4.



**Figura 29. Els antagonistes de DRD4 no indueixen l'expressió d'annexina V. A.** Gràfics de citometria de flux representatius de cèl·lules Jurkat tractades 72h amb vehicle, L741-742 a 5 i 10 $\mu$ M, Nemonapride i RBI-257 a 10 i 25  $\mu$ M. **B.** Cèl·lules CEM i Jurkat es van tractar 72h amb L741-742 (L741) a 5 i 10 $\mu$ M, nemonaprida (Nemo) i RBI-257 a 10 i 25  $\mu$ M i se'n va analitzar la viabilitat cel·lular a través de citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM d'un experiment representatiu de tres realitzats. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Conjuntament amb la inducció de l'expressió d'annexina V també es va voler avaluar el paper d'un dels principals efectors de l'apoptosi en les dues vies principals, l'activació de les caspases executores 3 i 7. Aquest estudi es va realitzar mitjançant un kit basat en luminescència que permet determinar el grau d'activació de caspases 3 i 7 (Caspase Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay, Promega). Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 6h amb L741-742 a 5 i 10 $\mu$ M, així com també durant 24h amb L741-742 a 5 i 10 $\mu$ M, nemonaprida i RBI-257 a 10 i 25  $\mu$ M. En ambdós experiments es van tractar també les línies cel·lulars de LLA-T amb etopòsid, un activador de caspases utilitzat com a control positiu. En concordança amb la manca d'expressió d'annexina V, es va observar que les caspases executores no s'activaven amb el tractament dels antagonistes a cap dels temps estudiats, contràriament a l'etopòsid que indueix una gran activació de caspases als estudis tant de 6h com de 24h (Figura 30).



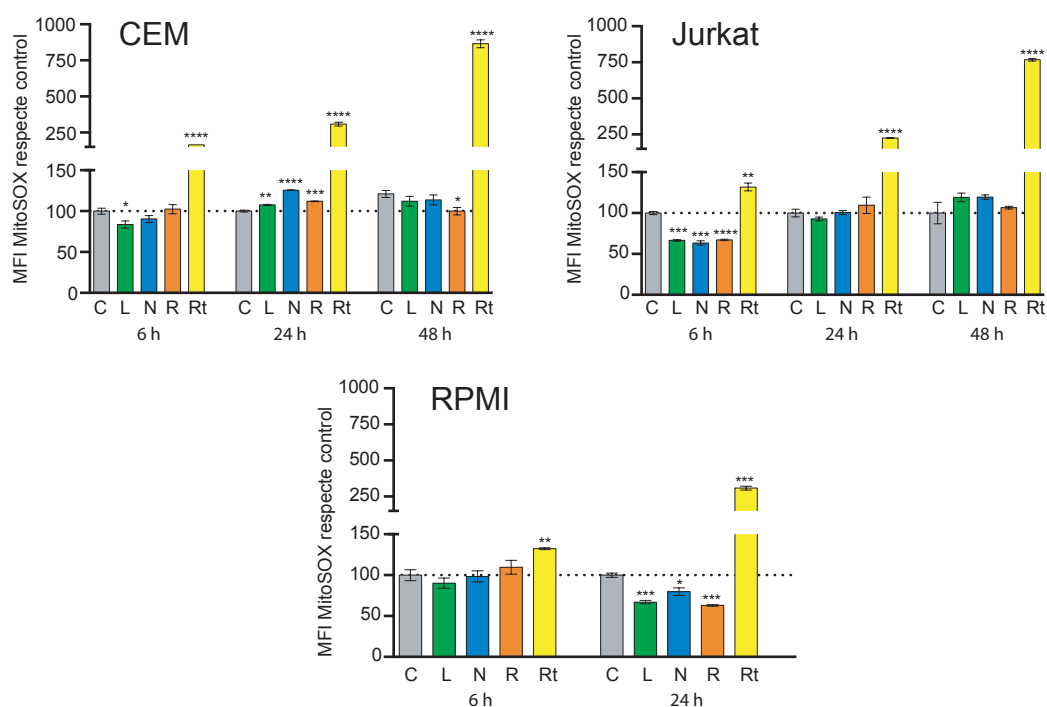


**Figura 30. Els antagonistes de DRD4 no indueixen una activació de caspases efectores a les 6h i 24h.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb vehicle, L741-742 (L741) 5 i 10µM, nemonaprida (Nemo) i RBI-257 (RBI) 10 i 25µM o etopòsid (Eto/Et) a 10 µM. **A.** 6h de tractament o **B.** 24h de tractament i es va analitzar per luminiscència l'activació de caspases mitjançant el kit Caspase Glo® 3/7 Assay. Es mostren unitats de luminescència relativa (RLU) respecte el control. Les barres representen la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu de dos realitzats. \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (t-test).

Aquests resultats concorden amb els resultats observats prèviament amb annexina V. El tractament dels antagonistes de DRD4 no indueix una tinció positiva d'annexina V com tampoc implica l'activació de les caspases executores. Per tant, sembla que el programa d'apoptòsi canònica no està activat en resposta al tractament.

Com s'ha explicat anteriorment, un dels detonants de la maquinària apoptòtica és la permeabilització irreversible de la membrana mitocondrial externa. Amb l'objectiu de poder descartar la implicació de l'apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular amb el tractament dels antagonistes de DRD4, es va analitzar la implicació del compartiment mitocondrial. Els primers estudis es van centrar en analitzar

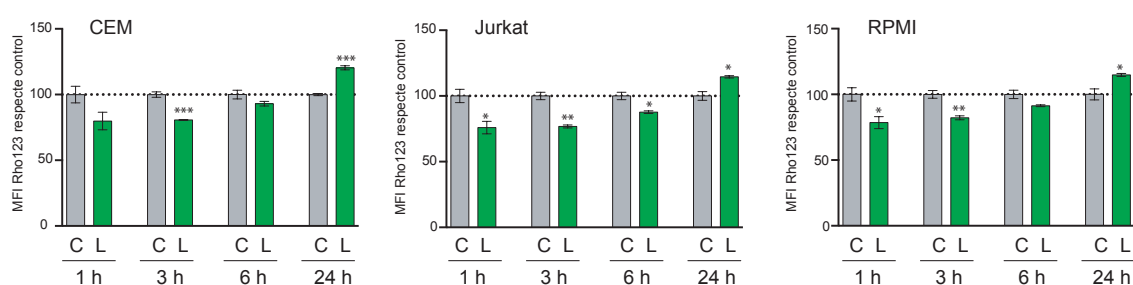
l'alteració en espècies reactives d'oxigen mitocondrials (mitROS). Per fer-ho, es va analitzar per citometria de flux la intensitat de fluorescència de la sonda específica mitROS MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator després de 6h, 24h i 48h de tractament dels antagonistes de DRD4 en línies cel·lulars de LLA-T. El tractament amb els antagonistes no indueix un increment de mitROS a cap dels temps observats, contràriament a la rotenona que es va utilitzar com a control positiu i que indueix un gran increment de les espècies reactives d'oxigen a tots els temps de tractament (Figura 31).



**Figura 31. Els antagonistes de DRD4 no indueixen una acumulació de mitROS.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 6h, 24h i 48h amb control de vehicle (C), L741-742 a 10  $\mu$ M (L), nemonaprida a 25  $\mu$ M (N), RBI-257 a 25  $\mu$ M (R) o rotenona 0,1  $\mu$ M (Rt) i es van incubar amb la sonda MitoSOX. Es mostren valors d'intensitat mitjana de la fluorescència (MFI) referits al control. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001 (t-test).

D'altra banda, es va estudiar el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_{mit}$ ), implicat en l'apoptosi i en el manteniment de l'homeòstasi mitocondrial, mitjançant la tinció amb rodamina 123. El potencial de membrana permet l'existència de la cadena respiratòria i la generació d'ATP. Sense aquest potencial, seria impossible

generar la transmissió d'electrons i tampoc la translocació de H<sup>+</sup> de l'espai intramitocondrial. La pèrdua del potencial de membrana és un efecte colateral de la inducció de l'apoptosi al perdre la funcionalitat del mitocondri. (Baracca et al. 2003). En els estudis realitzats amb línies cel·lulars de LLA-T tractades amb L741-742, no es va observar una disminució de  $\Delta\Psi_{mit}$ , sinó que, contràriament a més temps de tractament el  $\Delta\Psi_{mit}$  augmentava lleugerament respecte el control amb el tractament de L741-742 (Figura 32). Aquest augment pot ser degut a l'agregament i *quenching* posterior quan s'utilitzen altes dosis o temps llargs de tractaments. La despolarització de la membrana pot causar un quenching que indueix un augment transitori de la tinció (Perry et al. 2011). L'augment del potencial de la membrana també s'ha estudiat com a resposta a una baixada de ROS que provoca al seu torn el tancament dels canals de H<sup>+</sup> del mitocondri (Song et al. 2017) o bé al tancament dels canals directament (Zorova et al. 2018). Així doncs, considerant aquests precedents, els resultats sobre l'augment del potencial es probable que sigui el producte d'un artefacte experimental.



**Figura 32. L741-742 no indueix una pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 1h, 3h, 6h i 24h amb control de vehicle (C) o L741-742 a 10  $\mu$ M (L) i es va analitzar la tinció amb rodamina-123 per citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 (t-test).

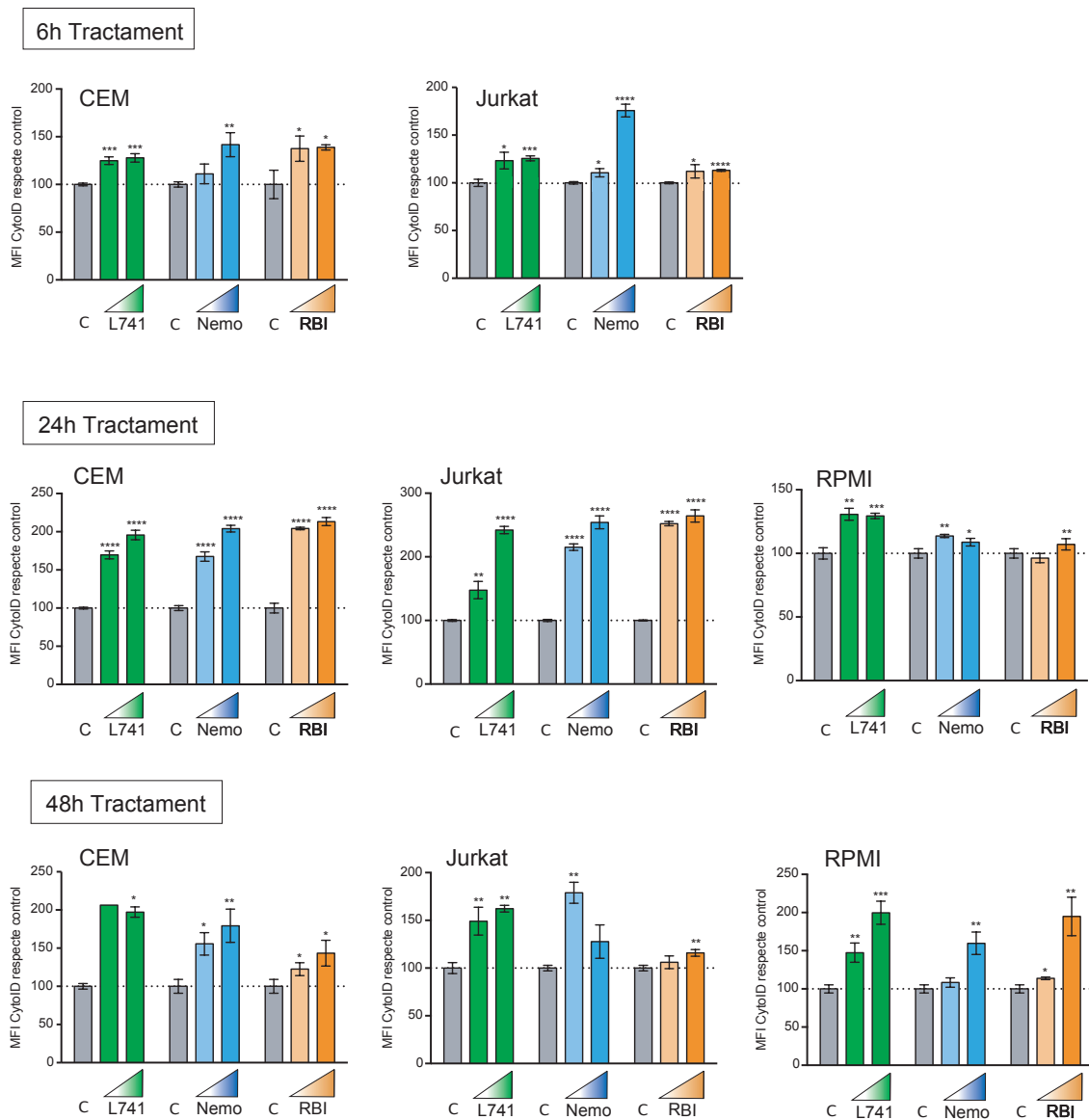
Així doncs, aquest conjunt d'estudis van servir per descartar l'apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular implicada en el tractament dels antagonistes de DRD4.

Conjuntament amb el descart de la implicació de la maquinària apoptòtica, els estudis sobre la generació de espècies reactives d'oxigen mitocondrials i l'avaluació del potencial de membrana, van permetre descartar una implicació del compartiment mitocondrial en el mecanisme d'acció dels antagonistes de DRD4.

#### **4.4.2 Mort cel·lular dependent d'autofàgia**

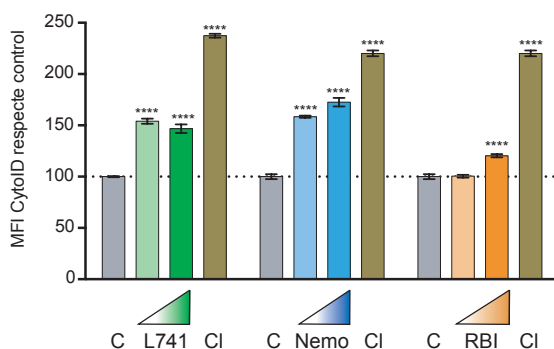
Descartada l'apoptosi, el camí cap a la identificació de la mort cel·lular programada es complicava. Malgrat es contempen una dotzena de tipus de mort cel·lular diferents (Galluzzi et al. 2018), l'elecció per a l'estudi de qualsevol d'elles en el nostre sistema mancava d'evidències que ens facilités el procés. Es va decidir tenir en compte precedents anteriors del grup de recerca. En treballs anteriors, s'havia determinat la importància del compartiment autofàgic-lisosomal en resposta a tractaments amb altres compostos (Cornet-Massana en revisió). Així doncs, es van iniciar els estudis del compartiment autofàgic i la mort cel·lular dependent d'autofàgia.

Per estudiar la inducció de l'autofàgia, cèl·lules de les línies cel·lulars de LLA-T es van tractar amb els antagonistes de DRD4 durant 6h, 24h i 48h a diferents concentracions. Passat el temps de tractament, es va analitzar la presència d'autofagosomes i autofagolisosomes com a marcadors específics de l'autofàgia, mitjançant la tinció Cyto-ID. Es va poder determinar, que el tractament amb els antagonistes de DRD4 induïen un augment de la fluorescència de Cyto-ID en totes les línies cel·lulars de LLA-T avaluades, per tant un augment del compartiment autofàgic (Figura 33). Aquests experiments representen la primera prova de la implicació del compartiment autofàgic en el tractament dels antagonistes de DRD4.



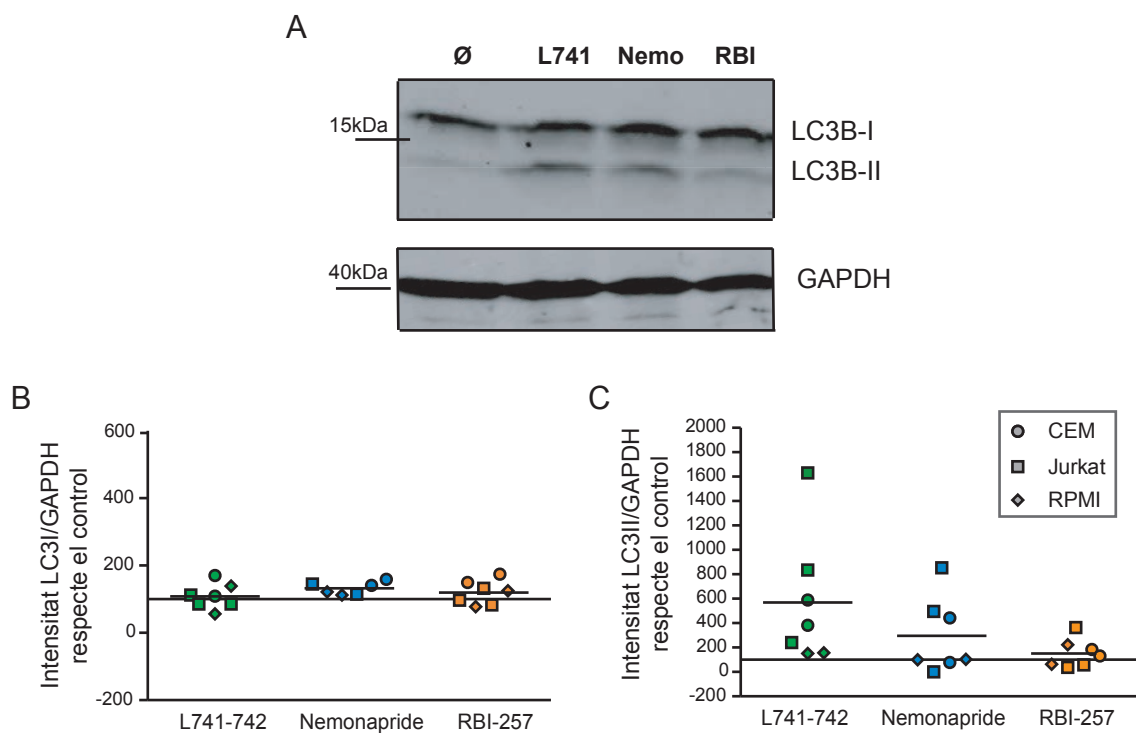
**Figura 33. Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autofàgic.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 6h, 24h i 48h amb vehicle (C), L741-742 (L741) a 5 i 10 μM, nemonapride (Nemo) i RBI-257 (RBI) 10 i 25μM i es va analitzar la intensitat de la fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica CYTO-ID a la població de cèl·lules vives com a mesura del volum del compartiment autofàgic. Les barres representen la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu de tres realitzats. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

Conjuntament amb la inducció de la autofàgia en les línies cel·lulars de LLA-T, es va voler estudiar si aquest efecte també s'indueix en la mostra de PDX de LLA-T. Cèl·lules d'aquesta mostra primària es van tractar durant 24h amb els antagonistes de DRD4 a diferents concentracions o amb cloroquina com a control positiu de la inducció de l'autofàgia. Passat el temps de tractament es van tenyir amb CYTOID i es van avaluar els canvis per citometria de flux. El tractament amb els antagonistes de DRD4, principalment L741-742 i nemonaprida indueixen un augment del compartiment autofàgic també en les cèl·lules pseudoprimitives de LLA-T (Figura 34).



**Figura 34. Antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autofàgic en PDX LLA-T.** Cèl·lules PDX LLA-T es van tractar 24h amb control de vehicle (C), L741-742 (L741) a 5 i 10 μM, nemonaprida (Nemo) i RBI-257 (RBI) 10 i 25 μM o Cloroquina (Cl) a 10 μM i es va analitzar la intensitat de la fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica CYTO-ID a la població de cèl·lules vives com a mesura del volum del compartiment autofàgic. Les barres representen la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu de dos realitzats. \*\*\*\* p < 0,0001 (t-test).

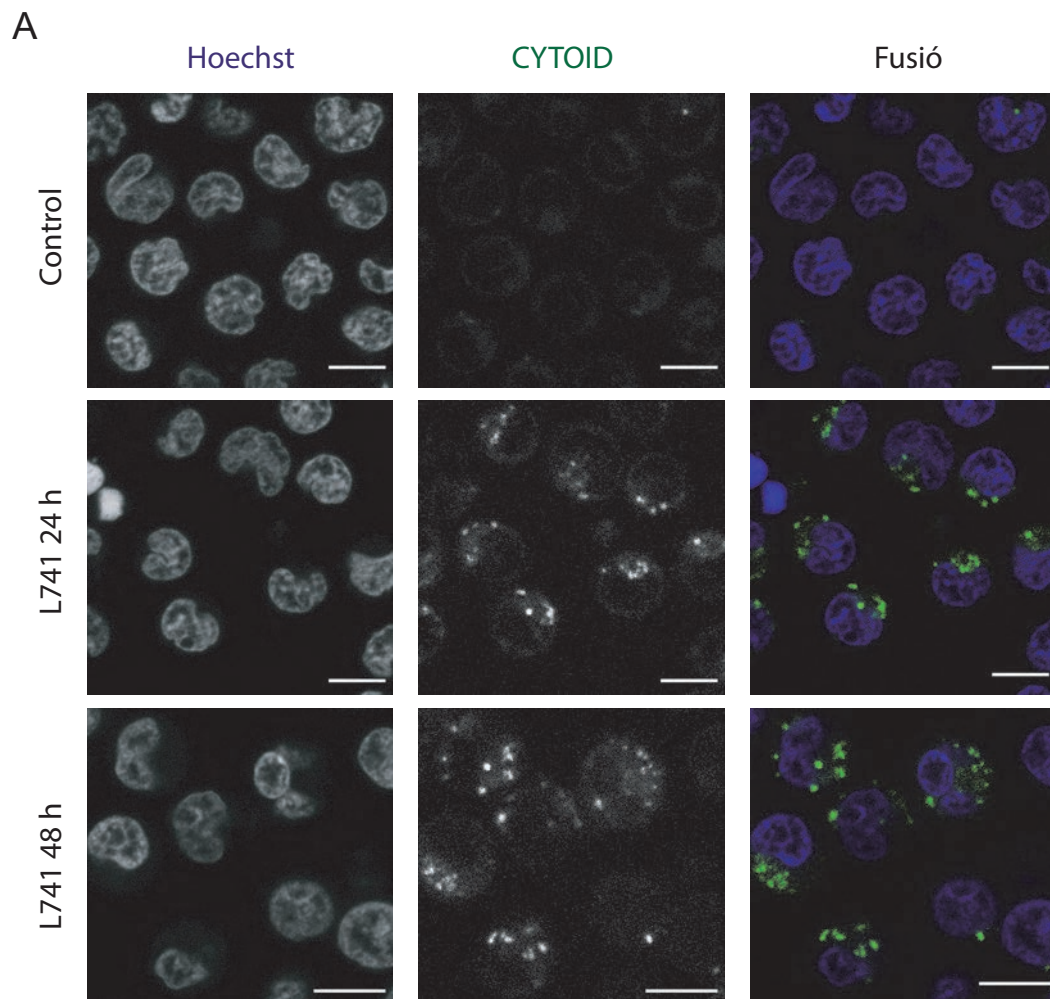
Un dels marcadors més acceptades en l'estudi del compartiment autofàgic és la forma lipidada de la proteïna LC3 (LC3-II). És tracta de la proteïna que es troba de forma superficial als autofagosomes i que no és eliminada durant el procés de elongació de l'autofagosoma. Representa una de les mesures més estandarditzades per l'estudi de l'autofàgia (Y. Feng et al. 2014). Per a confirmar el que s'havia observat a nivell de Cyto-ID, es va analitzar la quantitat de proteïna LC3-II via western blot. El tractament dels antagonistes induïa un augment de la forma de LC3-II (Figura 35C) molt més elevat que els canvis de la isoforma no lipidada (LC3I) (Figura 35B), sent L74-1-742 el tractament que més induïa de la forma LC3-II presentava (Figura 35).



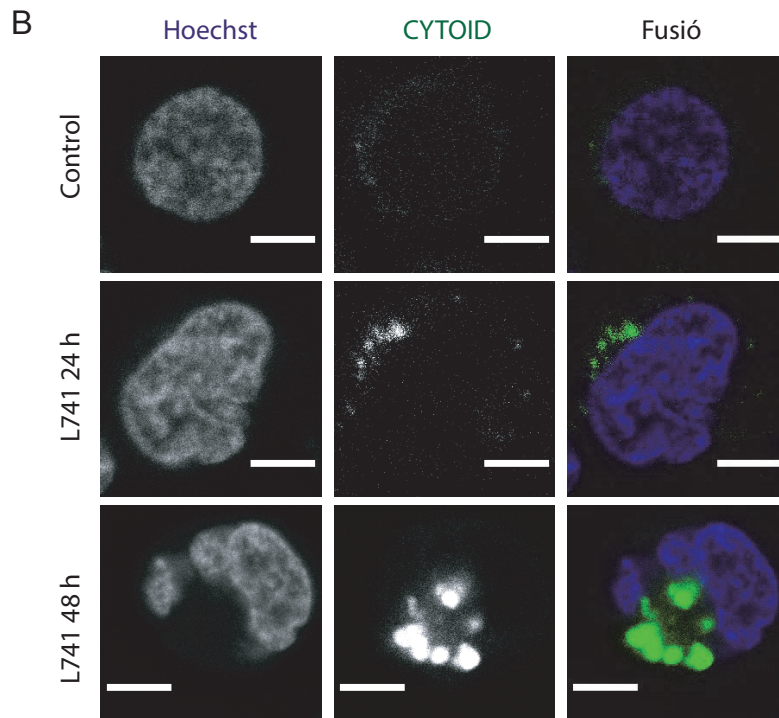
**Figura 35.** Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del marcador autofàgic LC3B-II en LLA-T. Línies cel·lulars de LLA-T (CEM, Jurkat i RPMI) es van tractar 72h amb vehicle (Ø), L741-742 10 $\mu$ M (L741), nemonaprida 25 $\mu$ M (Nemo) i RBI-257 (RBI) 25 $\mu$ M i se'n van extreure proteïnes. Es van realitzar *Western Blots* amb anticossos per a LC3 i el control GAPDH. **A.** Membrana representativa de Jurkat. **B.** Quantificació de les bandes LC3-I respecte control **C.** Quantificació de les bandes LC3-II respecte control. Cada punt simbolitza una rèplica experimental diferent.

Els resultats obtinguts de CYTOID a nivell de citometria de flux així com els obtinguts a nivell de proteïna per *western blot*, van permetre determinar que els antagonistes de DRD4 induïen un efecte general sobre l'autofàgia però no les característiques d'aquest efecte. Així doncs, per poder aprofundir més en l'estudi del compartiment autofàgic es va procedir al estudi per microscòpia de fluorescència en viu. Cèl·lules de Jurkat, CEM i RPMI es van tractar durant 24h amb L741-742 i es van tenyir per CYTOID i es van analitzar els canvis per microscòpia de fluorescència. Com s'observa en la figura Figura 36, el tractament amb L741-742 indueix la formació d'autofagosomes de forma temps dependent. L'efecte sobre el compartiment autofàgic sembla evident, mentre que els controls no mostren pràcticament presència d'autofagosomes, el tractament amb L741-742 indueix un increment de

vesícules discretes al llarg del citoplasma. Aquests resultats concorden amb l'increment de la MFI de CYTOID observat per citometria de flux.





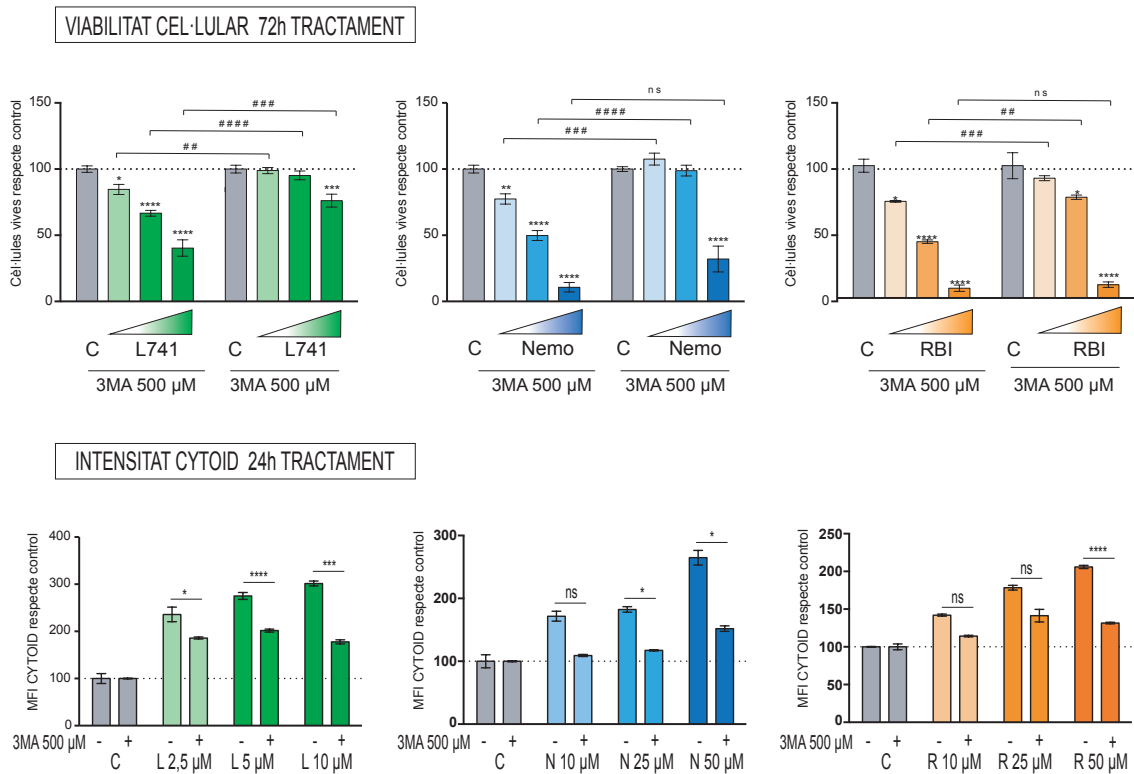


**Figura 36. El tractament amb L741-742 indueix un augment en el compartiment autofàgic.** Cèl·lules Jurkat es van tractar amb L741-742 a 5  $\mu$ M durant 24h o 48h, es van tenyir amb CYTOID i Hoechst 33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Blau, hoechst33342; verd, CYTOID. Les barres d'escala corresponen a 10  $\mu$ m (A) o 5  $\mu$ m (B).

La inducció de l'autofàgia com s'ha explicat en apartats anteriors, és un procés que s'activa en resposta a múltiples estímuls com l'estrès o el dèficit de nutrients entre altres (Klionsky 2007) . Així doncs es va voler aprofundir més en els estudis per tal d'assegurar que aquest augment del compartiment autofàgic observat estava relacionat amb la mort cel·lular, podent així considerar una mort cel·lular dependent d'autofàgia. Tal i com dicta la darrera revisió de les nomenclatures de les morts cel·lulars programades, per tal de validar la mort cel·lular dependent d'autofàgia cal que el procés de mort sigui revertit en presència d'un inhibidor específic de l'autofàgia (Galluzzi et al. 2018).

Tenint en compte aquesta consideració, es va procedir a estudiar la viabilitat cel·lular amb el tractament dels antagonistes de DRD4 en presència d'un inhibidor específic de l'autofàgia com és la 3-metiladenina (3MA). Cèl·lules CEM, Jurkat es van

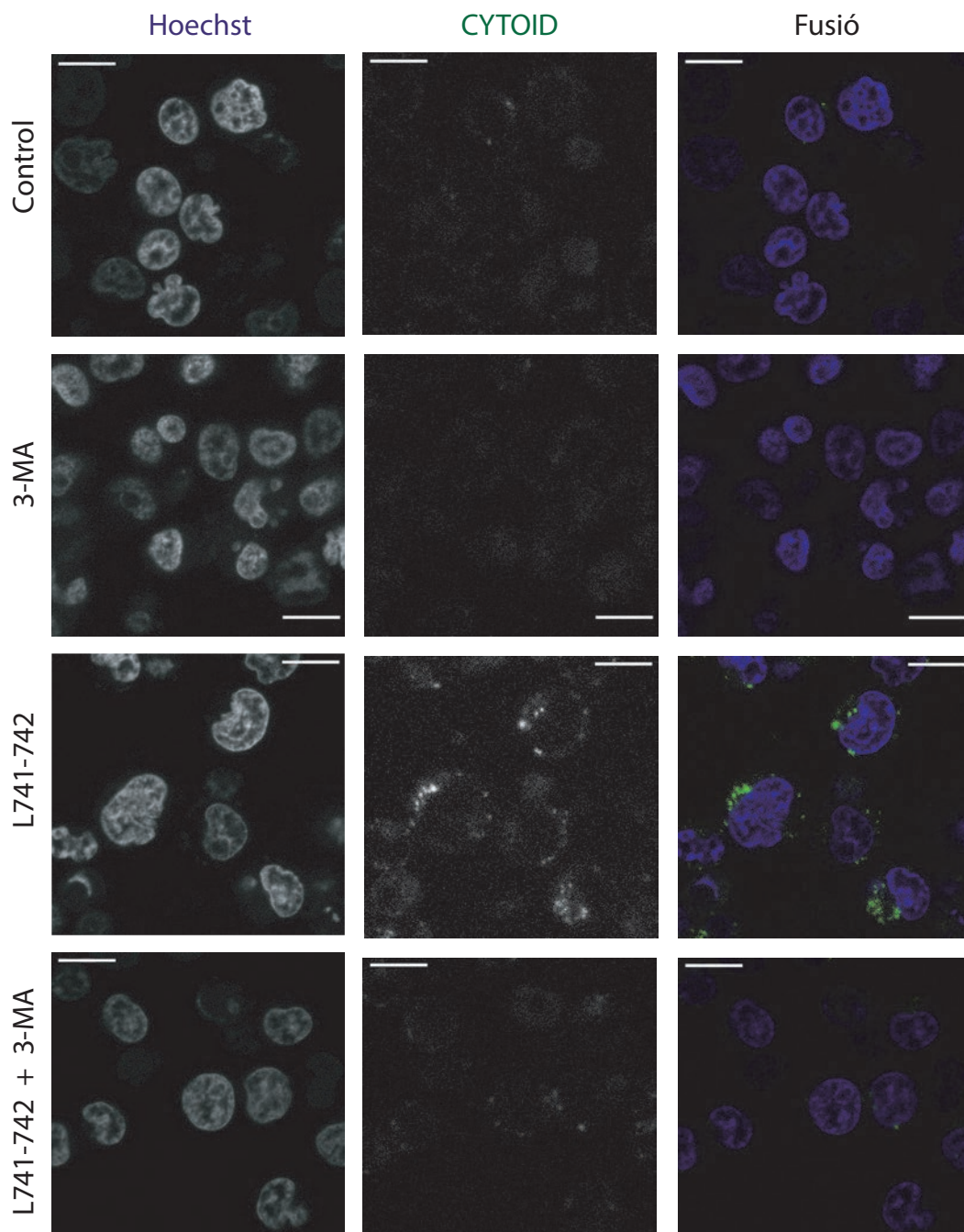
tractar amb vehicle o amb concentracions ascendents de L741-742, nemonaprida i RBI-257 en absència o presència de 3MA 500  $\mu$ M. Les cèl·lules de les línies de LLA-T es van tractar durant 24h i 72h i se'n va analitzar la viabilitat cel·lular i la intensitat de CYTOID respectivament a través de citometria de flux. (Figura 37).



**Figura 37. 3-MA reverteix els efectes citotòxics i sobre el compartiment autofàgic dels antagonistes de DRD4.** Cèl·lules CEM es van tractar amb control de vehicle (C), L741-742 (L741/L) a 2,5/ 5 /10 $\mu$ M, nemonaprida (Nemo/N) i RBI-257 (RBI/R) a 10/ 25 / 50 $\mu$ M en absència o presència de 3MA a 500  $\mu$ M. Panell superior representa la viabilitat cel·lular que es va analitzar pasades 72h de tractament i el panell inferior representa la MFI de CYTOID analitzada a les 24h de tractament. Ambdós experiments van ser analitzats per citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de tres realitzats. \*p<0,05; \*\* o ##p<0,01; \*\*\* o ###p<0,001; \*\*\*\* o ####p<0,0001 (t-test).

Com recull la Figura 37, la presència de 3-MA reverteix els efectes citotòxics dels antagonistes de DRD4. En presència de l'inhibidor del compartiment autofàgic, també disminueix la tinció de Cyto-ID a les 24h de tractament. El bloqueig de l'autofàgia amb l'inhibidor 3-MA evita l'activació del compartiment autofàgic (Tinció CytoID 24h) i evita l'efecte citotòxic (Viabilitat cel·lular 72h). Aquests estudis es van

aprofundir avaluant els efecte de 3-MA sobre els antagonistes de DRD4 també a nivell de microscòpia de fluorescència en viu. Com s'observa a la Figura 38, el tractament de 3-MA amb els antagonistes de DRD4 reverteix la formació d'autofagosomes en Jurkat. Només es va utilitzar la línia cel·lular Jurkat ates que en la resta no es van poder determinar els efectes de forma tant evident.



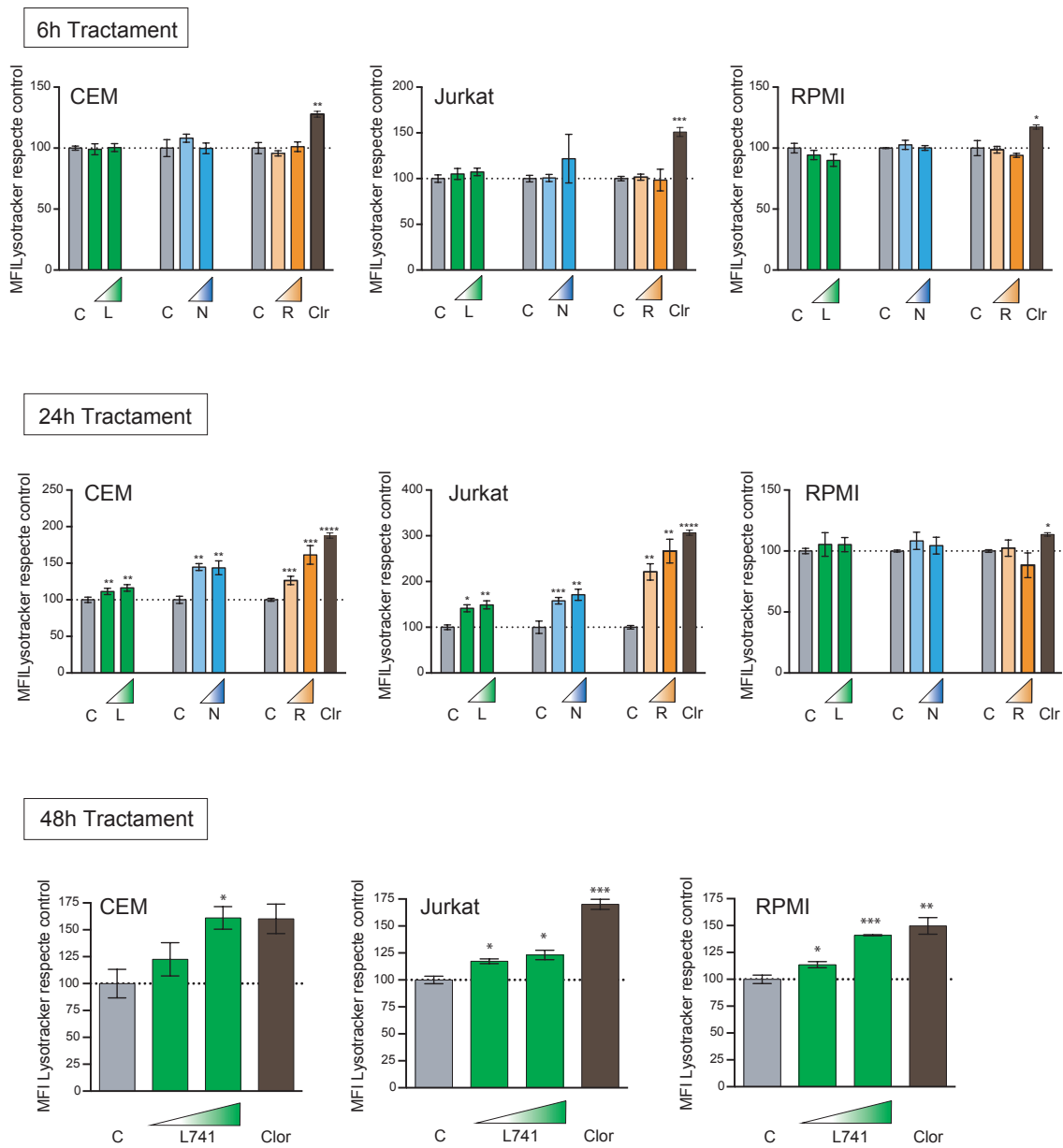
**Figura 38. 3-MA reverteix la formació d'autofagosomes.** Cèl·lules Jurkat es van tractar amb L741-742 5  $\mu$ M 24h, es van tenyir amb CYTOID i Hoechst 33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Blau, hoechst33342; verd/blanc, CYTOID. Les barres d'escala corresponen a 10  $\mu$ m.

Aquest conjunt d'estudis permeten determinar la inducció de l'autofàgia en resposta al tractament amb els antagonistes de DRD4 així com també sembla que el procés de mort cel·lular dependent d'autofàgia està implicat en el mecanisme de mort cel·lular programada .

#### **4.4.2.1 Avaluació del compartiment lisosomal**

Un cop validada la importància del compartiment autofàgic, va resultar d'interès l'estudi del compartiment lisosomal. El destí final dels autofagosomes es la fusió amb els lisosomes per la degradació del seu contingut. Per tant doncs, aquest orgànul està estretament relacionat amb l'autofàgia i té implicacions també en la mort cel·lular dependent d'autofàgia.

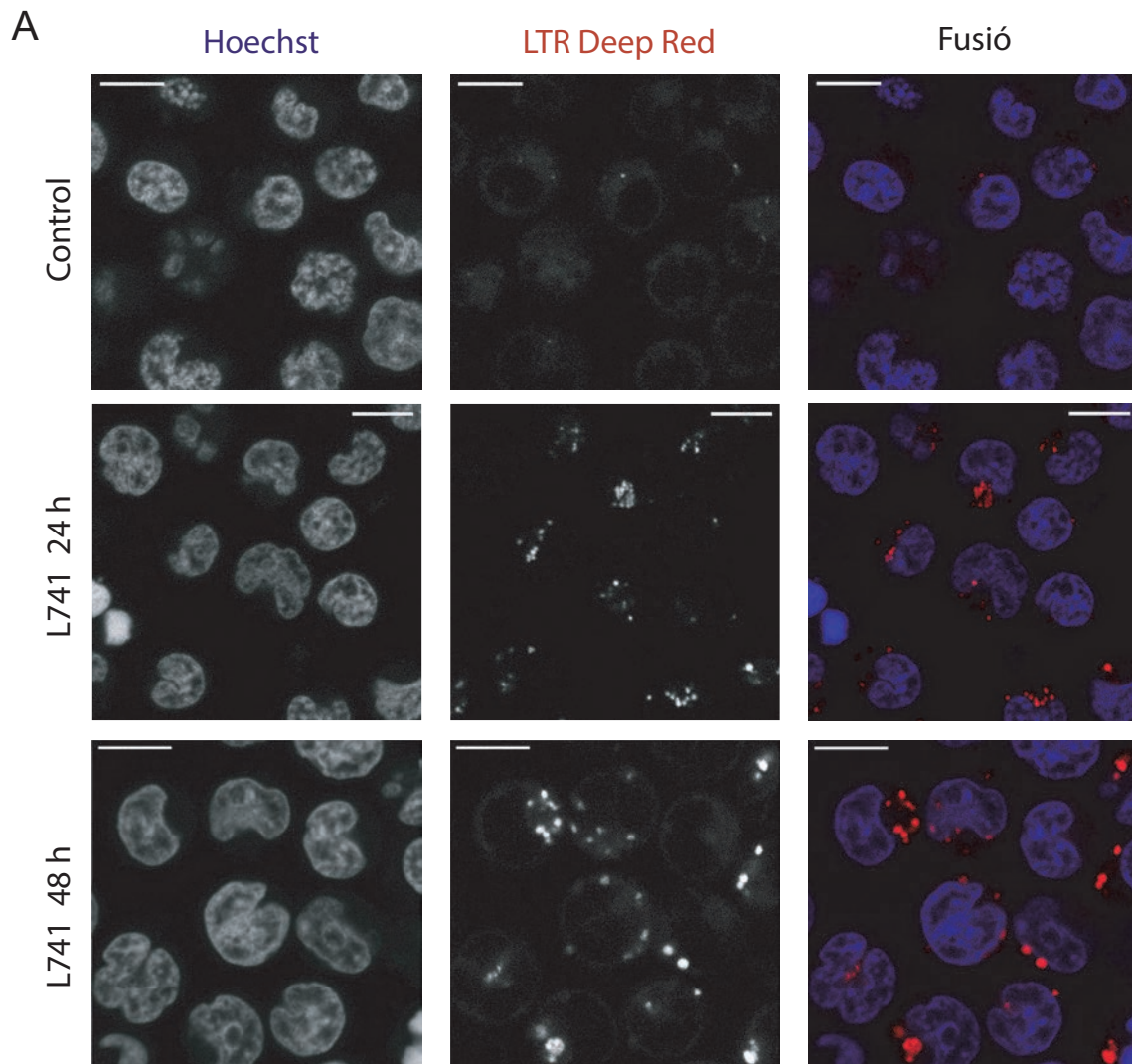
Els primers estudis sobre el compartiment lisosomal es van fer a través de citometria de flux. Per avaluar els canvis sobre els lisosomes es va fer servir la sonda *LysoTracker Deep Red*, igual manera que es va fer per l'avaluació de l'autofàgia, cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 24h i 48h amb els antagonistes de DRD4 i passat el temps de tractament es van tenyir amb *LysoTracker Deep Red* i es van avaluar els canvis per citometria de flux. En concordança amb el que s'havia observat en referència als autofagosomes, el tractament amb els antagonistes de DRD4 induïa un increment en la massa del compartiment lisosomal, ja sigui en nombre o en mida dels lisosomes (Figura 39).

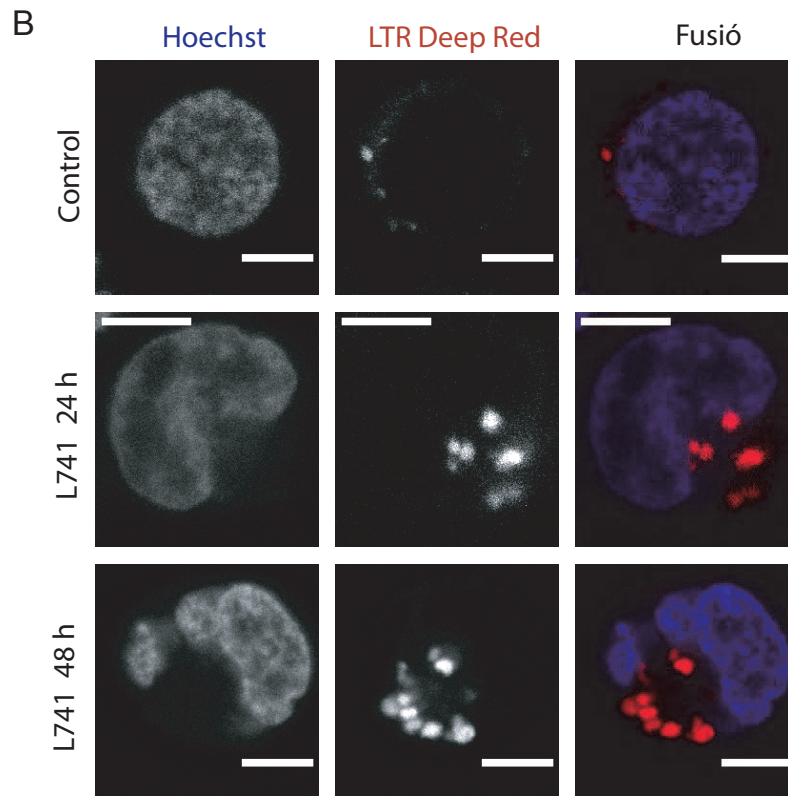


**Figura 39. Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment de la massa lisosomal.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar a 24 o 48h amb control de vehicle (C), L741-742 (L741/L) a 5 i 10  $\mu\text{M}$ , nemonaprida (N) i RBI-257 (R) a 10 i 25  $\mu\text{M}$  o cloroquina (Clr/Clr) a 20  $\mu\text{M}$  i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica Lysotracker Deep Red a la població de cèl·lules vives com a mesura de la massa lisosomal. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de 3 realitzats. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (t-test).



L'avaluació dels lisosomes a través de citometria de flux, va permetre identificar que els antagonistes de DRD4 induïen un increment sobre el compartiment lisosomal, però no permetia caracteritzar la morfologia d'aquest efecte. Així doncs, anàlogament als estudis realitzats per l'avaluació del compartiment autofàgic, es van aprofundir els estudis amb microscòpia de fluorescència. Es van tractar amb L741-742 cèl·lules de Jurkat durant 24h i 48h.



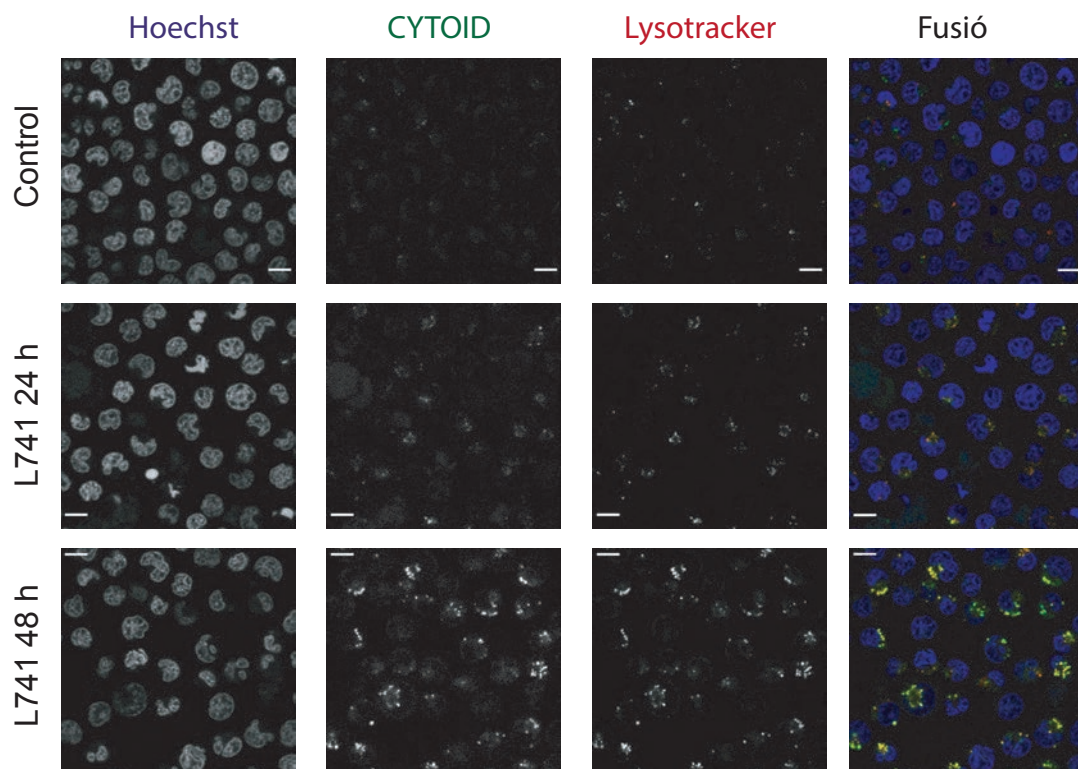


**Figura 40. El tractament amb L741-742 indueix un augment en el compartiment lisosomal.** Cèl·lules Jurkat es van tractar amb L741-742 a 5  $\mu$ M durant 24h o 48h, es van tenyir amb *Lysotracker Deep Red* (*LTR Deep Red*) i Hoechst 33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres d'escala corresponen a **A.** 10  $\mu$ m o **B.** 5  $\mu$ m.

Com es pot observar en la Figura 40, aquests experiments estaven en concordança amb els resultats obtinguts en els estudis via citometria de flux. El tractament amb els antagonistes de DRD4 indueix un fort increment en la massa lisosomal. Amb l'addició de L741-742 s'observa l'aparició d'unes zones fluorescents discretes que no són detectables en les cèl·lules tractades amb vehicle. En imatges de més augment (Figura 40B) queda patent aquesta aparició de massa lisosomal amb el tractament.

El punt d'inici de la maquinària autofàgica és la formació d'autofagosomes, el destí dels quals es la fusió amb els lisosomes per a la degradació del material que contenen (Yu, Chen, and Tooze 2018). Els estudis realitzats sobre el compartiment

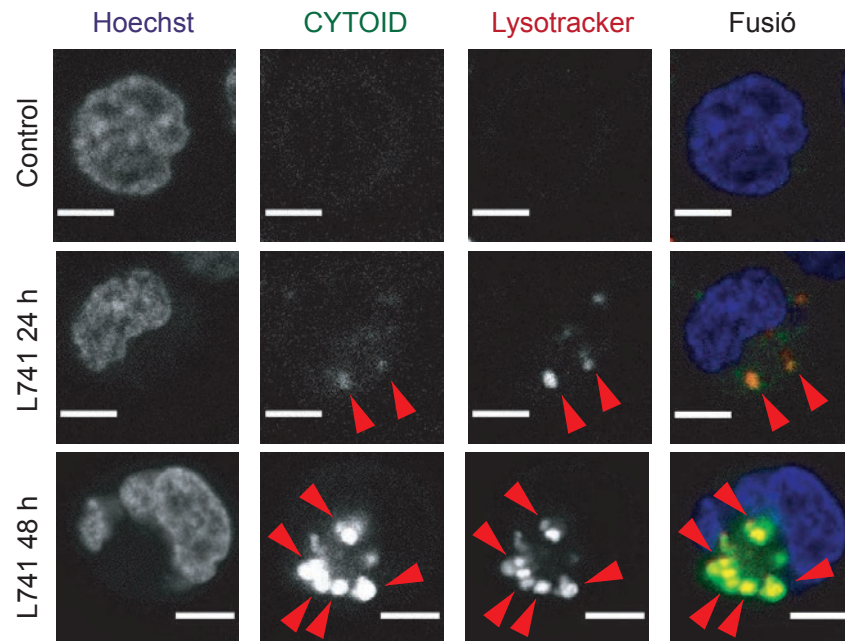
de reciclatge sembla que hi ha una inducció de la formació d'autofagosomes així com també del compartiment lisosomal en resposta al tractament dels antagonistes de DRD4. Considerant que el destí dels autofagosomes és la fusió amb els lisosomes, es va voler certificar aquesta fusió entre les vesícules generades en resposta al tractament. Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 24h i 48h amb L741-742, es van tenyir conjuntament amb *Lysotracker Deep Red* i CytoID i es va analitzar en viu per microscòpia de fluorescència (Figura 41).



**Figura 41. L741-742 induïx un augment del compartiment autofàgic i lisosomal.** Cèl·lules Jurkat es van tractar amb vehicle de control o L741-742 a 10  $\mu$ M durant 24h o 48h, es van tenyir amb CYTOID, *Lysotracker Deep Red* (*Lysotracker*) i Hoechst 33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres d'escala corresponen a 10  $\mu$ m.

Malgrat no poder assegurar una fusió dels autofagosomes i lisosomes generats en resposta al tractament, sí que es pot determinar que ambdues vesícules es troben localitzades als mateixos punts del citoplasma cel·lular. Aquesta localització es molt més evident a les 48h de tractament (Figura 42).





**Figura 42. L741-742 indueix un augment del compartiment autofàgic i lisosomal.** Imatges anàlogues a les de la Figura 41. Les fletxes vermelles marquen vesícules colocalitzants. Les barres d'escala corresponen a 5 $\mu$ m.

En concordança amb la dinàmica del compartiment de reciclatge explicada en apartats anteriors, L741-742 indueix un augment de autofagosomes i lisosomes que a les 48h de tractament es troben localitzats conjuntament al citoplasma cel·lular suggerint doncs, que els autofagosomes generats en resposta al tractament es fusionen amb els lisosomes.

#### **4.5. Estudi de la regulació de l'expressió gènica en resposta al tractament amb antagonistes de DRD4**

Si bé els estudis sobre el compartiment autofàgic i lisosomal aportaven informació molt valuosa sobre el mecanisme d'acció, únicament era informació relativa al procés de mort cel·lular és a dir, informació sobre el tram final del procés. Malgrat les afectacions sobre el compartiment de reciclatge són clares, no permeten explicar el mecanisme d'acció antileucèmica dels antagonistes de DRD4 al complet, quina és la diana que desencadena la mort cel·lular.

El recorregut fins a aquest punt del treball havia estat tortuós i havia aportat informació valuosa però inconnexa. Així doncs, amb l'ànim de poder agermanar la

informació obtinguda fins al moment sobre el mecanisme d'acció, i poder connectar els punts que faltaven, es va decidir dur a terme un estudi de l'expressió gènica (*array*) en resposta al tractament dels antagonistes de DRD4

L'última estratègia emprada per a la identificació del mecanisme d'acció associat al tractament amb els antagonistes de DRD4 va ser l'estudi de l'expressió gènica en resposta al tractament. L'objectiu era poder determinar canvis substancials en l'expressió gènica que poguessin vincular-se posteriorment a una ruta de senyalització concreta, a una diana molecular o bé a un mecanisme d'acció independent de diana molecular. En aquest treball es va realitzar l'*array* d'expressió Clariom S (Affymetrix). L'elecció es basava, principalment, en l'extensa cobertura de tots les gens actualment anotats, que permet detectar l'expressió de biomarcadors amb funció coneguda.

Així doncs, cèl·lules de CEM i RPMI es van tractar a durant 12h i 24h, amb L741-742 a 10  $\mu$ M i RBI-257 a 25  $\mu$ M. Es van utilitzar CEM i RPMI atès que són dues línies cel·lulars amb un nivell maduratiu molt diferent, podent així minimitzar les variacions degudes a la heterogeneïtat clonal. Es va prioritzar el tractament a diferents temps i amb dos antagonistes diferents, abans que el nombre de rèpliques per identificar així la firma gènica comú en ambdós tractaments i en ambdues línies. Els resultats d'expressió gènica es van analitzar amb el programa Affymetrix Expression Console Software i amb l'ajuda indispensable de l'empresa *Mind The Byte*. Es van estudiar els canvis en l'expressió gènica en cada una de les condicions de tractament. Els canvis inclouen aquells gens que es sobre expressaven (*fold change* >2) així com els que es reprimien (*fold change* <-2). Integrant les dades de gens de les múltiples comparacions realitzades entre tractaments i controls, es van seleccionar només aquells gens que estaven presents en almenys 3 comparatives diferents: temps de tractament, compost i línia cel·lular (Taula 10).

<b>Tendència a sobreexpressió en tractament respecte control</b>	
<b>MYC</b> <b>LMO1</b> <b>LIMCH1</b>	Funció en múltiples processos de transformació leucèmica.
<b>CD2</b>	Antigen superficial expressat en cèl·lules T
<b>EXOSC5</b>	Integrant del complex exosoma implicat en la degradació de RNA
<b>OLMF4</b>	Factor antiapoptòtic implicat en el creixement tumoral.
<b>Tendència a reprimir expressió en tractament respecte control</b>	
<b>ARPP21</b>	Fosfoproteïna implicada en cAMP
<b>CCGN2</b>	Ciclina G2
<b>MIR568</b>	Micro RNA 568
<b>ZBTB20</b>	Funció important en múltiples processos com neurogènesi, manteniment de l'homeòstasi de la glucosa i creixement postnatal.
<b>TSC22D3</b>	Protecció de l'apoptosi de les cèl·lules T en privació de IL2. En cèl·lules T, inhibició de translocació al nucli de NFKB1.
<b>FASN</b>	Síntesi del palmitat partint d'acetil-CoA i malonil-CoA.
<b>RNF-145</b>	Funció implicada en l'homeòstasi del colesterol. A altes concentracions d'esterol regula negativament HMGCR
<b>HMGCR</b>	Enzim limitant en la síntesi de colesterol.

**Taula 10. Gens amb canvis d'expressió substancials en resposta al tractament.** Es mostren aquells gens l'expressió dels quals estava sobreexpressada o reprimida en almenys 3 condicions diferents d'avaluació: Temps de tractament, compost i línia cel·lular.

En aquest primer cribratge dels resultats, es van identificar gens amb funcions molt variades. Entre els més freqüents, van suscitar especial interès aquells implicats en la síntesi d'àcids grassos i colesterol. El metabolisme lipídic i la seva relació amb el compartiment de reciclatge cel·lular ha estat àmpliament estudiada. La regulació

d'un procés i l'altre es pot entendre i explicar en ambdues direccions (Jaishy and Abel 2016).

Considerant doncs, la relació descrita entre d'ambdós processos i els resultats previs sobre la clara afectació del compartiment de reciclatge, es va decidir estudiar el metabolisme lipídic en el nostre sistema.

#### 4.6. Estudi del metabolisme lipídic

##### 4.6.1. Estudi de l'expressió gènica del metabolisme lipídic amb el tractament dels antagonistes de DRD4.

El primer pas en aquesta nova direcció va ser un nou anàlisi de l'*array*. Aquest segon anàlisi va ser dut a terme per l'empresa MindTheByte. Es van considerar només els gens implicats en el metabolisme lipídic. Es van seleccionar els gens que se sobreexpressaven (fold change > 0) i els que es reprimien (fold change < 0). El criteri de selecció de gens en aquest cas va ser menys estricte per poder tenir una visió el màxim d'àmplia del metabolisme lipídic en resposta el tractament. Cada gen, a més, es va relacionar amb les proteïnes per les quals codifica. Es van realitzar les mateixes comparatives que en el primer estudi, i es van integrar les dades de totes elles aconseguint així, un patró d'expressió de gens involucrats amb el metabolisme lipídic després del tractament. Els gens seleccionats presents en almenys tres de les comparatives realitzades, es troben recollit a la Taula 11. Gens amb implicació en el metabolisme lipídic sobreexpressats o reprimits en resposta al tractament amb antagonistes de DRD4. Es mostren només aquells gens presents en almenys dues comparatives realitzades: *temps de tractament*, *compost* i *línia cel·lular*. Els gens seleccionats són també aquells amb el major *fold change*.

<b>Gens reprimits en tractament respecte control. <i>Fold Change</i> &lt; 0</b>			
<b>Nom gen</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Nombre comparatives</b>	<b>Funció en el metabolisme lipídic</b>
DHCR24	- 3,93	5	Síntesi colesterol
LPCAT1	- 3,16	3	Síntesi fosfolípids
FASN	- 3,23	5	Síntesi àcids grassos

MBOAT7	- 2,33	2	Re-acilació fosfolípids
HMGCR	- 4,09	5	Síntesi colesterol
HMGCS1	- 4,05	4	Síntesi colesterol
ELOVL6	- 2,89	4	Elongació d'àcids grassos
LSS	- 3,11	4	Síntesi colesterol
ACACA	- 2,2	2	Síntesi àcids grassos
<b>Gens reprimits en tractament respecte control. <i>Fold Change</i> &gt; 0</b>			
<b>Nom gen</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Nombre comparatives</b>	<b>Funció en el metabolisme lipídic</b>
SCAP	2,02	2	Transport de colesterol al aparell de Golgi
ABCA1	6,85	3	Transport del colesterol
RARRES3	2,23	2	Hidròlisis grups acil en fosfatidilcolina i fosfatidiletanolamina
STARD6	2,35	2	Transport d'esterols
ACADVL	2,31	3	Oxidació àcids grassos mitocondrials

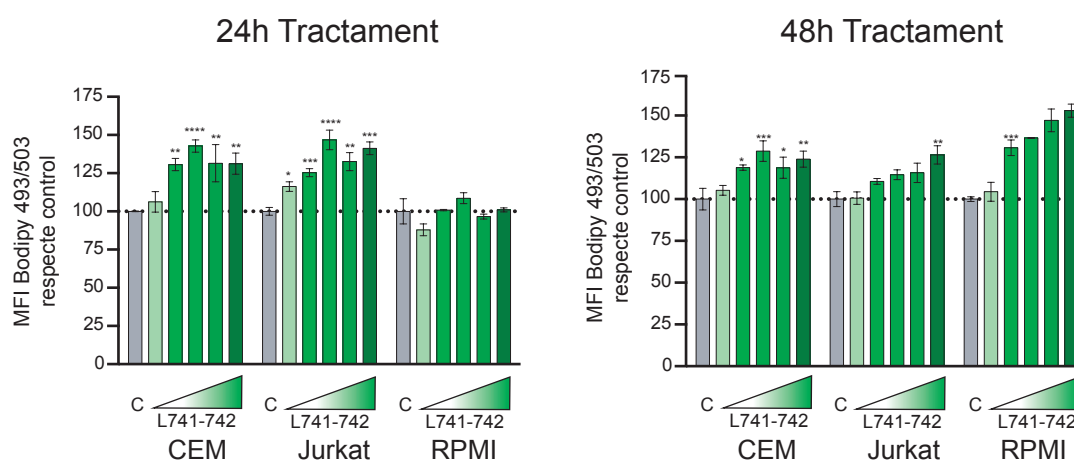
**Taula 11. Gens amb implicació en el metabolisme lipídic sobreexpressats o reprimits en resposta al tractament amb antagonistes de DRD4.** Es mostren només aquells gens presents en almenys dues comparatives realitzades: temps de tractament, compost i línia cel·lular. Els gens seleccionats són també aquells amb el major *fold change*

Analitzant els patrons d'expressió gènica, es va determinar que el tractament tendia a reprimir l'expressió de gens implicats en la síntesi d'àcids grassos, colesterol i fosfolípids. Conjuntament amb la repressió d'aquesta família de gens, altres implicats en el trànsit del colesterol presentaven sobreexpressió.

#### **4.6.2. Estudi dels lípids neutres amb el tractament dels antagonistes de DRD4.**

Amb els anàlisis bioinformàtics dels arrays, es va determinar una repressió de gens implicats en la síntesi de lípids. Es va decidir estudiar el contingut lipídic total de la cèl·lula i com variava aquest en presència del tractament. Amb aquest objectiu, es va emprar la sonda Bodipy 493/503. Una sonda fluorescent que tenyeix específicament els lípids neutres de la cèl·lula, aquesta sonda pot ser emprada per a la quantificació a nivell de citometria de flux i, també, per a la caracterització de *lipid*

*droplets* per microscòpia (Qiu and Simon 2016). Per poder determinar de forma quantitativa aquest efecte sobre els lípids, cèl·lules CEM, Jurat i RPMI es van tractar amb L741-742 durant 24h o 48h i posteriorment es van tenyir amb la sonda Bodipy 493/503. En els estudis del metabolisme lipídic només es va utilitzar preferencialment el compost L741-742 atès que era el que millor perfil preclínic presentava. El tractament amb L741-742, la posterior tinció amb Bodipy 493/503 i l'anàlisi per citometria de flux, va comportar un augment dels lípids neutres totals de la cèl·lula en resposta al tractament a tots els temps avaluats (Figura 43).



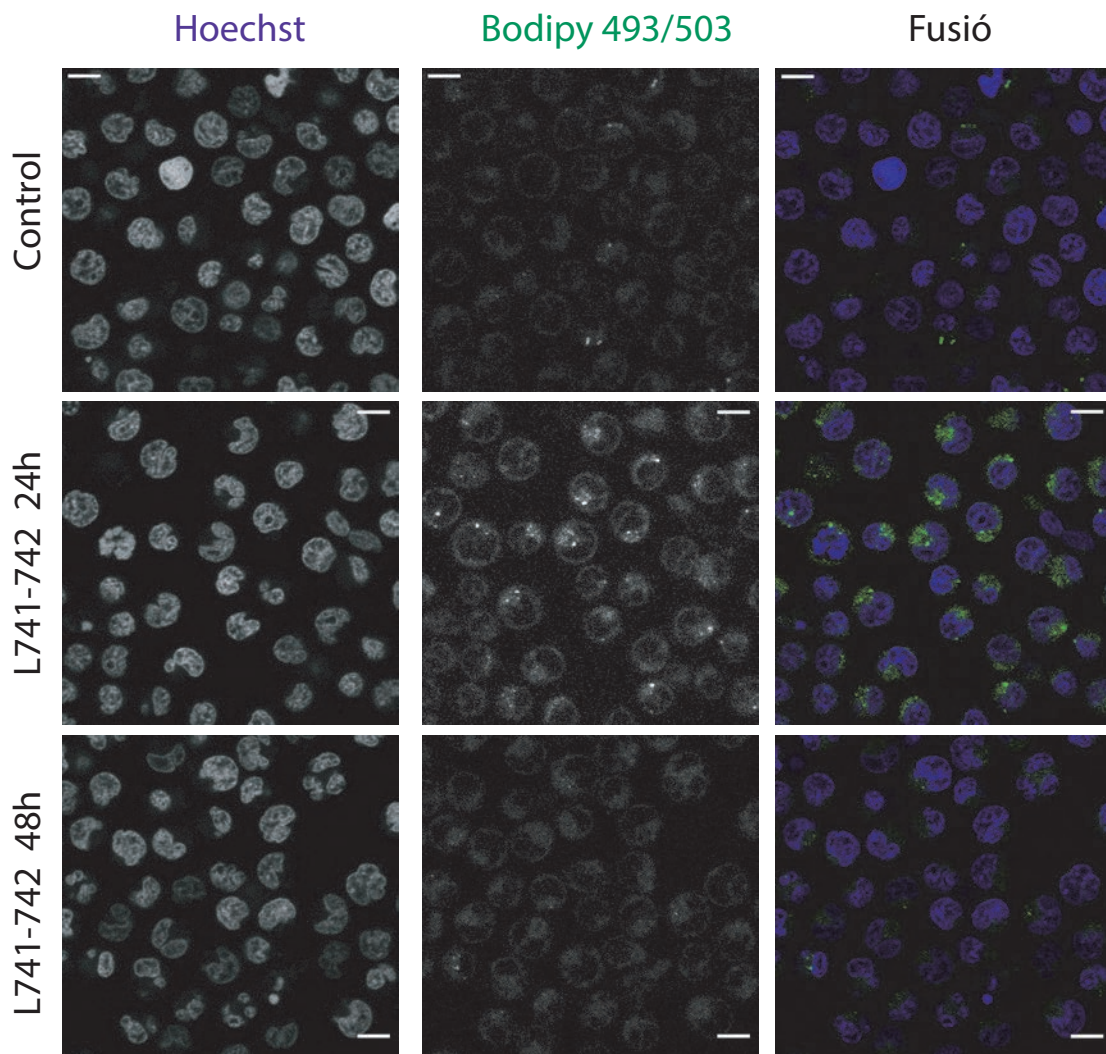
**Figura 43. L741-742 indueix un augment dels lípids neutres a nivell cel·lular.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 24h o 48h amb control de vehicle (C) o L741-742 a 1 - 2,5 - 5 - 10 - 25  $\mu$ M i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica Bodipy 493/503 a la població de cèl·lules vives. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats de tres experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

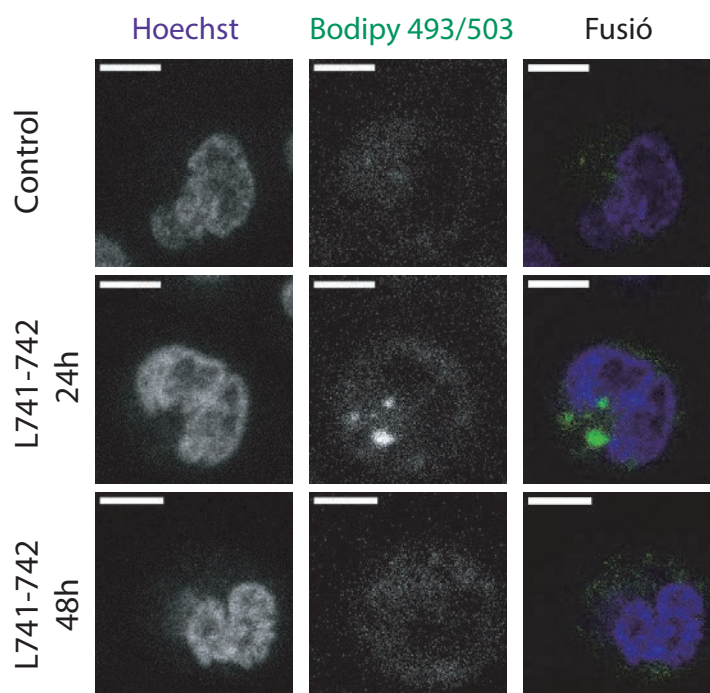
A priori, aquest augment dels lípids totals amb el tractament no encaixava amb la hipòtesi que s'havia formulat basada en el bloqueig de la síntesi de lípids. Una possible explicació d'aquests resultats, podria ser la regulació negativa dels gens implicats com a conseqüència d'una alta presència de lípids.

Aquest l'estudi a través de citometria de flux ens va permetre obtenir les primeres evidències de la implicació del metabolisme lipídic en el mecanisme d'acció dels antagonistes de DRD4. Però, la citometria de flux, només permet la quantificar i no permet la caracterització d'aquests efectes sobre els lípids. Per caracteritzar més



profundament aquest augment, es va estudiar a nivell de microscòpia. Els estudis per microscòpia en viu es van realitzar únicament amb la línia cel·lular Jurkat atesa la complexitat d'optimització dels protocols i la manca de temps per dur a terme els estudis. Com es recull a la Figura 44, el tractament amb L741-742 indueix un augment del contingut lipídic a 24h amb la formació de vesícules lipídiques que es mostren com a punts intensos compatibles amb *lipid droplets*. Contràriament a les cèl·lules tractades amb control de vehicle en les que la tinció lipídica és molt més difosa al llarg del citoplasma. L'augment del contingut lipídic amb el tractament de L741-742 es dona principalment a les 24h, ja que passades 48h les vesícules no són tant evidents i la tinció és més difusa semblant així al patró de les cèl·lules control.





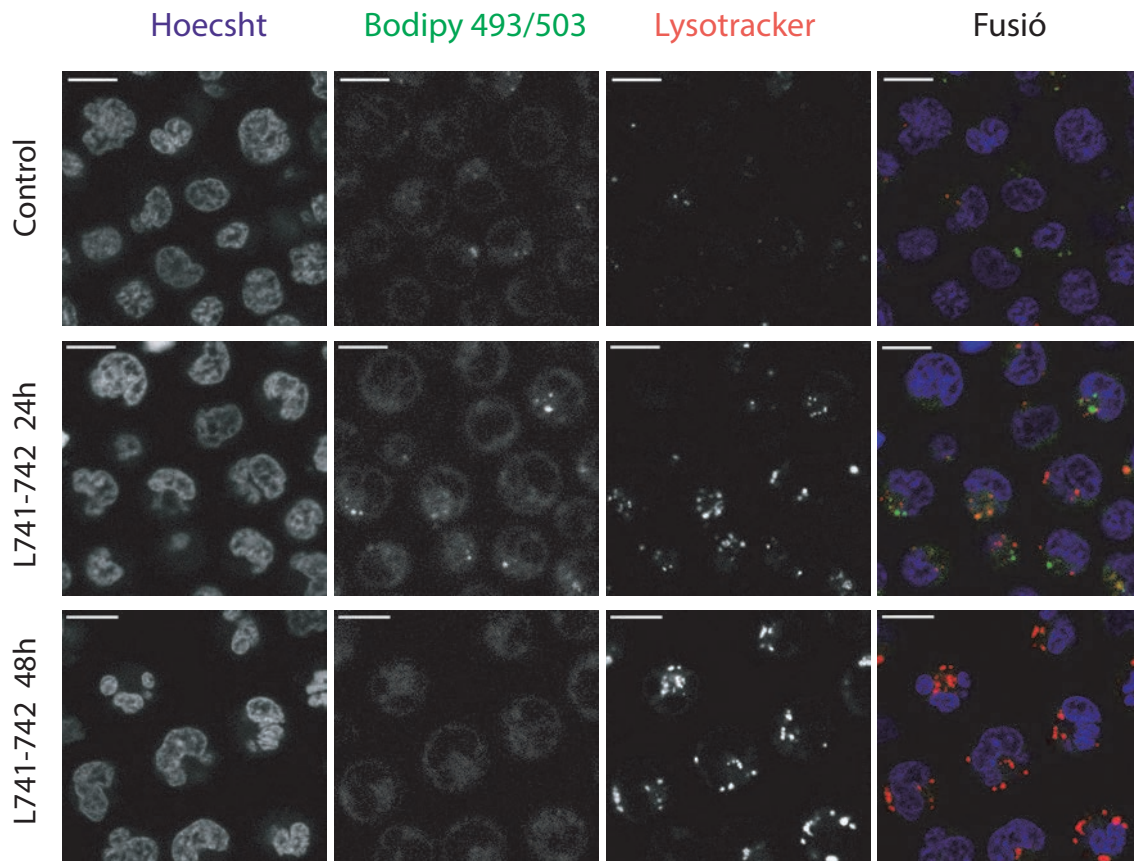
**Figura 44. L741-742 induïx un augment del contingut lipídic total de la cèl·lula.** Es van tractar cèl·lules Jurkat amb L741-742 a 10  $\mu$ M, es van tenyir amb Bodipy 493/503 i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres de les imatges del panell superior corresponen a 10  $\mu$ m i les del panell inferior a 5  $\mu$ m.

Així doncs, aquesta primera part d'estudis del contingut de lípid netures, semblava indicar que el tractament amb L741-742 induïa un augment del contingut lipídic amb una morfologia de punts vesícules discretes al llarg del citoplasma. A més la clara aparició a les 24h i desaparició a les 48h, suggeria la possible implicació d'altra maquinària cel·lular. En nombrosos estudis s'ha validat que la presència de grans quantitats de lípids tals com TAG, colesterol o fosfolípids poden induir lipotoxicitat i pot conduir la cèl·lula cap a la mort cel·lular programada (Magtanong, Ko, and Dixon 2016; Schaffer 2016). Com a mecanisme citoprotector de la lipotoxicitat, la cèl·lula emmagatzema aquests excés de lípids citoplasmàtics en forma de *lipid droplets*, com a reservori energètic que pot ser útil en episodis d'estrès cel·lular acompanyats de fluxos d'autofàgia elevats (Nguyen and Olzmann 2017).



En estudis previs d'aquest treball s'ha demostrat un augment clar del compartiment autofàgic i lisosomal i s'ha constatat també la co-localització d'autofagosomes i lisosomes a les 48h de tractament. També s'ha determinat l'aparició de vesícules lipídiques a les 24h i la seva desaparició a les 48h de tractament. Així doncs, es va voler estudiar si la inducció del compartiment de reciclatge cel·lular estava relacionada amb l'aparició i desaparició de vesícules lipídiques. Es va avaluar conjuntament el patró de lípids cel·lulars amb el compartiment lisosomal. Cèl·lules Jurkat es van tractar a 24h i 48h amb L741-742, es van tenyir conjuntament amb LysoTracker Deep Red i Bodipy 493/503 i es va avaluar per microscòpia de fluorescència en viu.

Tal com es recull a la Figura 45, el tractament amb L741-742 a les 24h indueix un augment en la formació de vesícules lipídiques i del compartiment lisosomal. Ambdues vesícules es troben en zones diferents del citoplasma. A les 48h de tractament, l'augment de la massa lisosomal és molt més evident, al mateix temps que ja no hi ha presència de les vesícules lipídiques. Amb aquests estudis, no es van obtenir resultats concloents, caldria optimització dels temps d'avaluació per poder determinar amb més exactitud si la desaparició de les vesícules lipídiques és per digestió lisosomal.



**Figura 45. El tractament amb L741-742 induïx un increment de la massa lisosomal així com de vesícules lipídiques.** Es van tractar cèl·lules Jurkat amb L741-742 a 10  $\mu$ M, es van tenyir amb Bodipy 493/503, Lysotracker Deep Red i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres de les imatges equivalen a 10  $\mu$ m.

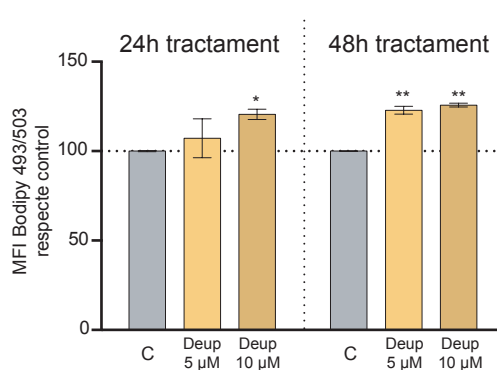
L'acumulació de lípids semblava ser una característica important de la desregulació del metabolisme induïda pel tractament amb L741-742. Es va voler determinar la importància d'aquest augment i, si l'afavoriment en facilitava la precipitació de la cèl·lula cap a la mort cel·lular. Es van seguir dues estratègies, bloquejar el catabolisme lipídic i bloquejar l'oxidació d'àcids grassos mitocondrial.

#### - **Bloqueig del catabolisme lipídic**

Per abordar la relació entre l'acumulació de lípids i la mort cel·lular, es va atacar primerament la via catabòlica del metabolisme lipídic. El bloqueig de la lipòlisi com via catabòlica del metabolisme lipídic s'ha descrit anteriorment que pot afavorir la

lipotoxicitat, i la inhibició farmacològica d'aquesta via amb el compost DEUP indueix l'acumulació de *lipid droplets* en el citoplasma (Rambold, Cohen, and Lippincott-schwartz 2016).

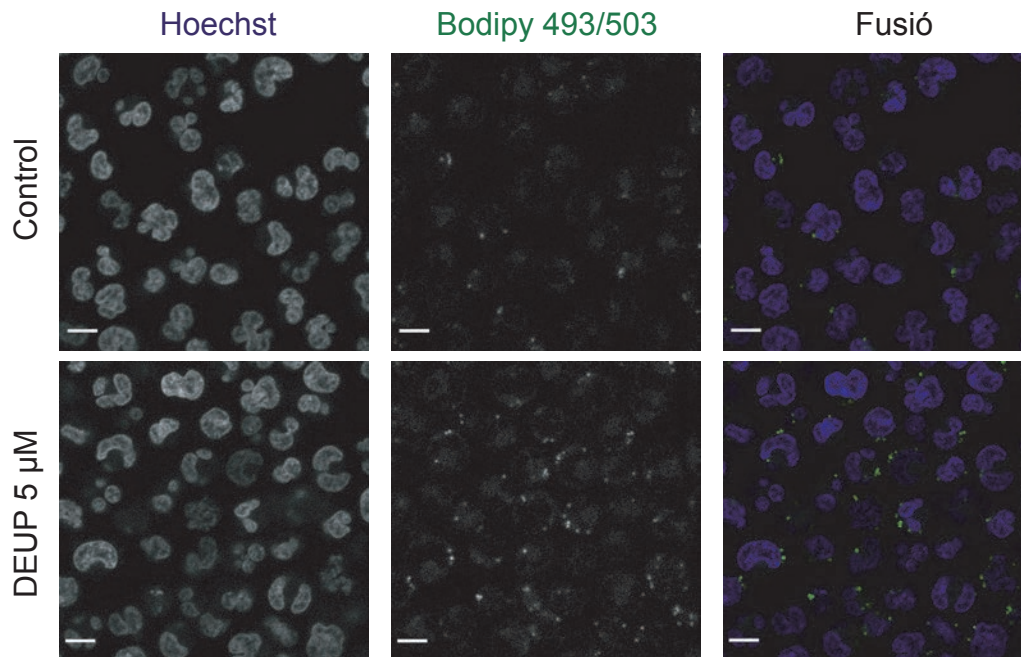
El primer estudi que es va realitzar va ser l'avaluació dels canvis en els lípids totals en resposta al tractament amb DEUP. Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 24h o 48h amb DEUP a 5 i 10  $\mu$ M. Passat el temps de tractament es van tenyir amb Bodipy 493/503 i es va analitzar per citometria de flux. Tal com es mostra en la Figura 46, el tractament amb DEUP augmentava el contingut lipídic total de les cèl·lules com era esperable atesa la seva funció biològica inhibidora de la lipòlisi.



**Figura 46. DEUP indueix un augment dels lípids neutres cel·lulars.** Cèl·lules Jurkat es van tractar 24h o 48h amb control de vehicle (C) o DEUP a 5 i 10  $\mu$ M i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica Bodipy 493/503 a la població de cèl·lules vives. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats de dos experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

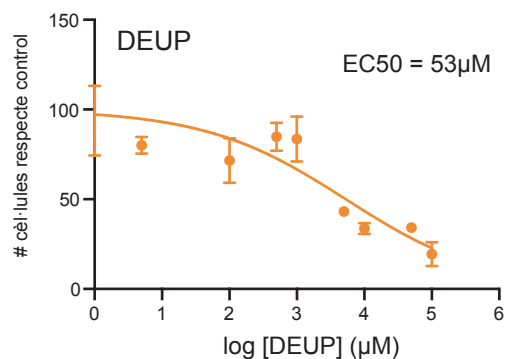
Aquest augment dels lípids neutres amb el tractament de DEUP aportava informació a nivell quantitatiu, però no es podia caracteritzar. Així doncs, es van analitzar els canvis per microscòpia de fluorescència. Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 24h amb DEUP a 5 i 10  $\mu$ M. Passat el temps de tractament es van tenyir amb Bodipy 493/503 i es van analitzar els canvis per microscopia de fluorescència en viu.

El tractament de DEUP, tal com s'observa en la Figura 47, indueix un augment dels lípids totals de la cèl·lula. S'observa la formació de punts discrets compatibles amb *lipid droplets* d'igual manera que passava amb el tractament de L741-742.



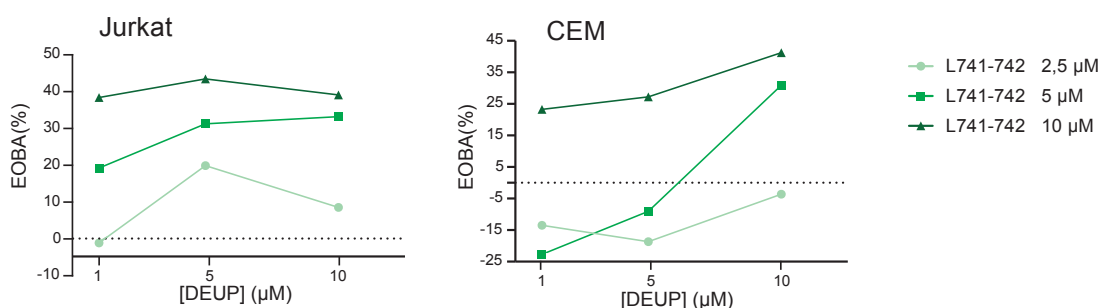
**Figura 47. DEUP indueix un augment del contingut lipídic total de la cèl·lula.** Es van tractar cèl·lules Jurkat durant 24h amb vehicle de control o DEUP a 5  $\mu\text{M}$ , es van tenyir amb Bodipy 493/503 i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres de les imatges corresponen a 10  $\mu\text{m}$ .

A nivell lipídic s'havia determinat que DEUP induïa una acumulació de lípids i la formació de vesícules. Una resposta al tractament molt semblant a la de L741-742. Partint de la premissa que els efectes sobre el metabolisme lipídic induïts per DEUP i L741-742 són semblants, es va voler estudiar la implicació amb la mort cel·lular. L'objectiu era determinar si una acumulació de lípids amb el tractament conjunt de DEUP i L741-742 induïa un efecte sinèrgic sobre la viabilitat cel·lular. El primer aspecte avaluat va la determinació de l'efecte citotòxic de DEUP en Jurkat. Com es mostra a la Figura 48, DEUP presenta un  $\text{EC}_{50}$  de 53  $\mu\text{M}$ .



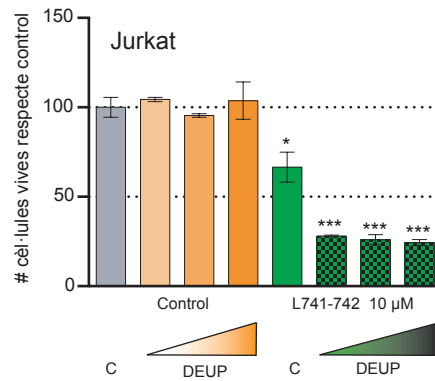
**Figura 48. DEUP presenta efectes citotòxics en Jurkat a més de 50  $\mu\text{M}$ .** Cèl·lules Jurkat es van tractar amb concentracions creixents de DEUP, i la viabilitat es va analitzar a les 72h per citometria de flux. La gràfica mostra la corba dosi-efecte. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM.

Considerant la EC50 de DEUP, cèl·lules CEM, Jurkat es van tractar amb L741-742 a 2,5 - 5 - 10  $\mu\text{M}$ , DEUP a 1 - 5 - 10  $\mu\text{M}$  i les combinacions d'ambdós tractaments durant 72h. Passat el temps de tractament es va avaluar la viabilitat cel·lular per citometria de flux i es van determinar els efectes sinèrgics dels dos compostos avaluats (Figura 49).



**Figura 49. L741-742 presenta efecte sinèrgic amb DEUP.** Cèl·lules CEM i Jurkat es van tractar 72h i es van avaluar els efectes citotòxics al combinar DEUP (1;5;10  $\mu\text{M}$ ) amb L741-742 (2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ). Es representen els EOBA representatius d'un experiment de dos realitzats.

Com es recull a la Figura 49, existeix un efecte sinèrgic entre DEUP i L741-742 sobre la viabilitat cel·lular. Aquesta sinèrgia concorda amb els efectes cel·lulars que ambdós compostos indueixen. Aquests estudis suggereixen que, aquesta acumulació d'estructures lipídiques en resposta a dos tractaments, poden estar induint una lipotoxicitat i un estrès cel·lular que precipita la cèl·lula cap a la mort cel·lular dependent d'autofàgia (Figura 50).



**Figura 50. DEUP i L741-742 presenten efecte sinèrgic sobre la viabilitat cel·lular.** Gràfic representatiu del sinèrgisme entre DEUP i L741-742 detallat a la (Figura 49). Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**- Bloqueig de l'oxidació d'àcids grassos mitocondrials:**

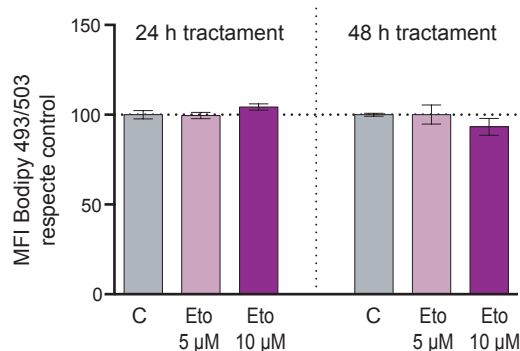
En el metabolisme lipídic, l'oxidació d'àcids grassos es dona principalment en el mitocondri. La inhibició farmacològica de l'oxidació mitocondrial, amb compostos com etomoxir s'ha correlacionat amb un augment dels àcids grassos a la cèl·lula en forma de *lipid droplet* que accelera la precipitació a la mort cel·lular programada (Cabodevilla et al. 2013; Y. Li, Zong, and Ding 2017).

Com a forma alternativa a l'augment dels lípids, es va inhibir l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos. L'objectiu de l'estudi de l'oxidació d'àcids grassos mitocondrials, era determinar si l'acumulació de lípids induïa com a conseqüència final la mort cel·lular, de forma semblant als estudis realitzats amb DEUP.

El primer estudi que es va realitzar va ser la determinació dels canvis en el contingut lipídic total amb la inhibició de la oxidació mitocondrial amb etomoxir. Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 24h i 48h amb etomoxir a 5 i 10 µM. Passat el temps de tractament es va tenyir amb Bodipy 493/503 i es van analitzar els canvis per citometria de flux.

Tal com s'observa en la Figura 51, el tractament amb etomoxir no incrementa el contingut lipídic de la cèl·lula. El que sembla indicar que malgrat un bloqueig en l'oxidació d'àcids grassos mitocondrial, els lípids totals de la cèl·lula no augmenten.





**Figura 51. El tractament amb etomoxir no incrementa el contingut lipídic total cel·lular.** Cèl·lules Jurkat es van tractar 24h o 48h amb control de vehicle (C) o ETO a 5 i 10 µM i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica Bodipy 493/503 a la població de cèl·lules vives. Les barres representen la mitjana ± SEM de triplicats de dos experiments independents.

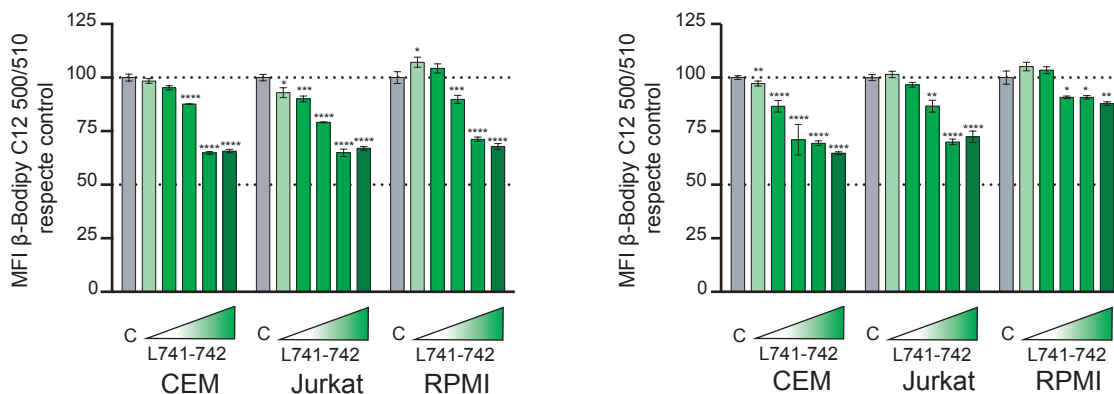
Amb la inhibició de l'oxidació lipídica mitocondrial, no es van detectar canvis en el contingut lipídic total. Aquests resultats semblaven indicar que la  $\beta$ -oxidació no era un procés significatiu en el nostre sistema, que compost etomoxir no funcionava en el nostre sistema o bé ambdues situacions. Amb la manca d'augment del contingut lipídic en resposta al tractament amb etomoxir, els estudis sinèrgics sobre la viabilitat cel·lular amb L741-742 no eren rellevants, atès que ambdós compostos no indueixen la mateixa resposta sobre el metabolisme lipídic en el nostre sistema.

#### 4.6.3. Estudi dels fosfolípids amb el tractament dels antagonistes de DRD4

Atès l'augment en els lípids cel·lulars en general i l'aparició d'estructures subcel·lulars lipídiques discretes en resposta al tractament, es va decidir estudiar els possibles canvis en el contingut de fosfolípids en resposta al tractament.

Així doncs, es va decidir estudiar el paper dels fosfolípids específicament. Es va utilitzar la tinció  $\beta$ -Bodipy C12 500/510 una sonda amb estructura de fosfolípid que porta acoblat un fluoròfor, que s'intercala en les membranes lipídiques permanent així fer un seguiment dels canvis morfològics o quantitius dels fosfolípids. La primera aproximació per l'estudi dels fosfolípids es va fer via citometria de flux. Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar amb L741-742 durant 24h o 48h. L'addició de la sonda es va realitzar en el mateix moment que el tractament amb L741-742 i la incubació va ser equivalent al temps de tractament de cada condició.

Passat el temps indicat, es va analitzar per citometria de flux i com s'observa en la Figura 52, L741-742 redueix el contingut total de fosfolípids a la cèl·lula. La reducció es equivalent en ambdós temps avaluats.



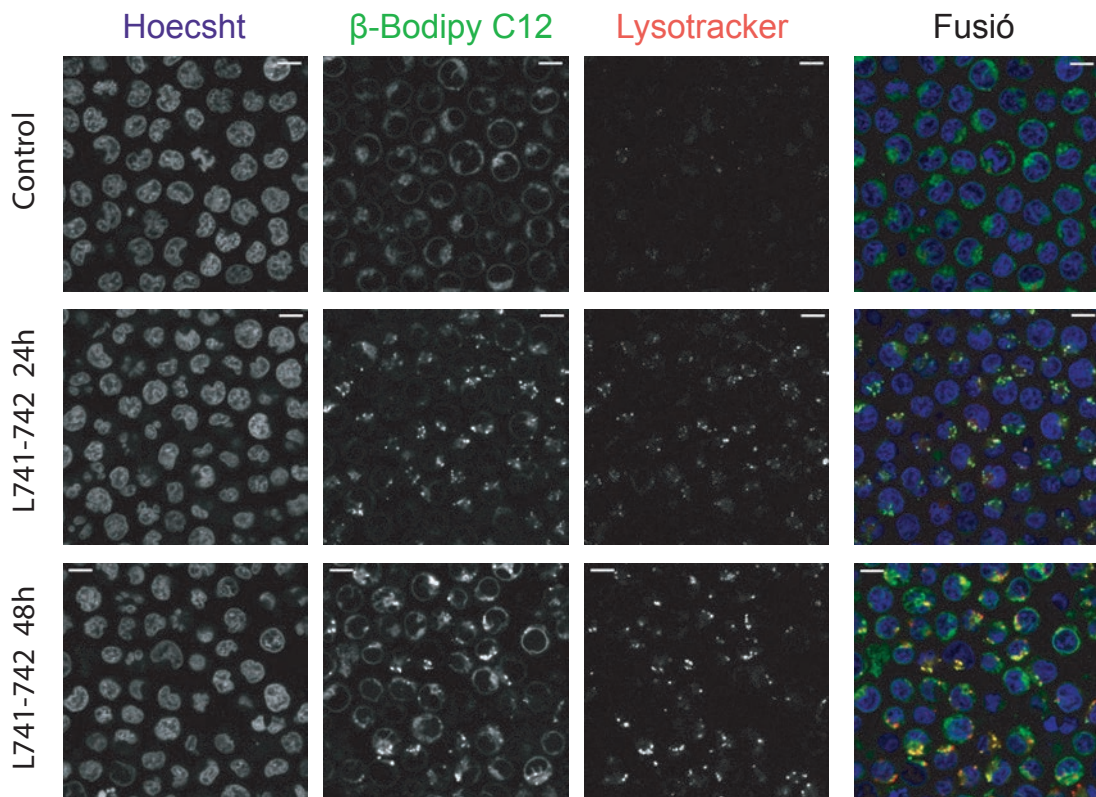
**Figura 52. L741-742 induïx una disminució dels fosfolípids cel·lulars.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 24h o 48h amb control de vehicle (C) o L741-742 a 1 - 2,5 - 5 - 10 - 25  $\mu$ M i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica  $\beta$ -Bodipy C12 500/510 C12 a la població de cèl·lules vives. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats de tres experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

La reducció quantitativa dels fosfolípids en resposta al tractament va ser un resultat inesperat. En apartats anteriors s'havia pogut determinar un augment dels lípids neutres en resposta al tractament, i la formació de vesícules lipídiques amb el requeriment fosfolipídic conseqüent. Així doncs, aquesta reducció via citometria de flux, no es podia explicar. Amb l'objectiu de poder entendre millor els resultats obtinguts via citometria de flux, es van aprofundir els estudis via microscòpia de fluorescència per a poder determinar morfològicament la localització dels fosfolípids i determinar si es produïa una remodelació i les seves característiques..

Per poder avaluar si en la reducció de fosfolípids hi tenia també implicació el compartiment de reciclatge, es van avaluar també els canvis en els lisosomes amb la tinció *Lysotracker Deep Red*. Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 24h o 48h amb L741-742, la sonda  $\beta$ -Bodipy C12 500/510 que es va afegir al mateix moment que

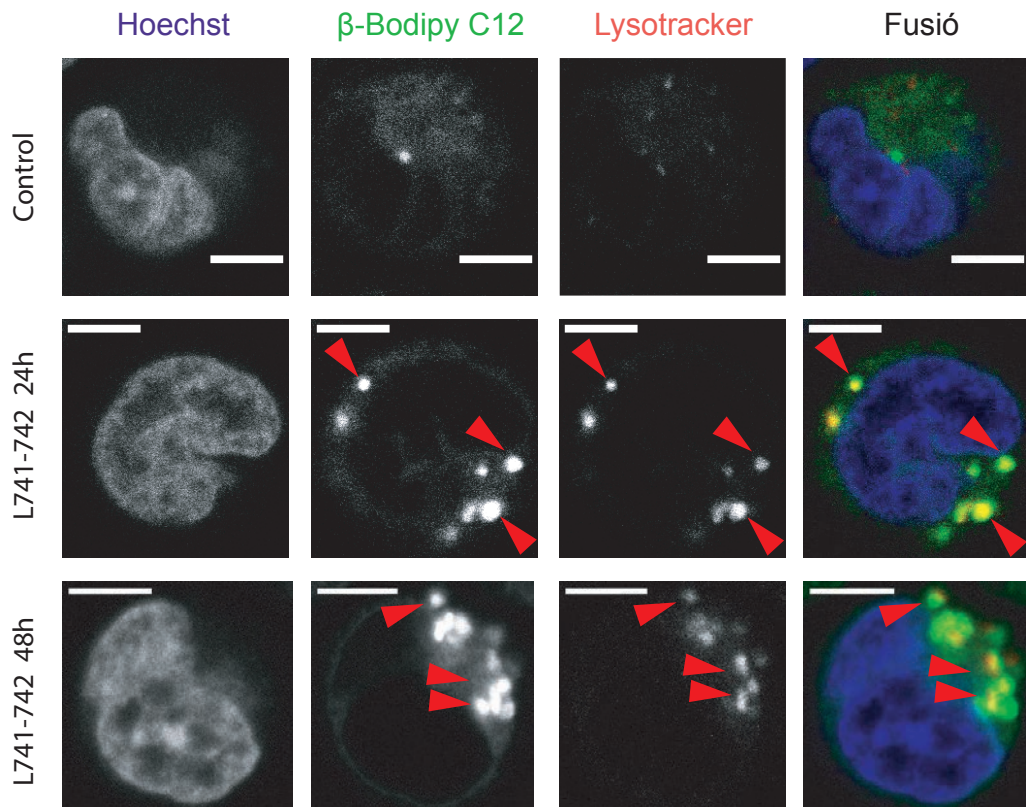


L741-742. Passat el temps de tractament es van tenyir amb *Lysotracker Deep Red* i es va analitzar per microscòpia de fluorescència.



**Figura 53. L741-742 induïx la formació de vesícules del fosfolípids cel·lulars.** Es van tractar cèl·lules Jurkat amb L741-742 a 10  $\mu\text{M}$ , es van tenyir amb  $\beta$ -Bodipy C12 500/510 C12, Lysotracker Deep Red i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Blau, hoechst33342; Blanc/Verd, bodipy  $\beta$ -Bodipy C12 500/510; Blanc/Vermell, lysotracker deep red. Les barres de les imatges equivalen a 10  $\mu\text{m}$ .

Com es mostra en la Figura 53, el tractament amb L741-742 induïx la formació de vesícules fosfolipídiques tant a 24h com a 48h. Les vesícules generades a més tenen un patró de morfologia i disposició cel·lular molt semblant al dels lisosomes. La possible co-localització entre les vesícules fosfolipídiques i els lisosomes es va estudiar amb més profunditat. Tal com es mostra en la Figura 54, existeix una clara co-localització de les acumulacions de fosfolípids en forma de vesícules en els lisosomes.



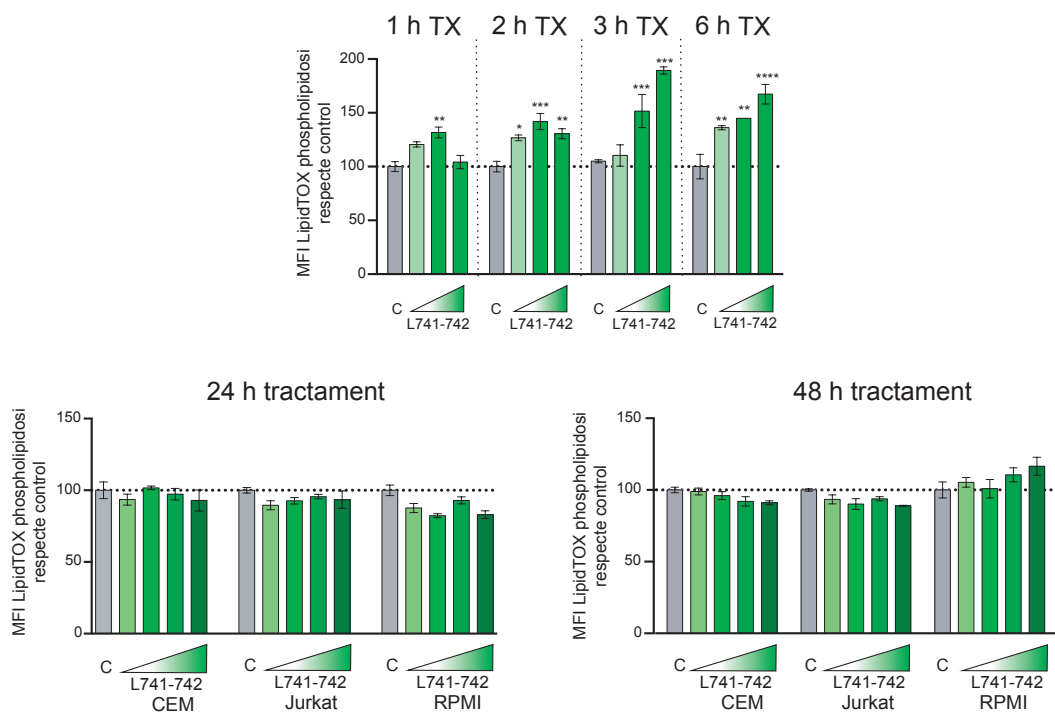
**Figura 54. L741-742 induïx la generació de vesícules de fosfolípids que co-localitzen amb els lisosomes.** Imatges anàlogues a les de la Figura 53. Les fletxes vermelles mostren vesícules colocalitzants. Les barres d'escala corresponen a 5 µm.

#### 4.6.4. Estudi de la fosfolipidosi amb el tractament dels antagonistes de DRD4

La formació de vesícules de fosfolípids i la co-localització d'aquestes amb els lisosomes va suscitar la possible implicació de la fosfolipidosi en el conjunt de desregulacions del metabolisme lipídic. La fosfolipidosi també explicaria l'augment dels lípids neutres en forma de *lipid droplets* ja que com s'ha explicat anteriorment, provoca una desregulació del metabolisme lipídic en general induint la síntesi de lípids neutres i colesterol (Lowe et al. 2012; Sawada, Takami, and Asahi 2005)

Una de les característiques que defineixen la fosfolipidosi és l'acumulació aberrant de fosfolípids en els lisosomes formant cossos lamel·lars. Considerant aquesta característica bàsica del procés, els resultats obtinguts fins al moment semblaven encaixar amb la definició de fosfolipidosi. Per validar la implicació de la fosfolipidosi en el nostre sistema es va utilitzar la tinció *HCS LipidTOX Green Phospholipidosis*, es tracta d'una sonda que detecta específicament la fosfolipidosi.

Els primers estudis sobre la fosfolipidosi es van dur a terme via citometria de flux. Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 1h, 2h, 3h, 6h, 24h i 48h amb L741-742 posteriorment es van tindre amb *HCS LipidTOX Green Phospholipidosis* i es van avaluar els canvis via citometria de flux. En l'estudi de la fosfolipidosi, es va realitzar experiments amb cinètiques molt curtes atès que la inducció de la fosfolipidosi en resposta al tractament, s'ha descrit que és un esdeveniment molt primerenc (Kodavanti and Mehendale 1990; Xia et al. 2000). Tal com s'observa en la Figura 55, l'inducció de la fosfolipidosi es dona a les primeres 6h de tractament, sent les 3h el punt de màxima inducció. A les 24h i 48h ja no hi ha inducció del procés. Aquests resultats representen la primera evidència de que la inducció de la fosfolipidosi és dels primers esdeveniments que es donen amb el tractament de L741-742.

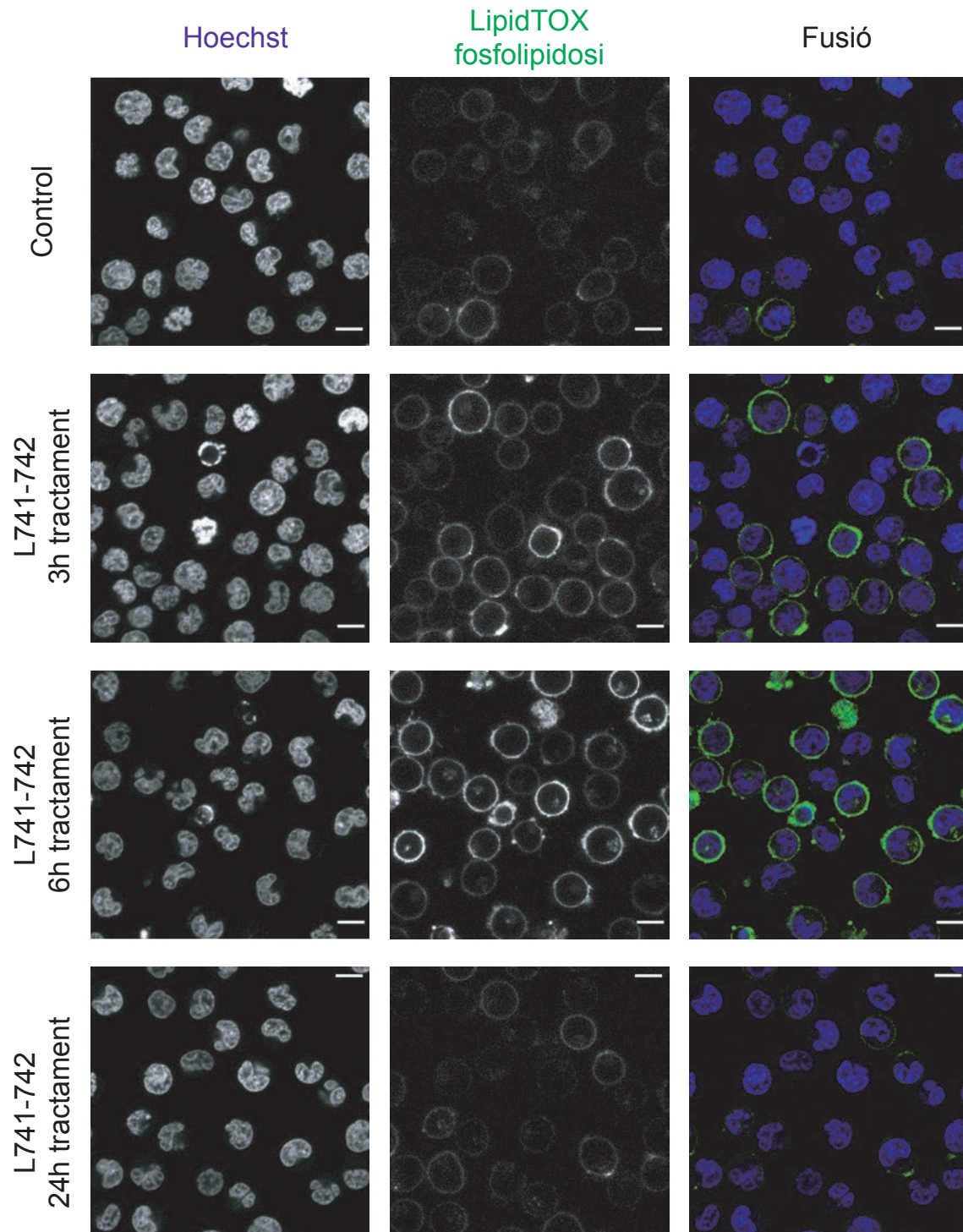


**Figura 55. L741-742 indueix la fosfolipidosi a les primeres 6h de tractament..**

Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar 1h, 2h, 3h, 6h, 24h o 48h amb control de vehicle (C) o L741-742 a 2,5 – 5 – 10 - 25 μM i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica *HCS LipidTOX green phospholipidosis* a la població de cèl·lules vives. Les barres representen la mitjana ± SEM de triplicats de tres experiments independents. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



Un cop s'havia determinat que hi havia inducció de la fosfolipidosi, es va voler caracteritzar via microscòpia de fluorescència. Cèl·lules Jurkat es van tractar amb L741-742 a 3h, 6h i 24h, es van tenyir amb *HCS LipidTOX Green Phospholipidosis* i es va avaluar via microscòpia de fluorescència (Figura 56).

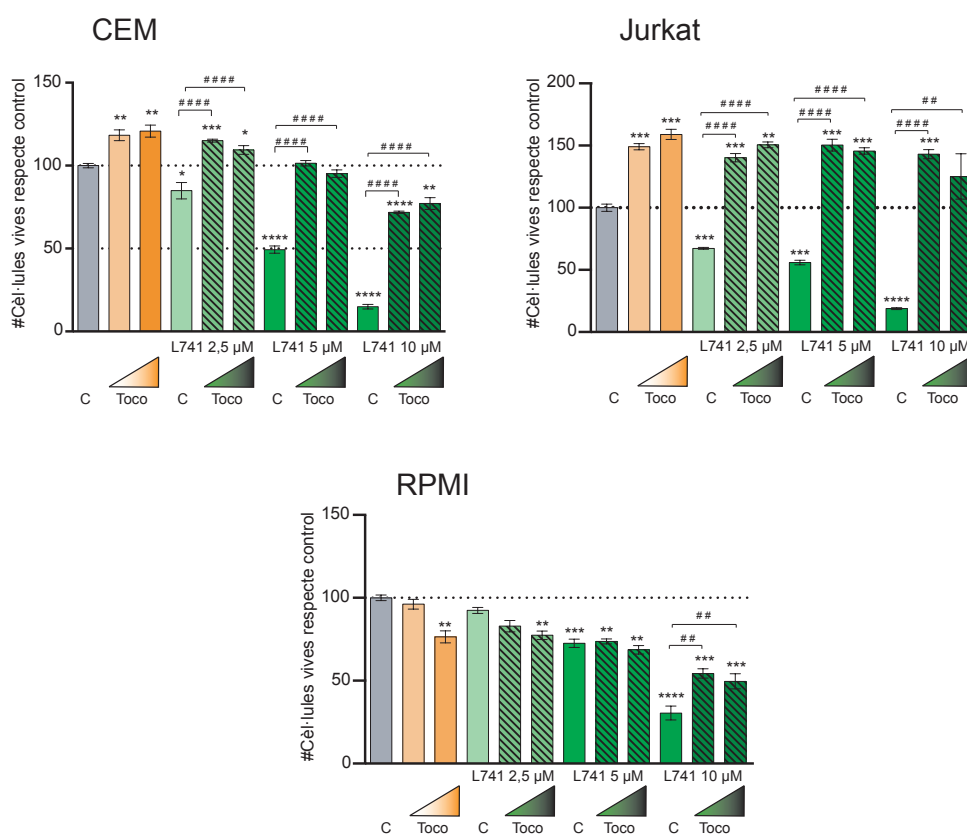


**Figura 56. L741-742 indueix la fosfolipidosi via microscòpia de fluorescència.**

Cèl·lules Jurkat amb L741-742 a 10  $\mu\text{M}$ , es van tenyir amb *HCS LipidTOX green phospholipidosis* i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició. Les barres de les imatges equivalen a 10  $\mu\text{m}$ .

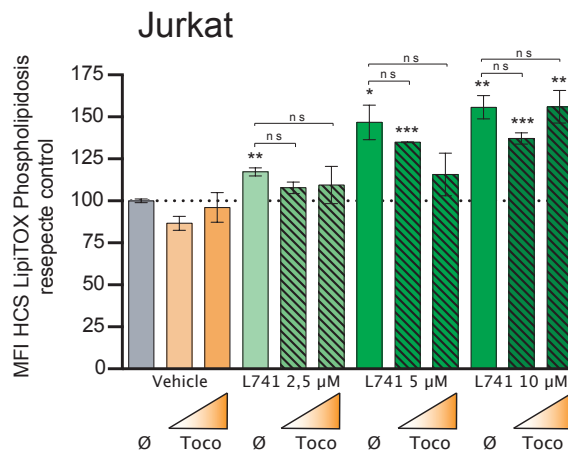
Les imatges per microscòpia de fluorescència van permetre certificar la inducció de la fosfolipidosi a temps curts de tractament, 3h i 6h, i l'absència a temps més llargs com 24h.

Una de les característiques que defineix la fosfolipidosi es la reversibilitat dels efectes en absència de l'agent inductor. Apart de la discontinuació del tractament, també s'ha descrit que agents amb característiques físiques antioxidants són capaços de revertir la fosfolipidosi. Un exemple clar d'agent antioxidant és l' $\alpha$ -tocoferol que ha demostrat la seva capacitat inhibidora sobre la fosfolipidosi *in vitro* i *in vivo* (Ágoston et al. 2003; Scuntaro et al. 1996). Cèl·lules Jurkat, CEM i RPMI es van tractar amb L741-742 a 2,5 / 5 / 10  $\mu\text{M}$  amb presència o absència de l' $\alpha$ -tocoferol a 500 i 1000  $\mu\text{M}$  durant 72h. La viabilitat cel·lular es va determinar per citometria de flux. Com es recull a la Figura 57, la presència de  $\alpha$ -tocoferol reverteix en gran mesura l'efecte citotòxic de L741-742 sobre les línies cel·lulars de LLA-T. Aquesta reversió de la viabilitat cel·lular sembla suggerir que la inducció de la fosfolipidosi és un procés clau induït en resposta al tractament que provoca una desregulació lipídica general i acaba precipitant la cèl·lula a la mort cel·lular.



**Figura 57.  $\alpha$ -tocoferol reverteix l'efecte citotòxic de L741-742.** Cèl·lules CEM, Jurkat i RPMI es van tractar durant 72h amb L741-742 a 2,5 – 5 - 10  $\mu$ M, en absència o presència de  $\alpha$ -tocoferol (toco) a 500 i 1000 $\mu$ M. La viabilitat de les cèl·lules va ser analitzada per citometria de flux. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de tres realitzats en cada línia cel·lular. \* o #p<0,05; \*\* o ##p<0,01; \*\*\* o ###p<0,001; \*\*\*\* o #### p<0,0001(t-test).

Conjuntament amb la reversió de la mort cel·lular induïda per L741-742, es va estudiar el paper de l' $\alpha$ -tocoferol en referència a la inducció de la fosfolipidosi. Cèl·lules CEM i Jurkat es van tractar durant 3h amb L741-742 en presència o absència de l' $\alpha$ -tocoferol i posteriorment es va tenir amb *HCS LipidTOX Green Phospholipidosis* i es van avaluar els canvis per citometria de flux. Com es recull en la Figura 58, l' $\alpha$ -tocoferol no es capaç de revertir la inducció de la fosfolipidosi, malgrat es detecti una tendència cap a la reversió. Caldrà realitzar més experiments amb temps de tractaments optimitzats per determinar si es possible aquesta reversió de la inducció de la fosfolipidosi. Possiblement, la no-reversió de la tinció per la fosfolipidosi sigui deguda a una menor sensibilitat tècnica en comparació als experiments de citotoxicitat.



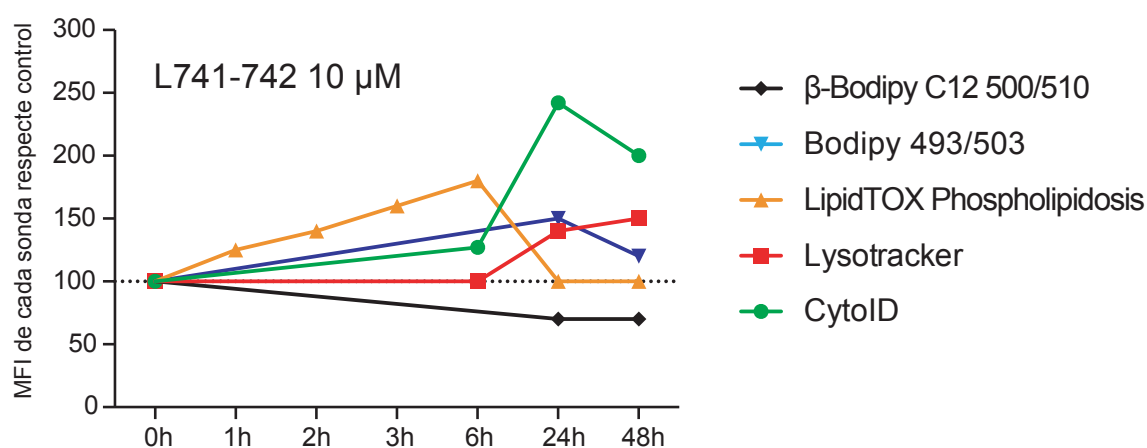
**Figura 58.  $\alpha$ -tocoferol no reverteix la inducció de la fosfolipidosi.** . Cèl·lules Jurkat es van tractar durant 3h amb L741-742 a 2,5 / 5 / 10  $\mu$ M, en absència o presència de  $\alpha$ -tocoferol (toco) a 500 i 1000 $\mu$ M. La inducció de la fosfolipidosi es va determinar per citometria de flux amb la tinció HCS LipidTOX Green Phospholipidosis. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment representatiu de dos realitzats en cada línia cel·lular. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001.

#### 4.7. Cinètica dels efectes de L741-742 sobre els diferents compartiments cel·lulars.

Ha quedat constatada en apartats anteriors la inducció de l'autofàgia i l'augment del compartiment lisosomal amb el tractament dels antagonistes de DRD4. També s'ha provat que L741-742 indueix un augment del contingut lipídic total cel·lular, una reducció dels fosfolípids totals amb una acumulació dels mateixos als lisosomes i una inducció de la fosfolipidosi. Per tal de poder determinar el mecanisme d'acció, resulta fonamental comprendre quin és l'esdeveniment determinant en la mort induïda per L741-742 i per extrapolació els antagonistes de DRD4.

A partir de les dades obtingudes als darrers apartats, es va realitzar una cinètica dels efectes sobre els diferents compartiments cel·lulars en la línia cel·lular de LLA-T Jurkat.

Com es mostra a la Figura 59, el primer esdeveniment observable és la inducció de la fosfolipidosi, que s'observa ja la primera hora de tractament, augmenta fins a les 6h i posteriorment es perd la inducció. Posteriorment a la inducció de la fosfolipidosi, quan aquesta ja no és tant evident, a les 24h, es produeixen efectes sobre el contingut lipídic i el compartiment de reciclatge. A les 24h els fosfolípids comencen a disminuir i aquesta reducció es manté fins a les 48h. Al mateix temps, els lípids neutres augmenten també fins a les 48h de tractament. En resposta a aquesta desregulació del metabolisme lipídic i com a conseqüència també de la fosfolipidosi, el compartiment de reciclatge cel·lular incrementa la seva activitat. La inducció de l'autofàgia es dona ja a les 6h i va en augment a mesura que passa el temps assolint el seu màxim a les 24h. El compartiment lisosomal, en consonància, pateix un augment detectable a les 24h que segueix la dinàmica fins a les 48h.



**Figura 59. Cinètica d'esdeveniments observats després del tractament amb L741-742.** Es van tractar cèl·lules Jurkat amb L741-742 a 10 µM i es van analitzar en diferents punts experimentals el compartiment autofàgic (intensitat de CYTO-ID respecte el control, verd), el compartiment lisosomal (intensitat de LysoTracker respecte control, vermell), el contingut lipídic total (intensitat de Bodipy 493/503 respecte control, blau), el contingut fosfolipídic cel·lular (intensitat de β-Bodipy C12 500/510 respecte control, negre) i la inducció de la fosfolipidosi (intensitat de HCS LipidTOX Phospholipidosis Green respecte control, taronja). Cada punt representa la mitjana de triplicats de dos experiments independents, i no es mostren barres d'error perquè impediria la correcta visualització de la cinètica. L'eix de les X no es troba a escala amb els temps indicats.



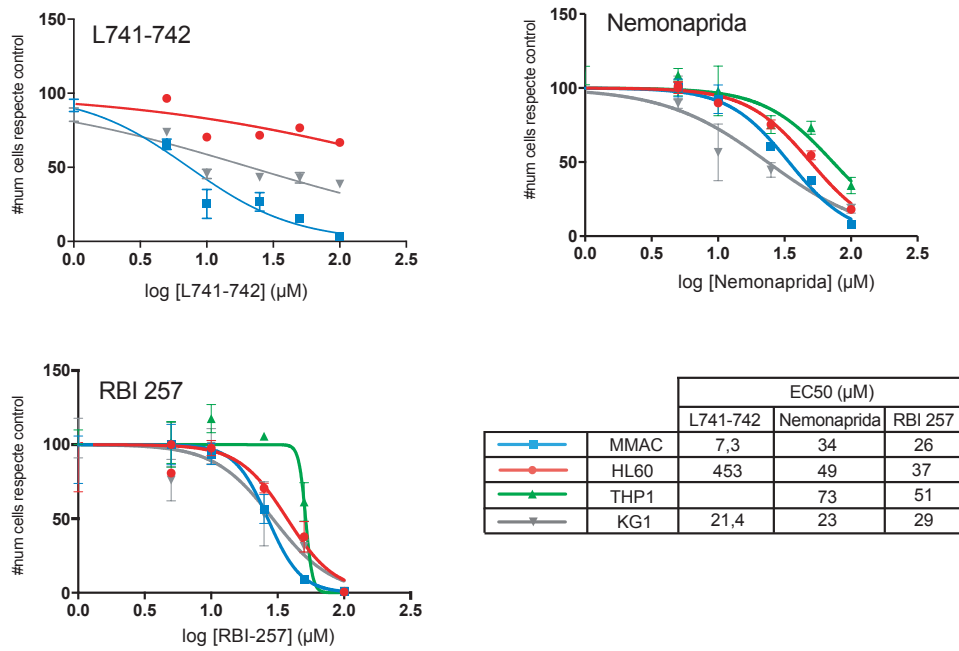
#### **4.8. Estudi preclínic dels antagonistes de DRD4 en LMA**

En apartats anteriors s'ha estudiat el perfil antileucèmic selectiu dels antagonistes de DRD4 en LLA-T. També s'ha avaluat la desregulació del metabolisme lipídic i la implicació del compartiment de reciclatge cel·lular com a responsables del mecanisme d'acció dels antagonistes de DRD4.

Paral·lelament als estudis en LLA-T, es va voler certificar si l'efecte antileucèmic dels antagonistes de DRD4 era específic de la LLA-T o bé podria utilitzar-se en totes les neoplàsies hematològiques, atès que el metabolisme lipídic sembla estar afectat en molts tipus de càncer (Long et al. 2018; F. Zhang and Du 2012). Al grup de recerca es disposava de línies cel·lulars de LMA i es va decidir estudiar el potencial antileucèmic dels antagonistes de DRD4 en aquest model. A més a més, anteriorment ja s'havia determinat la citotoxicitat d'aquests compostos de forma preliminar quan es va descartar DRD4 com a diana molecular dels antagonistes estudiats en el projecte.

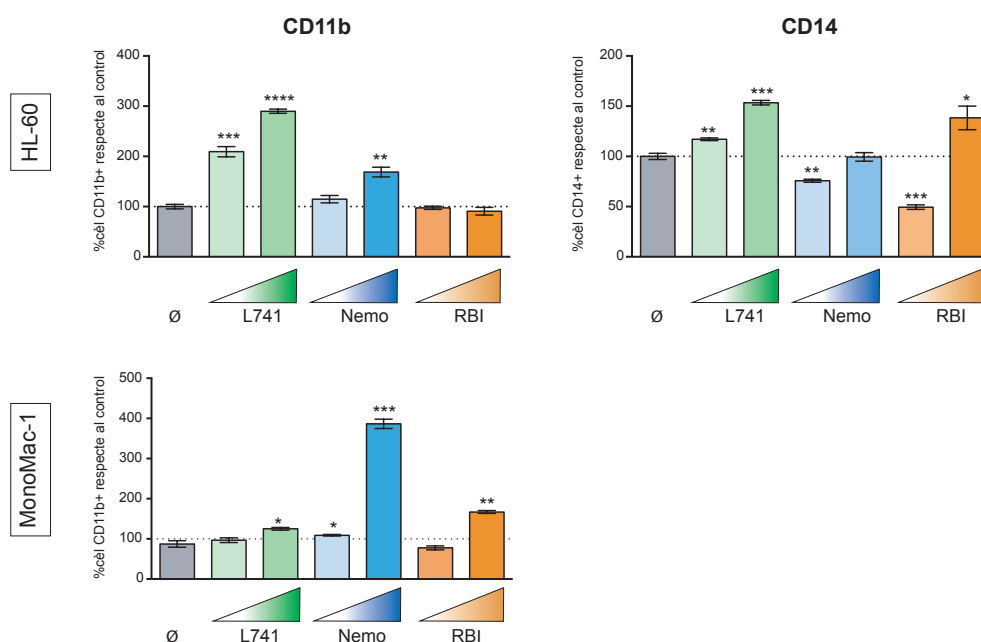
##### **4.8.1. Estudi de la citotoxicitat en línies cel·lulars de LMA**

El primer estudi que es va realitzar va ser la caracterització de l'efecte antileucèmic dels antagonistes de DRD4 en línies cel·lulars de LMA. Per fer-ho, es van emprar 4 línies cel·lulars de LMA de característiques diverses: HL-60, una línia amb maduració (FAB-M2), KG-1, una línia poc diferenciada (FAB M1) i MonoMac-1 i THP-1, dues línies de leucèmia monocítica (FAB M5) que expressen el gen de fusió MLL-AF9. Cèl·lules de les 4 línies cel·lulars es van tractar 72h per determinar el rang d'acció mitjançant la realització de corbes de citotoxicitat dosi-resposta i determinar així la EC<sub>50</sub> dels compostos. Com es recull a la Figura 60, els antagonistes de DRD4 presenten efecte antileucèmic en les línies cel·lulars de LMA. La línia més sensible és MonoMac-1 seguida de KG1. Els efectes presentats tenen un rang molt ampli, oscil·len entre 7 -73 µM. En general, malgrat presentar efecte citotòxic, aquest es dona en un rang micromolar més alt que el LLA-T. El rang d'acció però, es troba dins del ventall de seguretat de les cèl·lules sanes, és a dir, hi ha un efecte diferencial.



**Figura 60. Els antagonistes de DRD4 tenen efecte antileucèmic en LMA.** Cèl·lules MonoMac-1, HL-60, KG-1 i THP-1 es van tractar amb concentracions creixents de L741-742, nemonaprida i RBI-257, i la viabilitat es va analitzar a les 72h. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un antagonista, i les EC<sub>50</sub> es troben recollides a la taula inferior. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat ± SEM.

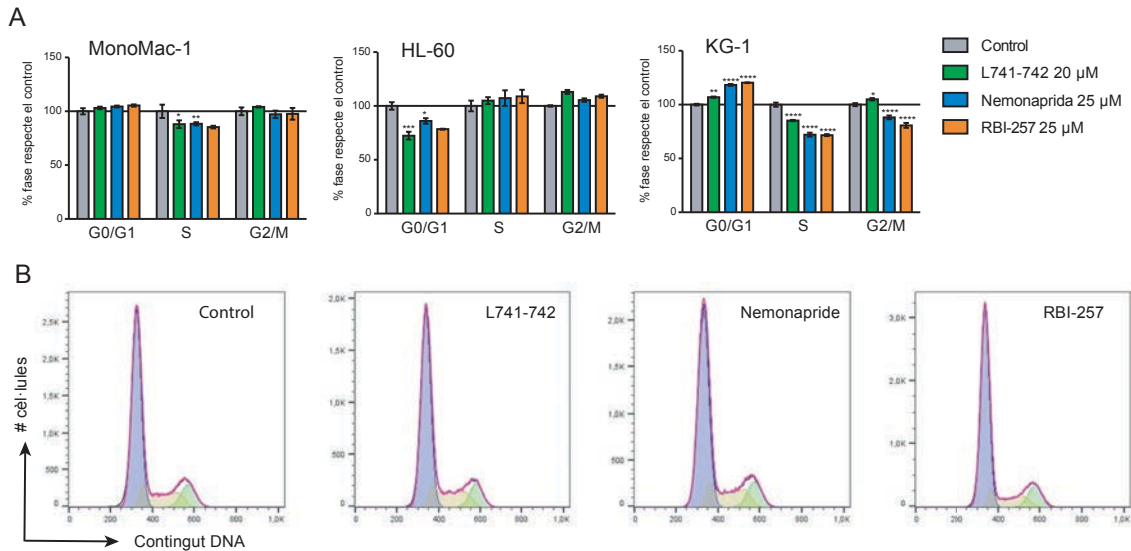
Atès que una de les característiques fonamentals de les cèl·lules de LMA és el bloqueig de la diferenciació i que la inducció de la diferenciació terminal mieloide ha estat proposada com a estratègia per a l'erradicació de cèl·lules leucèmiques, es van analitzar els efectes dels antagonistes de DRD4 sobre l'expressió de marcadors de diferenciació mieloide (CD11b i CD14) per citometria de flux de 72h de tractament i a concentracions on no es produís un excés de mort cel·lular. L741-742, nemonaprida i RBI-257 en general van mostrar una inducció dels dos marcadors mieloides en les dues línies cel·lulars avaluades i en general de manera dosi dependent (Figura 61).



**Figura 61. Els antagonistes de DRD4 indueixen la diferenciació de línies cel·lulars de LMA.** Cèl·lules HL-60 i MonoMac-1 es van tractar 72h amb L741-742 (L741 a 5 i 10  $\mu$ M), nemonaprida (Nemo a 10 i 25  $\mu$ M) i RBI-257 (RBI a 10 i 25  $\mu$ M) i l'expressió en superfície dels marcadors de diferenciació mieloide CD11b, CD14 es van analitzar per citometria de flux. Les barres mostren la mitjana d'un triplicat  $\pm$  SEM del percentatge de cèl·lules positives per a cada marcador respecte al control tractat amb vehicle. Experiment representatiu de dos realitzats. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

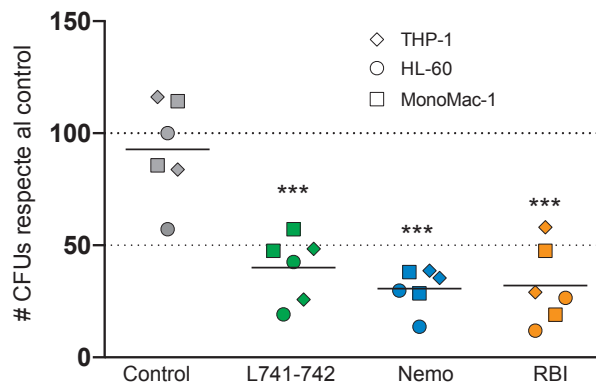
En estreta relació amb la diferenciació, es va estudiar en línies cel·lulars de LMA l'efecte dels antagonistes de DRD4 sobre el cicle cel·lular per citometria de flux a les 24h de tractament. En aquest experiment no es va fer servir la línia cel·lular THP-1 per una manca de disponibilitat.

Com s'observa en la Figura 62, els antagonistes de DRD4 no indueixen canvis representatius en el cicle cel·lular.



**Figura 62. Els antagonistes de DRD4 indueixen canvis en el cicle cel·lular en LMA.** Es van tractar MonoMac-1, HL-60, KG-1 i THP-1 amb L741-742 a 20 μM, nemonaprida i RBI-257 a 25 μM i es va analitzar per citometria de flux. **A.** Les barres representen el percentatge de cèl·lules en cada fase respecte al control ± SEM de triplicats d'un experiment realitzat. **B.** Imatges representatives de citometria de cèl·lules MonoMac-1 control i tractades amb L741-742, nemonaprida i RBI-257. Fases del cicle determinades per Dean-Jett-Fox. Blau, G0/1; Groc, S; verd, G2/M \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

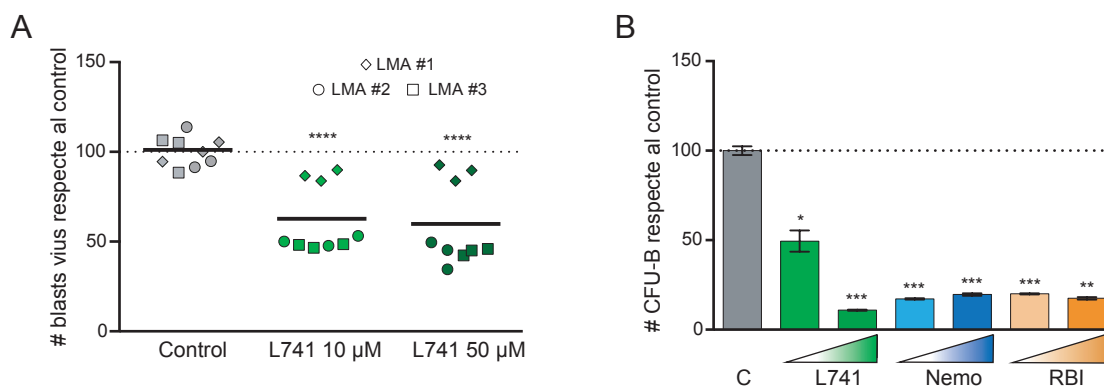
Per analitzar si els antagonistes de DRD4 afectaven la capacitat d'autorenovació i diferenciació a llarg termini, es van realitzar estudis de clonogeneïtat a 10 dies amb línies cel·lulars de LMA. Com s'observa a la Figura 63, els tres antagonistes van produir una disminució dràstica de la capacitat de formació de colònies.



**Figura 63. Els antagonistes de DRD4 redueixen la capacitat clonogènica de línies cel·lulars de LMA.** Cèl·lules MonoMac-1, HL-60 i THP-1 es van tractar 18h amb L741-742 a 10  $\mu$ M, nemonaprida a 25  $\mu$ M (Nemo) i RBI-257 a 25  $\mu$ M (RBI) i es van cultivar amb metilcel·lulosa 10 dies. Passat aquest temps es van comptar les CFUs en base a morfologia i cel·lularitat. Cada símbol representa una línia cel·lular, i es mostren duplicats. \*\*\* $p < 0,001$  en t-test aparellats.

#### 4.8.2. Estudi preclínic en mostres primàries de LMA

Havent validat i caracteritzat l'efecte dels antagonistes de DRD4 en línies cel·lulars, es va prosseguir amb els estudis preclínic analitzant el seu efecte sobre les cèl·lules leucèmiques de pacients de LMA. El tractament amb L741-742 presenta efectes citotòxics de forma dosi dependent. També queda patent, amb els estudis de formació de CFUs, que els antagonistes de DRD4 són capaços d'eliminar la població més primitiva amb capacitat d'autorenovació (Figura 64).



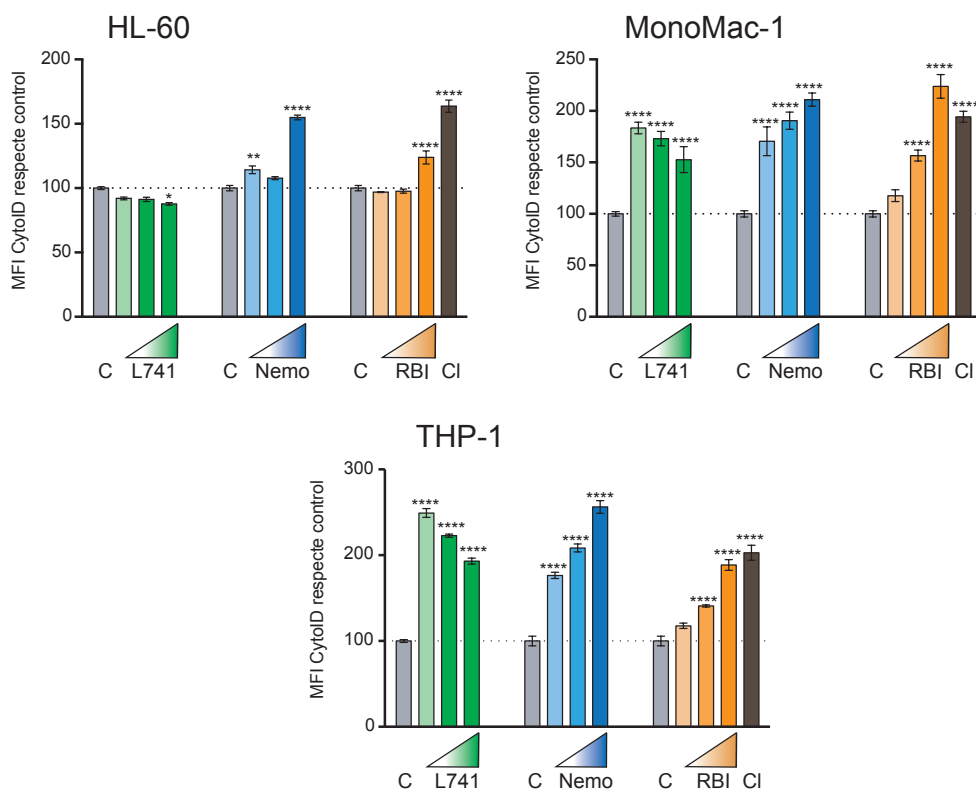
**Figura 64. Els antagonistes de DRD4 mostren efectes antileucèmics ex vivo en LMA.** **A.** Es van tractar 3 mostres de LMA amb control de vehicle (Control) o L741-742 (L741) a 10 i 50  $\mu$ M i la viabilitat dels blasts es va analitzar al cap de 3 dies. Cada símbol representa una mostra i cada punt una mesura experimental (triplicats). **B.** Es va analitzar la capacitat clonogènica de una mostra de LMA després de 18h de tractament L741-742 (5 i 10  $\mu$ M), nemonapride i RBI-257 (10 i 25  $\mu$ M) i posterior cultiu de 15 dies en medi semisòlid. Passat aquest temps es van comptar les colònies en base a la morfologia i cel·lularitat. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de duplicats. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.8.3. Estudi del mecanisme d'acció dels antagonistes de DRD4 en LMA

Un cop efectuats els estudis preclínic amb els antagonistes de DRD4, es va voler estudiar el mecanisme d'acció antileucèmica en aquest model de neoplàsia

hematològica. En aquest apartat, els estudis no s'han pogut profunditzar molt per una limitació temporal.

Respecte el mecanisme d'acció, el primer que es va avaluar va ser el compartiment de reciclatge. Es van estudiar els canvis del compartiment autofàgic amb la sonda CYTO-ID per citometria de flux. Cèl·lules MonoMac-1, HL-60 i THP-1 es van tractar durant 24h amb L741-742, nemonapride, RBI-257 i se'n va avaluar els canvis com s'ha explicat en apartats anteriors. D'igual manera que passava en LLA-T, els antagonistes de DRD4 també indueixen una activació considerable del compartiment autofàgic en LMA (Figura 65).

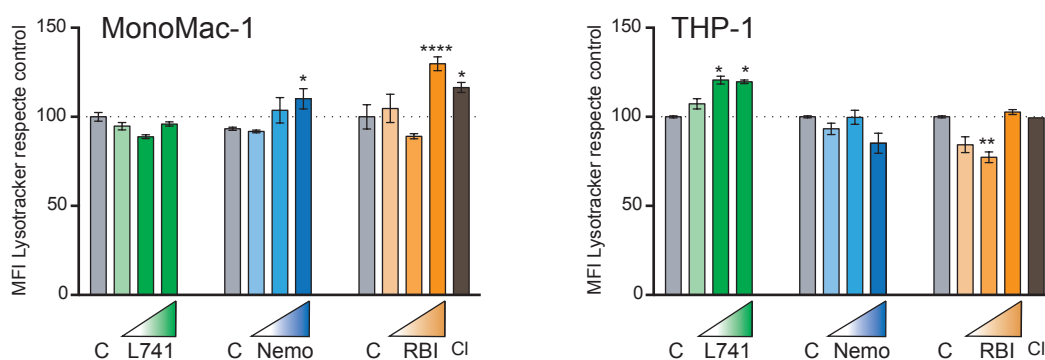


**Figura 65. Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment del compartiment autofàgic en LMA.** Cèl·lules MonoMac-1, HL-60 i THP-1 es van tractar 24h amb control de vehicle (C), L741-742 a 5,10 i 25  $\mu$ M, nemonaprida i RBI-257 a 10, 25 i 50  $\mu$ M i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica CYTO-ID a la població de cèl·lules vives com a mesura del compartiment autofàgic. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment realitzat. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

En aquest primer experiment es demostra que els antagonistes de DRD4 indueixen una acumulació del compartiment autofàgic també en LMA. La línia cel·lular que presenta menys efectes sobre l'activació de l'autofàgia és HL-60, la mateixa, que presentava els rangs d'acció dels antagonistes més elevats.

Com en els estudis en LLA-T , aquesta acumulació de vesícules autofàgiques, va portar a l'estudi del compartiment lisosomal que es va realitzar amb la sonda *Lysotracker Deep Red*. Cèl·lules MonoMac-1 i THP-1 es van tractar durant 24h amb L741-742, nemonaprida, RBI-257 i se'n van avaluar els canvis per citometria de flux com s'ha explicat en apartats anteriors. Només es van realitzar els estudis en dues línies cel·lulars per manca de temps.

Com s'observa en la Figura 66, el tractament amb els antagonistes de DRD4 indueix un augment lleu del compartiment lisosomal. El exemple més clar sembla ser el tractament amb L741-742 en la línia cel·lular THP-1. Els resultats obtinguts en aquests estudis no són concloents atès que en la resta d'antagonistes no presenten un augment del compartiment lisosomal. Caldrà optimitzar el temps de tractament i dur a terme més experiments per concloure l'afectació d'aquest compartiment.



**Figura 66. Els antagonistes de DRD4 indueixen un augment lleu del compartiment lisosomal en LMA.** Cèl·lules MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 24h amb control de vehicle (C), L741-742 a 5,10 i 25  $\mu$ M, nemonaprida i RBI-257 a 10, 25 i 50  $\mu$ M i es va analitzar la intensitat de fluorescència mitjana (MFI) de la tinció específica LysoTracker Deep Red a la població de cèl·lules vives com a mesura del compartiment lisosomal. Les barres representen la mitjana  $\pm$  SEM de triplicats d'un experiment realitzat. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\*\* $p$ <0,0001.

Les dades obtingudes en estudis els realitzats en LMA amb els antagonistes de DRD4, suggereixen que aquests compostos tenen un efecte diferencial en LMA que es troba dins del rang de seguretat per les cèl·lules sanes i, a més a més, el procés d'inducció de mort és similar al induït en LLA-T.





## **5. Discussió**



Al llarg de la present tesi s'ha realitzat l'estudi preclínic dels antagonistes de receptors de dopamina en leucèmia, utilitzant la LLA-T com a model bàsic i s'ha demostrat que tenen un efecte antileucèmic selectiu amb interès terapèutic. Aquests efectes antileucèmics es va descartar que tinguessin relació amb el receptor de dopamina. En canvi, s'han pogut relacionar amb una disrupció de l'homeòstasi lipídica, iniciada per la inducció de la fosfolipidosi, com a primer esdeveniment, i la desregulació conseqüent dels diversos tipus de lípids. Existeixen molts precedents en la literatura en múltiples tipus de tumor diferents sobre l'afectació del metabolisme lipídic i la precipitació a la mort cel·lular regulada (Beloribi-djefa, Vasseur, and Guillaumond 2016; Galluzzi et al. 2013; Omabe, Ezeani, and Omabe 2015; Röhrig and Schulze 2016; Santos and Schulze 2012; Yi et al. 2018). Malgrat la literatura sigui tant extensa, els precedents en LLA-T són molt més escassos.

En la present tesi doctoral s'han observat els efectes antileucèmics selectius de L741-742, nemonaprida i RBI-257 en línies cel·lulars de LLA-T al rang micromolar baix. L'activitat antileucèmica a més, s'ha mostrat sinèrgica amb vincristina, un quimioterapèutic utilitzat tradicionalment a l'esquema de tractament bàsic d'aquesta malaltia. Els efectes citotòxics s'han observat igualment en una mostra PDX de LLA-T en el mateix rang d'acció observat en línies cel·lulars de LLA-T, i s'ha constatat l'efecte selectiu, en no observar-se efectes citotòxics significatius en cèl·lules sanes. En els estudis *in vivo*, a nivell de nombre total de cèl·lules leucèmiques del PDX LLA-T, s'ha observat una reducció amb el tractament amb L741-742, contràriament als estudis amb mostres primàries sanes, on no s'observen canvis en la hematopoesi sana. En estudiar els mecanismes antileucèmics, s'ha descartat la relació amb el receptor de dopamina tipus 4, i s'ha relacionat l'efecte antileucèmic amb la inducció de la fosfolipidosi i la desregulació conseqüent de l'homeòstasi lipídica. Quant a la fosfolipidosi, s'ha observat una inducció del procés i s'ha constatat l'acció sobre el compartiment lisosomal. La desregulació dels fosfolípids porta associada alteracions en els patrons de lípids totals que es manifesta amb un augment dels *lipid droplets*. Aquests efectes van acompanyats d'un augment del compartiment autofàgic, que precipita la cèl·lula a la mort cel·lular dependent d'autofàgia, sense la participació significativa de la maquinària apoptòtica. Aquest treball suposa doncs la base per la optimització del tractament

amb els compostos esmentats i el seu futur en clínica, al mateix temps demostra la implicació dels lípids en els processos leucèmics i obre un nou camp terapèutic amb el potencial ús en totes les leucèmies.

### **Perfil preclínic dels antagonistes de DRD4 en leucèmia**

La leucèmia limfoblàstica aguda T és, malgrat els avenços, una malaltia de mal pronòstic en adults. Fins fa relativament poc, el coneixement sobre les bases genètiques de la malaltia eren limitats. Amb les millores en les tècniques citogenètiques i les tècniques basades en l'expressió gènica, s'ha pogut caracteritzar l'enorme complexitat genètica de la LLA-T. Els estudis sobre l'expressió gènica han redefinit la caracterització molecular dels grups de LLA-T i, més important, han permès la identificació de noves entitats com les ETP (Coustan-Smith et al. 2009), integrats en la darrera revisió de la OMS (Terwilliger 2017). Aquest coneixement, no s'ha traduït en canvis rellevants als tractaments, que han patit poques modificacions i es segueixen basant principalment en quimioteràpia intensiva (Terwilliger 2017). En aquest sentit, cal també recalcar que el tractament de la LLA-T i LLA-B és similar malgrat l'origen de llinatge és diferent i tenir un comportament biològic divers. Per capgirar les dramàtiques estadístiques actuals calen tractaments innovadors que, en combinació amb els actuals, permetin rescatar pacients quimiorrefractaris i evitar les recaigudes.

En aquest context, la recerca preclínica ha focalitzat els esforços en la millor comprensió dels mecanismes biològics de la LLA-T, amb l'ànim d'identificar rutes de senyalització o lesions genètiques susceptibles de convertir-se en dianes terapèutiques (Belver and Ferrando 2016). Molts d'aquests treballs han culminat amb la identificació de moduladors específics de vies de senyalització importants en la biologia de LLA-T com PI3K/AKT/mTOR (Roti and Stegmaier 2014). Malgrat els avenços però, calen validacions a nivell d'assajos clínics per conèixer la viabilitat d'aquests compostos. El paper de NOTCH1 també ha estat àmpliament estudiat amb la identificació de teràpies dirigides (Paganin and Ferrando 2011). Per últim, també és important recalcar els avenços en el camp dels CAR-T com a possible teràpia en LLA (Hucks and Rheingold 2019; Pehlivan, Duncan, and Lee 2018). Més enllà de les teràpies dirigides i les teràpies basades en el reconeixement molecular de proteïnes

d'interès, però, s'ha començat a explorar l'atac d'elements més estructurals com són els fosfolípids, la dinàmica dels quals es troba alterada en càncer (Alves et al. 2016).

A nivell metabòlic, al llarg dels anys els glúcids han rebut molta més atenció i conseqüentment, han estat àmpliament estudiats en càncer (Fadaka et al. 2017; Hay 2016). Contràriament als lípids, els quals la seva recerca en el context tumoral és molt més limitada. Part d'aquestes diferències resideix en el fet que el descobriment del metabolisme lipídic el context tumoral és més recent que el metabolisme de glúcids (Medes, Thomas, and Weinhouse 1953; Warburg, Wind, and Negelein 1927). La recerca dels lípids en el context tumoral malgrat ha estat explorada, durant anys s'ha considerat que no podria ser traslladable a la clínica, davant la concepció que seria impossible un efecte antitumoral selectiu, al constituir rutes imprescindibles per la supervivència de les cèl·lules sanes. En altres paraules, per poder traslladar la recerca en el metabolisme lipídic a la clínica, cal la identificació de una finestra terapèutica, que permeti assegurar un efecte tumoral selectiu. Un exemple en aquest sentit, és la recerca sobre les alteracions fosfolipídiques en càncer. No s'havia intentat traslladar a la clínica considerant les premisses anteriors (Escribá 2017), però la caracterització d'alteracions específiques en les membranes de les cèl·lules tumorals i les primeres descripcions d'interaccions amb molècules petites, ha permès al camp agafar l'embranchada necessària (Peetla and Labhasetwar 2009).

Abans d'entrar en consideracions sobre els mecanismes, cal discutir l'efectivitat mateixa dels fàrmacs estudiats. Com hem detallat anteriorment, el receptor de dopamina ha estat vinculat amb els processos tumorals i les cèl·lules mare del càncer (Sachlos et al. 2012). A la literatura, hi ha molts precedents d'antagonistes de receptors de dopamina que han demostrat un potencial antitumoral (Roney and Park 2018; X. Wang et al. 2019; Weissenrieder et al. 2019). En el present treball, es van testar moduladors de tots els subtipus de receptor de dopamina i únicament els antagonistes de DRD4 presentaven efecte antileucèmic. És important recordar, que no tots els antagonistes de DRD4 testats presentaven efecte antileucèmic, sonepirazole és també antagonista específic de DRD4 i no indueix citotoxicitat. Dels antagonistes de DRD4 que presentaven efecte antileucèmic, L741-742 contava amb precedents bibliogràfics en els que s'havia demostrat el seu potencial en

glioblastoma (Dolma et al. 2016). Malgrat observen un rol determinant de DRD4 en aquest tumor, el tractament amb L741-742 també podria ser DRD4 independent.

En aquest context, en el present treball s'ha constatat l'expressió dels receptors de dopamina en LMA, SMD i LMMC. Conjuntament amb l'expressió en LMA també s'ha validat el potencial citotòxic dels antagonistes de DRD4. Els resultats no permeten descartar la implicació de DRD4 en el procés de transformació leucèmica, la realització de *knock downs* permetrà determinar la funció d'aquest receptor en la patogènesi de la LMA. Però, tenint en compte els estudis realitzats en LLA-T, seria esperable que els antagonistes de DRD4 avaluats en el present treball, induïssin un efecte antileucèmic a través del mateix mecanisme independent de DRD4 en LMA, SMD, LMMC i probablement en glioblastoma.

Apropant l'experimentació amb línies cel·lulars a elements més realistes dels tractaments, s'han demostrat efectes sinèrgics amb vincristina i que els efectes citotòxics són revertits en presència d'estroma. Actualment, les pautes de tractament de la LLA-T, es troben estipulades en diferents fases, i en cadascuna es realitza tractament combinat de diferents compostos. Amb les teràpies combinades es pretén atacar a diferents nivells de la malaltia. És a dir atacar les cèl·lules per diferents rutes de senyalització per minimitzar el risc de fracàs i eradicar amb eficàcia la malaltia. El tractament combinat permet potencialment disminuir les dosis de la quimioteràpia i augmentar-ne conseqüentment la seguretat. Així doncs, resulta de gran interès que els nostres fàrmacs presentin un efecte citotòxic sinèrgic amb vincristina. Per analitzar el sinergisme es va utilitzar el model sobre l'additivisme de Bliss, EOBA (Berenbaum 1981), i s'ha constatat que els tres antagonistes de DRD4 mostren tendència al sinergisme, sent L741-742 el compost amb millors resultats.

En contraposició als efectes sinèrgics amb vincristina, la reversió dels efectes citotòxics en presència d'estroma, és un aspecte del perfil preclínic que caldria millorar amb futurs refinaments de nous compostos amb les característiques preclíniques optimitzades. La resistència a tractaments mitjançada pel microambient medul·lar és un fenomen comú a molts tractaments antileucèmics,

que en rebaixa l'eficàcia i s'ha estudiat, entre d'altres, mitjançant el co-cultiu amb estroma (Meads, Hazlehurst, and Dalton 2008; Veiga et al. 2006). Efectivament, el fet de que es reverteixi l'efecte citotòxic en presència d'estroma posa de manifest que no estem inhibint la senyalització de la supervivència que proporciona l'estroma a les cèl·lules leucèmiques. Però, al mateix temps, també ens obre un camp de possibilitats per combinar els antagonistes de DRD4 amb molècules que estiguin dirigides específicament al estroma.

Tots aquests efectes es mantenen als experiments duts a terme amb la mostra PDX LLA-T, en què s'observa una citotoxicitat en els mateix rang que en les línies cel·lulars de LLA-T al mateix temps que es troba dins del rang de seguretat on no es produeixen efectes significatius en cèl·lules sanes. Mimetitzar els efectes citotòxics en la mostra PDX resulta de gran interès, atès que avui en dia es consideren un dels models més fidels en oncologia per la identificació de nous compostos (Williams 2018). En el futur, també seria interessant realitzar experiments de sinergisme amb vincristina així com avaluar els efectes en presència d'estroma amb aquest model de mostra pseudoprimària. Les dificultats en el cultiu cel·lular de la mostra PDX LLA-T, són el motiu principal de que no s'hagi pogut analitzar amb profunditat les característiques preclíniques d'aquest model. La baixa incidència de la malaltia ens ha dificultat també l'obtenció de mostres primàries. De fet, es va disposar d'una altre mostra PDX però que no es va poder amplificar en ratolins.

Els experiments amb ratolins NSG mieloblacionats ens aporten una evidència de gran rellevància: L741-742 redueix el nombre total de cèl·lules leucèmiques del PDX LLA-T però permet la regeneració de l'hematopoesi normal. Aquests experiments, permeten afirmar per una banda l'efecte de L741-742 sobre les cèl·lules mare leucèmiques del PDX, al reduir en nombre les cèl·lules leucèmiques totals en el ratolí amb el tractament. Per altra banda ens permeten afirmar que els efectes de L741-742 són selectius envers les cèl·lules leucèmiques de LLA-T, preservant l'hematopoesi sana i permetent la potencial administració de dosis en què la leucèmia es vegi afectada sense efectes secundaris. D'entre els antagonistes de DRD4 testats, L741-742 és el que millor perfil presentava, d'aquí que la majoria dels esforços s'hagin invertit en la seva millor caracterització. Per la teràpia de la LLA-T,



els antagonistes de DRD4, especialment L741-742 com a millor candidat, es podria dir que són dels primers tractaments específics per les cèl·lules mare leucèmiques de LLA-T sense afectació de les cèl·lules mare hematopoètiques.

Com a darrer anàlisi de l'efectivitat dels antagonistes de DRD4, els estudis *in vivo* per injecció intraperitoneal amb els compostos amb línies cel·lulars han mostrat efectes molt lleus. Els antagonistes de DRD4 presenten una estructura altament hidrofòbica. Aquesta hidrofobicitat, a més, contribueix el seu alt volum de distribució, que suposa una distribució preferent als teixits (Chan et al. 2018; Rodgers and Rowland 2006), amb baixíssimes concentracions en plasma. L'alta hidrofobicitat dels compostos ha afegit un repte addicional, ja que ens ha obligat a la injecció intraperitoneal d'estoc en DMSO diluït en salí, que no tenim el coneixement de si assoleix les concentracions rellevants a teixit. Així doncs, considerant aquesta incertesa, pot ser que la injecció intraperitoneal dels fàrmacs diluïts no assoleixi una bona distribució al no estar dissolts en un solvent fisiològic, es produeixen efectes adversos relatius al vehicle. Els antagonistes de DRD4, conjuntament amb els problemes derivats de la seva estructura, probablement presentin també un ràpid metabolisme, que implica la degradació a compostos més polars, i per tant, menys efectius segons el nostre model. En aquest context, cal seguir amb el desenvolupament de nous compostos, la modificació per química mèdica o optar per estratègies de vehiculització de fàrmacs (*drug delivery*). En aquesta última estratègia es podria aprofitar per dirigir els compostos a les cèl·lules leucèmiques, és a dir, generar el tropisme adequat per a l'afectació selectiva.

### **Mecanismes d'acció responsable de l'efecte terapèutic dels antagonistes de DRD4**

Quant als mecanismes i contràriament al que es va postular inicialment, s'ha descartat qualsevol efecte a través del receptor de dopamina tipus 4: actuen de manera independent a DRD4. Aquesta independència s'ha fonamentat en aquest treball en dues vies d'evidència principals i) els antagonistes de DRD4 són igualment efectius en cèl·lules amb expressió indetectable DRD4 en superfície (LLA-T) i en cèl·lules amb alts nivells de DRD4 (LMA). Resulta inversemblant que els antagonistes de DRD4 puguin induir la mort cel·lular a través de DRD4 en cèl·lules

que no l'expressen. ii) altes concentracions de dopamina són incapaces de revertir els efectes antileucèmics dels antagonistes de DRD4, contràriament al que seria esperable si aquests actuessin mitjançant la seva unió i/o senyalització a través de DRD4.

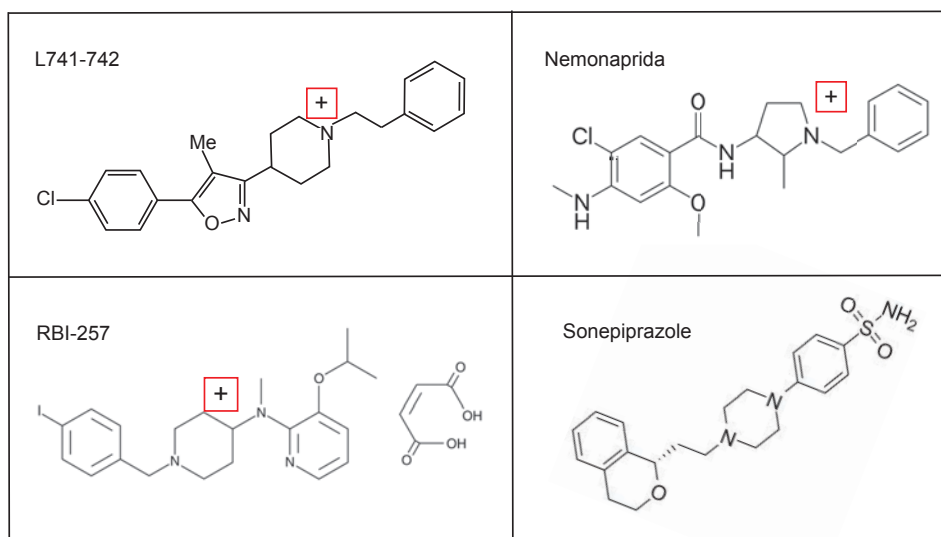
La necessitat de conèixer la diana terapèutica s'explica per la potencial optimització del tractament. Conèixer la via metabòlica afectada permet la identificació de reguladors *upstream* i *downstream* de la diana i per tant optimitzar els resultats al afectar per més punts la via metabòlica responsable de l'efecte antitumoral. En la predicció de dianes, existeixen múltiples estratègies entre les quals destaquen els models *in silico*, els *screenings* funcionals o bé els *arrays* d'expressió. Amb la col·laboració científica amb *Mind The Byte*, es va realitzar un cerca *in silico* de la diana i seguint línies de raonament similar a les seguides per descartar el paper de DRD4, s'han descartat com a diana els receptors de glutamat, el receptor opioide  $\mu$ , receptor no opioide  $\sigma$  i l'acetilcolinesterasa, malgrat totes elles hagin estat descrites per la seva importància en models de tumor sòlid (Lazarevic-Pasti et al. 2017; Maurice and Su 2009; Singleton et al. 2015; Stepulak et al. 2014). L'evidència principal ha estat la manca d'efectes citotòxics del tractament amb altes concentracions d'inhibidors o antagonistes selectius de les dianes. A excepció del receptor no opioide  $\sigma$ , sobre el qual es va certificar, a més, la seva absència en el nostre model. Si bé als estudis de predicció d'unió diana-lligand realitzats per *Mind The Byte* es va predir la unió dels antagonistes de DRD4 a aquestes dianes, el fet que antagonistes específics no tinguin grans efectes antileucèmics va fer cessar tota investigació en aquesta direcció. El motiu principal de no poder mimetitzar els efectes dels antagonistes de DRD4 amb les dianes seleccionades per *Mind The Byte* és probablement que el efecte antileucèmic no depèn d'una unió específica diana-lligand. Com es desglossarà més endavant les propietats físicoquímiques dels compostos són potencialment els responsables d'iniciar una desregulació lipídica cel·lular que precipita a la mort cel·lular dependent d'autofàgia.

Arribats a aquest punt, s'havien descartat la diana més lògica així com les diverses dianes potencials predites per *Mind the byte*, i com a última estratègia, es va decidir dur a terme un estudi de l'expressió gènica. Malgrat el modelatge *in silico* permet

predir la molècula reconeguda i modulada pel compost, estudiar l'expressió gènica permet discernir la senyalització subcel·lular afectada pel tractament. En l'*array* dut a terme, es va poder estudiar els canvis en resposta al tractament de dos antagonistes de DRD4 diferents (L741-742), en dues línies cel·lulars en estadis madurats molt diferents (CEM i RPMI) i en dos temps de tractaments (12 i 24h). Dels resultats obtinguts a l'*array*, el més rellevant biològicament per la seva implicació en la biologia de LLA-T, és la manca d'efectes sobre la ruta de senyalització de NOTCH1, la ruta més estudiada com a potencial diana terapèutica per aquesta malaltia (Cullion et al. 2009; Palomero and Ferrando 2009), atès que en més de la meitat dels pacients de LLA-T s'hi ha descrit alteracions (Weng et al. 2004). Tampoc es van identificar alteracions en el cicle cel·lular, malgrat aquests resultats s'ajustaven més amb els experiments previs realitzats sobre el cicle cel·lular. De l'estudi de l'expressió gènica, va resultar interessant el metabolisme lipídic i malgrat no s'ha pogut constatar una diana terapèutica, probablement per la seva inexistència, ens ha permès identificar la ruta de senyalització afectada en resposta al tractament amb els antagonistes de DRD4.

Els CADs són compostos amb característiques catióniques amfifíliques, d'aquí les sigles en anglès. Es caracteritzen per posseir a la seva estructura una cadena lateral hidrofílica, una amina protonable i una regió hidrofòbica generalment constituïda per un anell aromàtic (Ploemen et al. 2004). Els CADs i els seus efectes cel·lulars en el context de cèl·lula sana han estat estudiats en múltiples ocasions. Un dels efectes descrits i d'especial rellevància per aquest treball és la inducció de la fosfolipidosi (Kodavanti and Mehendale 1990; Muehlbacher et al. 2012; Reasor, Hastings, and Ulrich 2006). Respecte la fosfolipidosi i la seva inducció, especialment rellevant és el fet que encara manquen estudis per caracteritzar a fons aquesta inducció, i poder demostrar definitivament que formació dels cossos lamel·lars com a *hallmark* del procés. En aquest sentit, alguns dels precedents en la literatura recalquen que la millor manera de demostrar la fosfolipidosi és via microscòpia electrònica (Lowe et al. 2012; Sawada, Takami, and Asahi 2005). Atesa la rellevància de la fosfolipidosi en el model proposat, en el futur, caldrà realitzar aquesta validació via microscòpia electrònica.

Considerant les característiques estructurals (Figura 67), els tres antagonistes de DRD4 amb efecte antileucèmic, es pot concloure que L741-742, nemonaprida i RBI-257 presenten estructura de CAD. Contràriament a sonepiprazole, antagonista específic del DRD4 però que no indueix efecte antileucèmic en LLA-T .



**Figura 67. Estructura química dels antagonistes de DRD4 estudiats.** Els requadres taronges indiquen els àtoms fàcilment ionitzables.

La inducció de la fosfolipidosi amb el tractament de CADs, no es basa en cap reconeixement molecular, ni tampoc amb la presència d'una diana específica. La predicció de la capacitat de certs compostos d'induir la fosfolipidosi es basa en les propietats catióniques amfifíliques dels compostos inductors (Reasor, Hastings, and Ulrich 2006). Les molècules de les mides en els que ens movem, s'assumeix que es produeix una difusió passiva a través de les membranes de molècules suficientment hidrofòbiques i no carregades, mentre que s'observa impermeabilitat a molècules polars i/o carregades (N. J. Yang and Hinner 2015). L'estructura fisicoquímica és per tant un element fonamental que determina que els CADs puguin creuar membranes amb facilitat i protonar-se en medi àcid, el mecanisme anomenat d'atrapament iònic (Kuzu et al. 2017). La fragilitat de les membranes fosfolipídiques en el context tumoral (Alves et al. 2016) i la vulnerabilitat lisosomal (Hämälistö and Jäättelä 2016) són dos elements bàsics que permetin l'efecte diferencial dels compostos inductors de la fosfolipidosi en càncer. Per predir si un compost és inductor de la fosfolipidosi cal tenir en consideració dues característiques fisicoquímiques

fonamentals, el pKa que informa de la capacitat de dissociació i el ClogP com a mesura de la hidrofobicitat de la molècula (Ploemen et al. 2004). Segons aquest model, cal que les característiques fisicoquímiques del compost compleixin les bases de la Figura 68.

Model inducció de la fosfolipidosi
pKa > 8
ClogP > 1
pKa <sup>2</sup> + ClogP <sup>2</sup> > 90

**Figura 68. Bases del model de predicció de la inducció de la fosfolipidosi.** Característiques físicoquímiques que cal que compleixin els CADs per la inducció de la fosfolipidosi (Ploemen et al. 2004).

Analitzant les propietats físicoquímiques de L741-742, nemonaprida, RBI-257 i sonopiprazole com a control negatiu, (Figura 69) es pot concloure que els tres antagonistes de DRD4 avaluats en el present treball amb efecte antileucèmic són inductors de la fosfolipidosi, mentre que sonopiprazole no compleix els requisits estructurals.

Propietats físicoquímiques L741-742	Propietats físicoquímiques nemonaprida	Propietats físicoquímiques RBI-257
pKa > 8,4	pKa > 13,69	pKa > 8,95
ClogP > 5,61	ClogP > 3,83	ClogP > 5,68
pKa <sup>2</sup> + ClogP <sup>2</sup> > 102,03	pKa <sup>2</sup> + ClogP <sup>2</sup> > 201,99	pKa <sup>2</sup> + ClogP <sup>2</sup> > 112,36
<b>Propietats físicoquímiques sonopiprazole</b>		
pKa > 7,25		
ClogP > 2,28		
pKa <sup>2</sup> + ClogP <sup>2</sup> > 57,75		

**Figura 69. Els antagonistes de DRD4 són CADs inductors de la fosfolipidosi.** L741-742, nemonaprida i RBI-257 compleixen les característiques del model (Ploemen et al. 2004) mentre que sonopiprazole no. Els valors en vermell indiquen el no compliment de les característiques.

Malgrat les membranes fosfolipídiques estiguin constituïdes pels mateixos elements en cèl·lules sanes i tumorals, cal matisar i tenir en consideració que i) les membranes fosfolipídiques de les cèl·lules tumorals poden presentar un increment en el colesterol i ser en conseqüència molt més permeables, ii) les membranes tumorals

han perdut la asimetria típica de les bicapes lipídiques al mateix temps que es produeix un augment de la càrrega negativa de la membrana extracel·lular que comporta la baixada del pH a la proximitat de les cèl·lules tumorals (generalment pel bombeig de cations monovalents al exterior per contrarestar les càrregues negatives dels fosfolípids de la membrana) (Alves et al. 2016; Bernardes and Asenio 2018).

En línia amb les consideracions anteriors, els CADs i la inducció de la fosfolipidosi pot ser més rellevant el context tumoral que en cèl·lules sanes. En altres treballs, s'han destacat certs compostos inductors de modificacions en la conformació lipídica. Malgrat els resultats obtinguts depenen àmpliament del compost utilitzat, existeixen evidències d'interaccions dels compostos amb els fosfolípids que alteren la disposició de la membrana, el potencial de la membrana o bé poden causar trencaments de les cadenes dels fosfolípids estructurals, constituint així una potencial estratègia terapèutica en càncer atesa la naturalesa de les membranes fosfolipídiques en el context tumoral. Quimioterapèutics convencionals (S. Feng, Gong, and Chew 2002; Preetha, Huilgol, and Banerjee 2006, 2007), antipsicòtics (Agasosler et al. 2001; Hidalgo et al. 2004), antibiòtics (Berquand et al. 2005; Grancelli et al. 2019), antifúngics (Corvis et al. 2006), i d'altres compostos amb estructura química concreta, han estat estudiats per les seves interaccions amb els lípids constituents de les membranes. Els efectes sobre la membrana plasmàtica depenen enormement de l'estructura dels compostos (Peetla and Labhasetwar 2009). En aquest context, els estudis amb leucèmia són escassos, però s'ha suggerit que els efectes secundaris neurològics induïts pel metotrexat, poden ser causa de la interacció del fàrmac amb la bicapa lipídica (Maheswari 2001). Conjuntament amb els fosfolípids, els lisosomes com a orgànul àcid preferentment afectat per la fosfolipidosi, s'ha descrit que és molt més vulnerable en el context tumoral que en cèl·lula sana, en concordança amb les nostres dades d'alta selectivitat dels antagonistes de DRD4 en leucèmia. (Kirkegaard and Jäätelä 2009; Kroemer and Jäätelä 2005)

Els antagonistes de DRD4, presenten un altre impediment vinculat a la seva estructura, com és la manca d'efecte antileucèmic en experiments *in vivo*. Al no ser

un compost soluble en aigua, no s'ha pogut realitzar les administracions orals, elegint-se la injecció intraperitoneal dels compostos com alternativa. Atesa l'elevada hidrofobicitat de les estructures dels antagonistes de DRD4, sembla que aquesta seria responsable de l'elevat volum de distribució als teixits amb molt baixes concentracions en plasma (Chan et al. 2018; Rodgers and Rowland 2006). El ràpid metabolisme dels compostos porta associada la incertesa de si realment s'està duent a terme l'efecte dels antagonistes de DRD4. Considerat l'elevada importància de l'estructura i del manteniment d'aquesta per a dur a terme l'efecte antileucèmic segons el nostre model, caldrà considerar altres estratègies com la vehiculització dels fàrmacs. Un exemple de gran rellevància en el camp de LLA-T, és la vincristina administrada en liposomes, que s'ha relacionat amb una millora en els efectes citotòxics acompanyada d'una reducció en el percentatge de fàrmac lliure en el plasma i per tant una millora en l'eficàcia amb una toxicitat acceptable (Pathak, Hess, and Weiss 2014).

Durant anys, els compostos inductors de la fosfolipidosi s'han associat repetides vegades amb efectes secundaris al fetge, ronyó o aparell respiratori (Kodavanti and Mehendale 1990; Lullmann, Lullmann-Rauch, and Wassermann 1975; Mason and Crystal 1973). Conseqüentment la fosfolipidosi, ha esdevingut un element important a considerar i evitar durant el procés de desenvolupament de nous compostos (Anderson 2006). El problema principal és la generació de cossos lamel·lars preferentment en els macròfags i també resulta susceptible el teixit limfoide (Nonoyama and Fukuda 2008). Considerant que els antagonistes de DRD4 són compostos inductors de la fosfolipidosi, sembla que aquest procés afecta de forma diferencial a les cèl·lules leucèmiques que a les sanes. Atès que en els estudis sobre l'hematopoesi sana, no s'ha observat cap efecte en el llinatge limfoide ni mieloide. Així doncs, potser caldria tenir en consideració el context cel·lular on es pretén l'acció dels compostos inductors de la fosfolipidosi, com a element determinant per al descart o no en la cerca de nous compostos.

Respecte la fosfolipidosi, L741-742 com agent inductor del procés que s'ha validat experimentalment, altera el patró fosfolipídic de les cèl·lules leucèmiques. Aquesta alteració es manifesta amb una vesicularització dels fosfolípids i la co-localització



d'aquestes vesícules amb els lisosomes. L'acumulació dels fosfolípids als lisosomes és una característica que defineixen la fosfolipidosi. En aquest sentit, a l'inici d'aquesta tesi doctoral es va considerar el receptor de dopamina com a potencial diana terapèutica pels precedents en els que s'havia validat la seva rellevància en LMA i càncer de mama. En aquest treball es va validar amb l'ús de tioridazina com antagonista dels receptors de dopamina (Sachlos et al. 2012). D'entre els compostos inductors de la fosfolipidosi, tioridazina va ser identificat com un d'ells (Lullmann-Rauch 1974), el que compromet la rellevància real del receptor de dopamina i la seva implicació com a diana terapèutica.

La inducció de la fosfolipidosi porta associades un reguitzell de desregulacions en el metabolisme lipídic que, segons el nostre model, actuant de forma conjunta acaben precipitant la cèl·lula cap a la mort cel·lular dependent d'autofàgia. La fosfolipidosi representa el primer esdeveniment cel·lular en resposta al tractament, al poder-se identificar a la primera hora de tractament amb L741-742. Quant aquest primer esdeveniment es veu revertit en presència d'agents antioxidants com l'  $\alpha$ -tocoferol descrits per les seves capacitats inhibidores sobre la fosfolipidosi, (Ágoston et al. 2003; Scuntaro et al. 1996), la citotoxicitat de L741-742 i mort cel·lular també es veu fortament revertida. El que suggereix que la inducció de la fosfolipidosi és crucial per a l'activació d'un seguit de desregulacions que finalment es tradueixen en una mort cel·lular. Malgrat la presència del l'  $\alpha$ -tocoferol reverteix la mort cel·lular, no s'ha pogut validar una reversió de la inducció de la fosfolipidosi. Aquest es podria explicar per la gran quantitat de papers cel·lulars que dur a terme l'  $\alpha$ -tocoferol (C. S. Yang, Suh, and Tony Kong 2012). Cal també considerar que la reversió de la viabilitat cel·lular en presència de l'  $\alpha$ -tocoferol es dona a unes concentracions d'aquest de 500 o 1000  $\mu\text{M}$ , una reversió que el context fisiològic no podria donar-se atès que la concentració màxima de vitamina E en sang es troba aproximadament al voltant de 39  $\mu\text{M}$ .

El metabolisme lipídic es veu alterat davant de la inducció de la fosfolipidosi. Estudis precedents han determinat canvis substancials en l'expressió gènica associada al tractament amb CADs inductors de la fosfolipidosi. En aquests estudis s'ha determinat un conjunt de gens marcadors inductors de la fosfolipidosi, entre ells



destaquen la síntesi de colesterol, degradació de fosfolípids, transport d'àcids grassos i proteòlisi entre d'altres (Sawada, Takami, and Asahi 2005). Altres treballs també han subratllat un increment en la síntesi de lípids neutres (Matsuzawa and Hostetler 1980). Conjuntament amb els lípids neutres i els estudis de les desregulacions d'aquest en resposta al tractament, romanen estudis importants en relació amb la fosfolipidosi així com amb les múltiples desregulacions cel·lular associades. En aquest sentit, un exemple clar és el colesterol, la síntesi i metabolisme s'ha vinculat amb la fosfolipidosi (Lowe et al. 2012; Matsuzawa and Hostetler 1980; Sawada, Takami, and Asahi 2005). En el futur, caldrà realitzar estudis sobre les possibles alteracions d'aquest en resposta al tractament amb L741-742 i la resta de compostos. Les conseqüències cel·lulars de la fosfolipidosi, també abasten la inhibició de les fosfolipases lisosomals i el transport enzimàtic lisosomal (Lowe et al. 2012). En els nostres estudis, utilitzant un anàleg de fosfolípid marcat amb un fluorocrom, s'ha pogut determinar una reducció dels fosfolípids en resposta al tractament. Aquesta reducció es podria explicar per la formació d'agregats fosfolipídics i pèrdua de la conformació o bé, per una acumulació dels fosfolípids a l'interior del lumen lisosomal on, per condicions de pH i acidesa, la sonda d'anàleg de fosfolípids perdi la seva conformació.

Respecte als lípids neutres, els estudis en aquest treball han pogut identificar-ne una acumulació. S'ha detectat un augment del contingut de lípids neutres i l'aparició de vesícules lipídiques compatibles amb *lipid droplets*. Aquestes alteracions en els lípids neutres poden explicar-se per múltiples vies: un augment de la síntesi, una inhibició de la degradació, un impediment de la normal digestió del compartiment lisosomal per un mal funcionament d'aquest o bé, una combinació dels tres elements anteriors. L'augment en la síntesi d'àcids grassos ha estat àmpliament descrita en el context tumoral (Medes, Thomas, and Weinhouse 1953) així com també l'aparició de *lipid droplet* (Apffel and Baker 1963), malgrat fos una possibilitat plausible els estudis han suggerit que no era el que passava. L'impediment de la digestió lisosomal i la conseqüent acumulació d'estructures podria ser conseqüència de la disfunció dels lisosomes causada per la fosfolipidosi. Els estudis sobre el compartiment lisosomal i els fosfolípids conjuntament, han molt reveladors, al permetre'ns identificar que a nivell subcel·lular, les vesícules de fosfolípids en

resposta al tractament es troben co-localitzant amb els lisosomes. Aquesta possible acumulació de fosfolípids als lisosomes conduiria a una pèrdua del normal funcionament d'aquest orgànul i conseqüentment una acumulació d'estructures citoplasmàtiques pendents de digerir. La relació entre la inducció de la fosfolipidosi i l'augment del compartiment autofàgic ha estat prèviament observada (Buratta et al. 2015).

Certificat l'augment dels lípids neutres, s'ha constatat la importància d'aquest al observar-se un efecte sinèrgic de L741-742 amb un inhibidor de la lipòlisi. S'ha pogut certificar que aquest augment no es degut a un mal funcionament de l'oxidació mitocondrial. En els primer cas, amb l'ús de DEUP com inhibidor principal de la lipòlisi, es va determinar un efecte sinèrgic amb els efectes de L741-742 sobre la viabilitat cel·lular. Aquests resultats són indicadors de la importància de l'acumulació de lípids i les conseqüències citotòxiques que indueixen en el nostre sistema. Respecte l'oxidació mitocondrial, amb el bloqueig d'aquesta via amb l'ús d'etomoxir, no es van poder constatar canvis en el contingut lipídic. Aquests resultats suggereixen que l'oxidació d'àcids grassos mitocondrials no sembla ser rellevant en el nostre model o bé, que etomoxir com inhibidor de la via catabòlica mitocondrial, no funciona en el nostre sistema, d'igual manera que s'ha descrit en d'altres tumors com glioblastoma (Cabodevilla et al. 2013) o bé en leucèmia (Samudio, Taegtmeier, and Andreeff 2010).

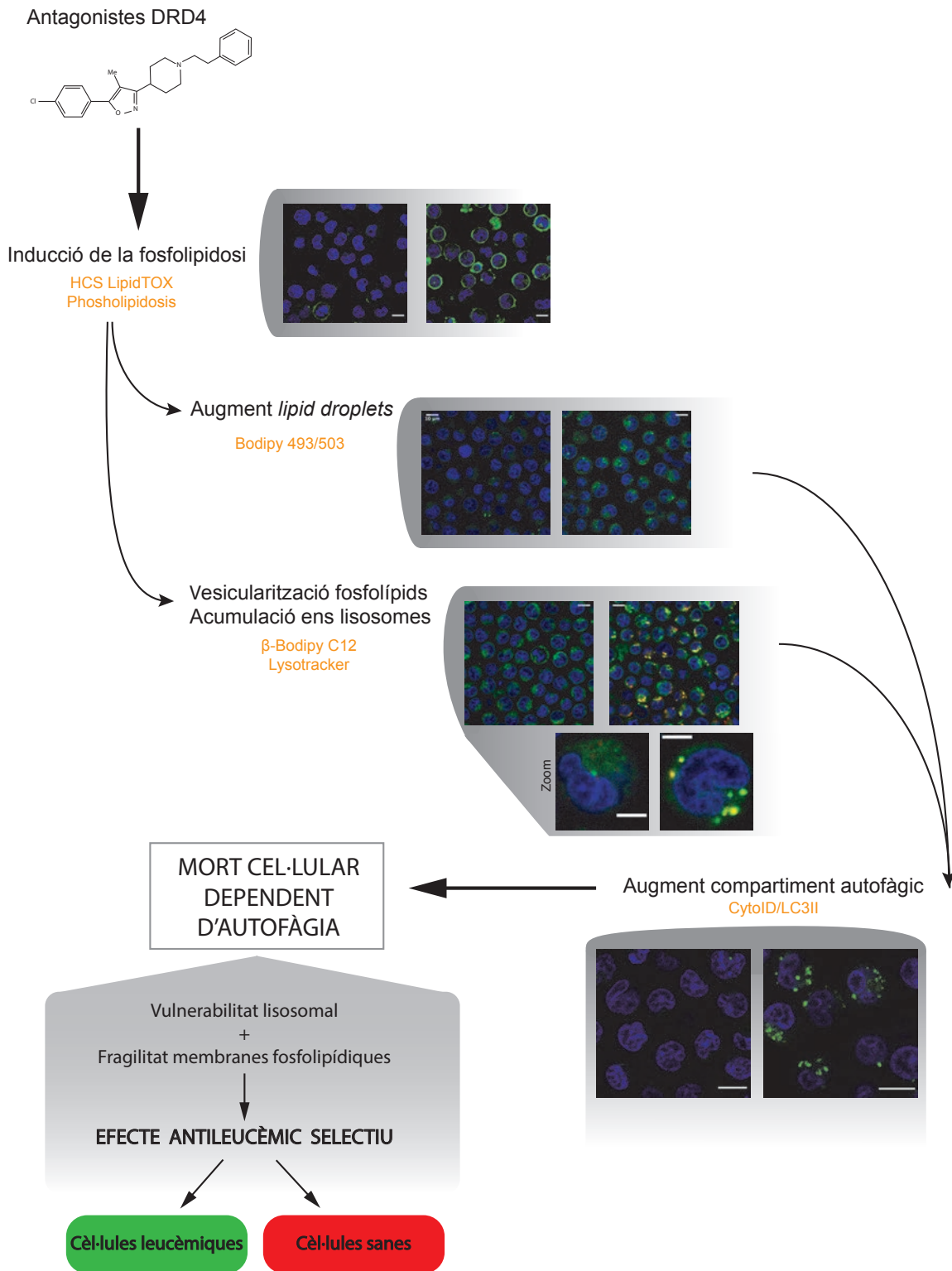
En aquest sentit, aquest experiments representen una branca important del nostre model. La capacitat sinèrgica sobre la viabilitat cel·lular atribuïda a l'acumulació de lípids, posa de manifest la importància de mantenir la correcta homeòstasi lipídica així com la fragilitat del sistema lipídic tumoral. Les desregulacions sobre el metabolisme lipídic amb el tractament de L741-742 s'inicien amb la fosfolipidosi, la segueixen les alteracions en el contingut de lípids neutres i probablement colesterol, al mateix temps que s'afecta el normal funcionament dels lisosomes. Respecte el colesterol, en LLA-T, cèl·lules leucèmiques resistents a fàrmacs presenten un alt grau de colesterol a la seva membrana externa (May et al. 1988). En altres leucèmies com per exemple la LMA, també s'han descrit a una elevada presència que protegeix les cèl·lules leucèmiques dels efectes dels quimioterapèutics (Banker et al. 2004).

Aquest conjunt d'elements, que per separat s'han descrit les afectacions cel·lulars que presenten, considerant també possibles efectes sobre el tràfic normal d'àcids grassos, sobrepassen la cèl·lula i la condueixen a la mort cel·lular programada.

Amb el tractament amb els antagonistes de DRD4, s'ha demostrat que el compartiment autofàgic es veu incrementat en resposta al tractament. Aquest increment en el compartiment es manté un cop s'ha activat, presentant afectacions semblants des de l'activació a les 6h fins a temps més tardans. Aquest augment de l'autofàgia en el nostre sistema, pot ser atribuïble, d'una banda a la disfunció dels lisosomes que sol portar a la inhibició de la fusió entre autofagosomes i lisosomes impedit que el material capturat per l'autofàgia sigui lliurat als segons per la seva degradació (Kuzu et al. 2017; Logan et al. 2014; Ostefeld et al. 2008). D'altra banda, l'augment del material per digerir com a conseqüència de l'aparició d'agregats fosfolipídics en resposta a la fosfolipidosi podria induir en última instància un augment de l'autofàgia (Buratta et al. 2015). Aquesta afectació de l'autofàgia però, a més, en el nostre model, juga un paper clau en la mort cel·lular, atès que els estudis realitzats sobre la mort cel·lular programada, apunten que es produeix una mort cel·lular dependent d'autofàgia. La mort cel·lular dependent d'autofàgia ha estat objecte de moltíssima controvèrsia en la comunitat científica (Clarke and Puyal 2012; Shen, Kepp, and Kroemer 2012). El comitè sobre la nomenclatura de la mort cel·lular va estipular que es consideraria mort cel·lular dependent d'autofàgia només en aquelles situacions on la mort cel·lular induïda fos revertida en presència d'un inhibidor específic de l'autofàgia (Galluzzi et al. 2018). En aquest sentit, per tal de validar la implicació en el procés de mort cel·lular es va utilitzar 3-MA com inhibidor de l'autofàgia (Seglen and Gordon 1982), i els estudis realitzats demostren que en presència d'aquest inhibidor es reverteix tant la mort cel·lular com l'augment del compartiment autofàgic, reduint-se l'aparició d'autofagosomes. En aquests estudis s'ha pogut determinar una reducció en l'aparició d'autofagosomes en presència de 3MA. Estudis precedents han demostrat que la inhibició de l'autofàgia amb 3MA redueix la formació de cossos lamel·lars (Hariri et al. 2000) i per tant, en el nostre sistema, aquest fet aniria en concordança amb el fet que en presència de 3MA es reverteix la mort cel·lular.

En termes de mort cel·lular programada, és important recalcar la manca d'implicació de la maquinària apoptòtica. Al mateix temps que es descarta aquest tipus de mort cel·lular programada, també es pot desvincular els mitocondris com orgànul afectat en el tractament dels antagonistes de DRD4. Els mitocondris han estat àmpliament descrits per les seves afectacions en cèl·lules tumorals en termes de mida, morfologia, membranes, activitat (Modica-Napolitano and Weissig 2015) i sobretot per la sobreproducció de mitROS, que s'ha relacionat amb l'activació de vies proliferatives i la inestabilitat genòmica (Irwin, Valle, and Chandra 2013; Sabharwal and Schumacker 2014). Malgrat aquests precedents sobre les alteracions mitocondrials en càncer, en els nostres experiments s'ha demostrat que aquest orgànul no tindria afectació per part dels antagonistes de DRD4.

En base als precedents d'altres grups de recerca i les observacions realitzades durant el treball experiment del present estudi, es proposa l'efecte selectiu antileucèmic dels antagonistes de DRD4 seguint el següent model Figura 70. Els compostos atesa la seva estructura de CAD i la seva mida, entren per difusió passiva i indueixen la fosfolipidosi. Aquesta inducció de la fosfolipidosi genera els agregats fosfolipídics en forma probablement cossos lamel·lars a l'interior dels lisosomes. Aquesta concentració de fosfolípids als lisosomes n'augmenta la massa al mateix temps que n'altera el correcte funcionament. En resposta al mal funcionament lisosomal així com també, de manera secundària, als agregats fosfolipídics i aparició de *lipid droplets*, el compartiment autofàgic augmenta la seva activitat precipitant la cèl·lula finalment a la mort cel·lular dependent d'autofàgia. Atès que és un mecanisme absent de dianes moleculars i reconeixements específics, podria ser emprat en moltes neoplàsies hematològiques més, com així indiquen els resultats preliminars en LMA. La vulnerabilitat dels lisosomes en càncer i la fragilitat de les membranes fosfolipídiques en càncer permeten explicar l'efecte antileucèmic selectiu. A més, cal considerar que en el cas de la LMA, la fragilitat del compartiment lisosomal ha estat àmpliament descrit (Ono, Kim, and Han 2003; Sukhai et al. 2013), una característica que juga a favor del model proposat.



**Figura 70. Model proposat per a l'efecte dels antagonistes de DRD4.** En taronja es mostren les eines emprades per a l'estudi de diferents esdeveniments.

Al llarg de tot aquest estudi hem descrit per primer cop els efectes selectius antileucèmics d'un grup d'antagonistes de DRD4 en LLA-T, mitjançant els efectes sobre una diana no molecular i no convencional. Aquest perfil preclínic també s'ha validat de forma preliminar en LMA i altres neoplàsies mieloides. Aquests estudis han suposat la descripció de la fosfolipidosi en LLA-T i les subseqüents alteracions del metabolisme lipídic i compartiment endolisosomal, descrivint així un mecanisme biològic rellevant en la transformació leucèmica. Atesa la naturalesa del mecanisme d'acció, els antagonistes de DRD4, amb optimitzacions factibles per a la clínica, podrien ser considerats com un potencial tractament per a un espectre ampli de pacients. Aquestes troballes a més obren la porta a nous tractaments i conviden a reflexionar sobre nous tipus de dianes independents del reconeixement molecular específic. La manca significativa d'afectació de les cèl·lules sanes, representa un valor afegit d'aquests compostos per iniciar les optimitzacions necessàries i validar-ne la idoneïtat per a la futura aplicació en clínica.



## **6. Conclusions**





En base a tot allò exposat a les pàgines precedents, es poden extreure tres grans conclusions d'aquesta tesi doctoral:

1. Un subgrup de compostos antagonistes específics del receptor DRD4, L741-742, nemonaprida i RBI-247 tenen activitat antileucèmica selectiva tant en LLA-T com LMA, sense afectar la viabilitat i/o funcionalitat de les cèl·lules hematopoètiques sanes.
2. Els efectes antileucèmics dels antagonistes de DRD4 no es produeixen a través del receptor de dopamina DRD4 sinó que depenen de la inducció de la fosfolipidosi, la subseqüent disrupció de l'homeòstasi lipídica i afectació del compartiment de endo-lisosomal de reciclatge desencadenant la mort cel·lular dependent d'autofàgia sense activació de l'apoptosi.
3. Les característiques fisicoquímiques dels compostos permeten la seva acumulació als lisosomes i la inducció de la fosfolipidosi, responsable de l'efecte terapèutic en les cèl·lules leucèmiques.



## **7. Bibliografia**



- Abbas, Mohammed K, Tai-june Yoo, and Joseph Viles. 1982. "Ultrastructure and Fatty Acid Composition of Fatty Acid-Modified Morris 7777 Hepatoma Cells." (NOVEMBER): 4639–49.
- Abramczyk, Halina et al. 2015. "The Role of Lipid Droplets and Adipocytes in Cancer. Raman Imaging of Cell Cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 Compared to Adipocytes in Cancerous Human Breast Tissue." : 2224–35.
- Accioly, Maria T et al. 2008. "Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E 2 Synthesis in Colon Cancer Cells." (6): 1732–41.
- Agasosler, A V et al. 2001. "Chlorpromazine-Induced Increase in Dipalmitoylphosphatidylserine Surface Area in Monolayers at Room Temperature." *Biochemical pharmacology* 61(7): 817–25.
- Agius, Loranne, Edgar J. Meredith, and H. Stanley A. Sherratt. 1991. "Stereospecificity of the Inhibition by Etomoxir of Fatty Acid and Cholesterol Synthesis in Isolated Rat Hepatocytes." *Biochemical Pharmacology* 42(9): 1717–20.
- Agliano, Alice et al. 2008. "Human Acute Leukemia Cells Injected in NOD/LtSz-Scid/IL-2R $\gamma$  Null Mice Generate a Faster and More Efficient Disease Compared to Other NOD/Scid-Related Strains." *International Journal of Cancer* 123(9): 2222–27.
- Ágoston, Márta et al. 2003. "Silymarin and Vitamin E Reduce Amiodarone-Induced Lysosomal Phospholipidosis in Rats." *Toxicology* 190(3): 231–41.
- Aguilar-Gallardo, C., and C Simón. 2007. "Stem Cells and Cancer Stem Cells." *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 11(15): 2948–51.
- Aifantis, Iannis, Elizabeth Raetz, and Silvia Buonamici. 2008. "Molecular Pathogenesis of T-Cell Leukaemia and Lymphoma." *Nature Reviews Immunology* 8(5): 380–90.
- Al-Hajj, Muhammad et al. 2003. "Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 3983–88.
- Al-zoughbi, Wael et al. 2016. "Loss of Adipose Triglyceride Lipase Is Associated with Human Cancer and Induces Mouse Pulmonary Neoplasia." 7(23).
- Alberts, B et al. 2010. *Biología Molecular de La Célula. Quinta Edición.*
- Alli, Patricia M. et al. 2005. "Fatty Acid Synthase Inhibitors Are Chemopreventive for Mammary Cancer in Neu-N Transgenic Mice." *Oncogene* 24(1): 39–46.
- Alves, Ana Catarina, Daniela Ribeiro, Cláudia Nunes, and Salette Reis. 2016. "Biophysics in Cancer : The Relevance of Drug-Membrane Interaction Studies." *BBA - Biomembranes* 1858(9): 2231–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025>.
- Anderson, Nora. 2006. "Drug-Induced Phospholipidosis." 580: 5533–40.
- Apffel, C.A, and J.R Baker. 1963. "Lipid Droplets in the Cytoplasm of Malignant Cells." (243): 176–84.
- Appelqvist, Hanna, Petra Wäster, Katarina Kågedal, and Karin Öllinger. 2013. "The Lysosome: From Waste Bag to Potential Therapeutic Target." *Journal of Molecular Cell Biology* 5(4): 214–26.
- Araki, K. et al. 2014. "Loss of MTOR Complex 1 Induces Developmental Blockage in Early T-Lymphopoiesis and Eradicates T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(10): 3805–10.
- Arber, Daniel A et al. 2019. "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." 127(20): 2391–

- 2406.
- Armstrong, Florence et al. 2009. "NOTCH Is a Key Regulator of Human T-Cell Acute Leukemia Initiating Cell Activity." *Blood* 113(8): 1730–40.
- Baenke, Franziska, Barrie Peck, Heike Miess, and Almut Schulze. 2013. "Hooked on Fat: The Role of Lipid Synthesis in Cancer Metabolism and Tumour Development." 1363: 1353–63.
- Banker, Deborah E et al. 2004. "Cholesterol Synthesis and Import Contribute to Protective Cholesterol Increments in Acute Myeloid Leukemia Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 104(6): 1816–25.
- Banús-Mulet, Antònia et al. 2018. "Serotonin Receptor Type 1B Constitutes a Therapeutic Target for MDS and CMML." *Scientific Reports* 8(1): 1–14.
- Baracca, Alessandra, Gianluca Sgarbi, Giancarlo Solaini, and Giorgio Lenaz. 2003. "Rhodamine 123 as a Probe of Mitochondrial Membrane Potential: Evaluation of Proton Flux through F<sub>0</sub> during ATP Synthesis." 1606: 137–46.
- Barata, João T. et al. 2018. "IL-7R-Mediated Signaling in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: An Update." *Advances in Biological Regulation* 71(September 2018): 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.09.012>.
- Barata, Joao T, Angelo A Cardoso, Lee M Nadler, and Vassiliki A Boussiotis. 2008. "Interleukin-7 Promotes Survival and Cell Cycle Progression of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by down-Regulating The." *Regulation* 98(5): 1524–31.
- Bassan, Renato, and Dieter Hoelzer. 2011. "Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 29(5).
- Beckers, Annelies et al. 2007. "Chemical Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Induces Growth Arrest and Cytotoxicity Selectively in Cancer Cells." *Cancer Research* 67(17): 8180–87.
- Beloribi-djefa, S, S Vasseur, and F Guillaumond. 2016. "Lipid Metabolic Reprogramming in Cancer Cells." (October 2015).
- Belver, Laura, and Adolfo Ferrando. 2016. "The Genetics and Mechanisms of T Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia." *Nature Reviews Cancer* 16(8): 494–507. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.63>.
- Benjamin, D. I. et al. 2013. "Ether Lipid Generating Enzyme AGPS Alters the Balance of Structural and Signaling Lipids to Fuel Cancer Pathogenicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(37): 14912–17.
- Berenbaum, M.C. 1981. 35 *CRITERIA FOR ANALYZING INTERACTIONS BETWEEN BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS*.
- Berman, Adi Y., Rachel A. Motechin, Maia Y. Wiesenfeld, and Marina K. Holz. 2017. "The Therapeutic Potential of Resveratrol: A Review of Clinical Trials." *npj Precision Oncology* 1(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>.
- Bernardes, Nuno, and M.Fialho Asenio. 2018. "Perturbing the Dynamics and Organization of Cell Membrane Components: A New Paradigm for Cancer-Targeted Therapies." : 19.
- Berquand, A, N Fa, Y F Dufrene, and M P Mingeot-Leclercq. 2005. "Interaction of the Macrolide Antibiotic Azithromycin with Lipid Bilayers: Effect on Membrane Organization, Fluidity, and Permeability." *Pharmaceutical research* 22(3): 465–75.
- den Boer, Monique L. et al. 2006. "Gene Expression-Based Chemical Genomics Identifies Rapamycin as a Modulator of MCL1 and Glucocorticoid Resistance." *Cancer Cell* 10(4): 331–42.

- Bongiovanni, Deborah, Valentina Saccomani, and Erich Piovan. 2017. "Aberrant Signaling Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *International Journal of Molecular Sciences* 18(9): 1–29.
- Bonnet, D., and J.E Dick. 1997. "Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell." *Nature Medicine* 3.
- Bourne, James A. 2001. "SCH 23390 : The First Selective Dopamine D<sub>1</sub>-Like Receptor Antagonist." 7(4): 399–414.
- Bousquet, Guilhem et al. 2017. "Targeting Autophagic Cancer Stem-Cells to Reverse Chemoresistance in Human Triple Negative Breast Cancer." *Oncotarget* 8(21): 35205–21.
- Boussiotis, Vassiliki A. et al. 2004. "Activation of PI3K Is Indispensable for Interleukin 7-Mediated Viability, Proliferation, Glucose Use, and Growth of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 200(5): 659–69.
- Bozza, Patricia T. 2010. "Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids Lipid Droplets in Inflammation and Cancer." 82: 243–50.
- Bristow, L, L Landon, K Saywell, and M D Tricklebank. 1995. "The Glycine/NMDA Receptor Antagonist, L-701,324 Reverses Isolation-Induced Deficits in Prepulse Inhibition in the Rat." : 230–32.
- Bronietzki, Alisha W., Marc Schuster, and Ingo Schmitz. 2015. "Autophagy in T-Cell Development, Activation and Differentiation." *Immunology and Cell Biology* 93(1): 25–34. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2014.81>.
- Buratta, Sandra et al. 2015. "A Role for the Autophagy Regulator Transcription Factor EB in Amiodarone-Induced Phospholipidosis." *Biochemical Pharmacology* 95(3): 201–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.03.017>.
- Cabodevilla, Ainara G et al. 2013. "CELL SURVIVAL DURING COMPLETE NUTRIENT DEPRIVATION DEPENDS ON." (13).
- Cai, Mengjiao et al. 2018. "Disruption of Peroxisome Function Leads to Metabolic Stress, MTOR Inhibition, and Lethality in Liver Cancer Cells." *Cancer Letters* 421: 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.021>.
- Calabretta, Bruno, and Paolo Salomoni. 2011. "Inhibition of Autophagy: A New Strategy to Enhance Sensitivity of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors." *Leukemia and Lymphoma* 52(SUPPL. 1): 54–59.
- Carlsson, A, M Lindqvist, and T Magnusson. "3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists."
- Carpenter, Andrea C, and Rémy Bosselut. 2010. "Decision Checkpoints in the Thymus." 11(8).
- Carracedo, Arkaitz, Lewis C Cantley, and Pier Paolo Pandolfi. 2013. "Cancer Metabolism : Fatty Acid Oxidation in the Limelight." <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3483>.
- Cha, Ji-Young, and Ho-Jae Lee. 2017. "Targeting Lipid Metabolic Reprogramming as Anticancer Therapeutics." *Journal of Cancer Prevention* 21(4): 209–15.
- Chan, Rosa, Tom De Bruyn, Matthew Wright, and Fabio Broccatelli. 2018. "Comparing Mechanistic and Preclinical Predictions of Volume of Distribution on a Large Set of Drugs." *Pharmaceutical Research* 35(4).
- Chen, H. W. et al. 2012. "Targeted Therapy with Fatty Acid Synthase Inhibitors in a Human Prostate Carcinoma LNCaP/Tk-Luc-Bearing Animal Model." *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 15(3): 260–64.



- <http://dx.doi.org/10.1038/pcan.2012.15>.
- Chen, Ming et al. 2018. "An Aberrant SREBP-Dependent Lipogenic Program Promotes Metastatic Prostate Cancer." *Nature Genetics* 50(February). <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-017-0027-2>.
- Cherednichenko, Gennady et al. 2004. "NADH Oxidase Activity of Rat Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Regulates Calcium-Induced Calcium Release." *Circulation Research* 94(4): 478–86.
- Chiu, Priscilla P.L., Hong Jiang, and John E. Dick. 2010. "Leukemia-Initiating Cells in Human T-Lymphoblastic Leukemia Exhibit Glucocorticoid Resistance." *Blood* 116(24): 5268–79.
- Clarke, Peter G H, and Julien Puyal. 2012. "Autophagic Cell Death Exists." *Autophagy* 8(6): 867–69.
- Colovic, Mirjana B et al. 2013. "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology." : 315–35.
- Constantinescu, Mihai A et al. 2011. "Autophagy Is Required for Self-Renewal and Differentiation of Adult Human Stem Cells." *Cell Research* 22(2): 432–35.
- Corvis, Johann et al. 2006. "Interactions of a Fungistatic Antibiotic, Griseofulvin, with Phospholipid Monolayers Used as Models of Biological Membranes." *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 22(18): 7701–11.
- Coustan-Smith, Elaine et al. 2009. "Early T-Cell Precursor Leukaemia: A Subtype of Very High-Risk Acute Lymphoblastic Leukaemia." *The Lancet Oncology* 10(2): 147–56.
- Cox, C. V. et al. 2006. "Characterization of a Progenitor Cell Population in Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood* 109(2): 674–82.
- Cox, Charlotte V. et al. 2004. "Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Progenitor Cells." *Blood* 104(9): 2919–25.
- Cuervo, Ana Maria, and Esther Wong. 2014. "Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging." *Cell Research* 24(1): 92–104. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Cullion, Kathleen et al. 2009. "Targeting the Notch1 and MTOR Pathways in a Mouse T-ALL Model." *LYMPHOID NEOPLASIA* 113(24): 6172–82.
- Cuvillier, O. 2008. "Downregulating Sphingosine Kinase-1 for Cancer Therapy." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12(8): 1009–20.
- Dahabieh, Michael S. et al. 2018. "Peroxisomes and Cancer: The Role of a Metabolic Specialist in a Disease of Aberrant Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1870(1): 103–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.004>.
- Dalton, W.T; et al. 1988. "HL-60 Cell Line Was Derived From a Patient With FAB-M2 and Not FAB-M3." 74(6): 1888–93.
- Davidson, Shawn M., and Matthew G. Vander Heiden. 2016. "Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 57(1): 481–507.
- de, Duve C et al. 1974. "Commentary. Lysosomotropic Agents." *Biochem.Pharmacol.* 23(0006–2952 (Print) LA-eng PT-Journal Article PT-Review RN-0 (Anti-Bacterial Agents) RN-0 (Antibodies) RN-0 (Carrier Proteins) RN-0 (Enzymes) RN-0 (Liposomes) RN-0 (Pharmaceutical Preparations) RN-0 (Polysaccharides) RN-0 (Surface-Acti): 2495–2531. pm:4606365.
- Dean, P N, and J H Jett. 1974. "Mathematical Analysis of DNA Distributions Derived from Flow Microfluorometry." *The Journal of cell biology* 60(2): 523–27.

- Delvin, Thomas M. 2011. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 7/E.
- Dessi, S et al. 1992. "Altered Pattern of Lipid Metabolism in Patients with Lung Cancer." *Oncology* 49(6): 436-41.
- Djehiche, B., J. Segalen, and Y. Chambon. 1996. "Inhibition of Autophagy of Fetal Rabbit Gonoducts by Puromycin, Tunicamycin and Chloroquin in Organ Culture." *Tissue and Cell* 28(1): 115-21.
- Dolma, Sonam et al. 2016. "Inhibition of Dopamine Receptor D4 Impedes Autophagic Flux, Proliferation, and Survival of Glioblastoma Stem Cells." *Cancer Cell* 29(6): 859-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.002>.
- Eastman, J, E Wilson, C Cervañañsky, and T Rosenberry. 1995. "Fasciculin 2 Binds to the Peripheral Site on Acetylcholinesterase and Inhibits Substrate Hydrolysis by Slowing a Step Involving Proton Transfer during Enzyme Acylation.Pdf." : 8.
- Elena, Maria et al. 2017. "Blockade of Stearoyl-CoA-Desaturase 1 Activity Reverts Resistance to Cisplatin in Lung Cancer Stem Cells Giosu E." 406.
- Elkassar, Nahed, and Ronald E. Gress. 2010. "An Overview of IL-7 Biology and Its Use in Immunotherapy." *Journal of Immunotoxicology* 7(1): 1-7.
- Eramo, A et al. 2008. "Identification and Expansion of the Tumorigenic Lung Cancer Stem Cell Population." *Cell death and differentiation* 15(3): 504-14.
- Escribá, Pablo V et al. 2008. "Membranes: A Meeting Point for Lipids, Proteins and Therapies: Translational Medicine." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(3): 829-75.
- . 2017. "Membrane-Lipid Therapy : A Historical Perspective of Membrane-Targeted Therapies — From Lipid Bilayer Structure to the Pathophysiological Regulation of Cells." *BBA - Biomembranes* 1859(9): 1493-1506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.017>.
- Fadaka, Adewale et al. 2017. "Biology of Glucose Metabolization in Cancer Cells." *Journal of Oncological Science* 3(2): 45-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jons.2017.06.002>.
- Feng, Si-shen, Ke Gong, and Jolynn Chew. 2002. "Molecular Interactions between a Lipid and an Antineoplastic Drug Paclitaxel ( Taxol ) within the Lipid Monolayer at the Air / Water Interface." *Langmuir* 2002, 18: 4061-70.
- Feng, Yuchen, Ding He, Zhiyuan Yao, and Daniel J. Klionsky. 2014. "The Machinery of Macroautophagy." *Cell Research* 24(1): 24-41. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.168>.
- Fielding, Adele K. 2011. "Current Therapeutic Strategies in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 25(6): 1255-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2011.09.008>.
- Flavin, Richard. 2010. "Fatty Acid Synthase as a Potential Therapeutic Target in Cancer Richard." 6(4): 551-62.
- Foley, George E. et al. 1965. "Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia." *Cancer* 18(4): 522-29.
- De Francesco, Ernestina M., Federica Sotgia, and Michael P Lisanti. 2018. "Cancer Stem Cells (CSCs): Metabolic Strategies for Their Identification and Eradication." *Biochemical Journal* 475(9): 1611-34. <http://www.biochemj.org/cgi/doi/10.1042/BCJ20170164>.
- Fritz, Vanessa et al. 2010. "Abrogation of De Novo Lipogenesis by Stearoyl-CoA Desaturase 1 Inhibition Interferes with Oncogenic Signaling and Blocks Prostate Cancer Progression in Mice." 9(June): 1740-55.
- Fulda, S., and K. M. Debatin. 2006. "Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in

- Anticancer Chemotherapy." *Oncogene* 25(34): 4798–4811.
- Gallagher, R et al. 1979. "Characterization of the Continuous, Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) from a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia." *Blood* 54(3): 713–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/288488>.
- Galli, Alessandro et al. 1994. "Acetylcholinesterase Protection and the Anti-Diisopropylfluorophosphate Efficacy of E2020." 270: 189–93.
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2018. "Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell death and differentiation* 25(3): 486–541. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29362479><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5864239>.
- Galluzzi, Lorenzo, Oliver Kepp, Matthew G Vander Heiden, and Guido Kroemer. 2013. "Metabolic Targets for Cancer Therapy." *Nature Publishing Group* 12(11): 829–46. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4145>.
- Galton, D A G. 1953. "MYLERAN IN CHRONIC MYELOID LEUKÆMIA RESULTS OF TREATMENT." : 208–13.
- Ganor, Yonatan et al. 2009. "Human T-Leukemia and T-Lymphoma Express Glutamate Receptor AMPA GluR3, and the Neurotransmitter Glutamate Elevates the Cancer-Related Matrix-Metalloproteinases Inducer CD147/EMMPRIN, MMP-9 Secretion and Engraftment of T-Leukemia in Vivo." *Leukemia and Lymphoma* 50(6): 985–97.
- Garau, L et al. 1978. "Dopamine Receptors: Pharmacological and Anatomical Evidences Indicate That Two Distinct Dopamine Receptor Populations Are Present in Rat Striatum." *Life Sciences* 23(17–18): 1745–50.
- Gatza, Michael L et al. 2014. "An Integrated Genomics Approach Identifies Drivers of Proliferation in Luminal-Subtype Human Breast Cancer." *Nature Publishing Group* 46(10): 1051–59. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3073>.
- Geng, Feng et al. 2016. "Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1 – Mediated Lipogenesis."
- Gerby, B. et al. 2011. "Expression of CD34 and CD7 on Human T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Discriminates Functionally Heterogeneous Cell Populations." *Leukemia* 25(8): 1249–58.
- Gerónimo-olvera, Cristian. 2019. "Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System." *Molecular Neurobiology*. [http://link.springer.com/article/10.1007/s12035-019-1546-x?utm\\_source=researcher\\_app&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=MKEF\\_USG\\_Researcher\\_inbound](http://link.springer.com/article/10.1007/s12035-019-1546-x?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=MKEF_USG_Researcher_inbound).
- Girardi, Tiziana, Carmen Vicente, Jan Cools, and Kim De Keersmaecker. 2017. "The Genetics and Molecular Biology of T-ALL." *Blood* 129(9): 1113–23.
- Gírio, A et al. 2011. "Intracellular Reactive Oxygen Species Are Essential for PI3K/Akt/MTOR-Dependent IL-7-Mediated Viability of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *Leukemia* 25(6): 960–67.
- Gocze, M, and A Freeman. 1992. "A Cholesteryl Ester Hydrolase Inhibitor Blocks Cholesterol Translocation into the Mitochondria of MA-10 Leydig Tumor Cells." 131(6): 2972–78.
- Gökbuget, Nicola, and Dieter Hoelzer. 2009. "Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia." *Seminars in Hematology* 46(1): 64–75. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.003>.
- Gómez de Cedrón, Marta, and Ana Ramírez de Molina. 2016. "Microtargeting Cancer

- Metabolism: Opening New Therapeutic Windows Based on Lipid Metabolism." *Journal of Lipid Research* 57(2): 193–206. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R061812>.
- Grace, Shane A et al. 2017. "Adipose Triglyceride Lipase ( ATGL ) Expression Is Associated with Adiposity and Tumor Stromal Proliferation in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." 704: 699–703.
- Grancelli, Anna et al. 2019. "Interaction of 6-Fluoroquinolones with Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers and Liposomes Å Scar Dome." : 9177–82.
- Guillaumond, Fabienne et al. 2015. "Cholesterol Uptake Disruption , in Association with Chemotherapy , Is a Promising Combined Metabolic Therapy for Pancreatic Adenocarcinoma."
- Guo, D, E Bell, P Mischel, and A Chakravarti. 2014. "Targeting SREBP-1-Driven Lipid Metabolism to Treat Cancer." 20(15): 2619–26.
- Hager, M.H, Keith R Solomon, Kristine Pelton, and Michael R Freeman. 2006. "The Role of Cholesterol in Prostate Cancer." In *Prostate Cancer: Biochemistry, Molecular Biology and Genetics*, , 379–85.
- Hämälistö, Saara, and Marja Jäätelä. 2016. "Lysosomes in Cancer - Living on the Edge (of the Cell)." *Current Opinion in Cell Biology* 39: 69–76.
- Hamilton, W, and S Cullen. 1953. "Effect of Levallorphan Tartrate upon Opiate Induced Respiratory Depression."
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer Review." 100: 57–70.
- . 2011. "Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation." *Cell* 144(5): 646–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hariri, Mehrdad et al. 2000. "Biogenesis of Multilamellar Bodies via Autophagy." *Molecular Biology of the Cell* 11(January): 255–68.
- Hay, Nissim. 2016. "Reprogramming Glucose Metabolism in Cancer: Can It Be Exploited for Cancer Therapy? Nissim." *Nature Reviews Cancer* 16(10): 635–49.
- Hayashi, Teruo et al. 2011. "Targeting Ligand-Operated Chaperone Sigma-1 Receptors in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15(5): 557–77.
- . 2015. "Sigma-1 Receptor: The Novel Intracellular Target of Neuropsychotherapeutic Drugs." *Journal of Pharmacological Sciences* 127(1): 2–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2014.07.001>.
- Haydu, J. Erika, and Adolfo A. Ferrando. 2013. "Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP T- ALL)." *Current Opinion in Hematology* 20(4): 9–16.
- He, Congcong, and Daniel J. Klionsky. 2009. "Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy." *Annual Review of Genetics* 43(1): 67–93.
- Heiden, Matthew G Vander et al. 2009. "Understanding the Warburg Effect : Cell Proliferation." 324(May): 1029–34.
- Hidalgo, A A, W Caetano, M Tabak, and O N Jr Oliveira. 2004. "Interaction of Two Phenothiazine Derivatives with Phospholipid Monolayers." *Biophysical chemistry* 109(1): 85–104.
- Holthuis, Joost C M, and Anant K. Menon. 2014. "Lipid Landscapes and Pipelines in Membrane Homeostasis." *Nature* 510(7503): 48–57.
- Horstmann, Martin et al. 2016. "IL-7 Receptor Mutations and Steroid Resistance in Pediatric T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Genome Sequencing Study."



- PLOS Medicine* 13(12): e1002200.
- Huang, C C et al. 1974. "Cytogenetic Study of Human Lymphoid T -Cell Lines Derived From Lymphocytic Leukemia." 53(3).
- Hucks, George, and Susan R. Rheingold. 2019. "The Journey to CAR T Cell Therapy: The Pediatric and Young Adult Experience with Relapsed or Refractory B-ALL." *Blood Cancer Journal* 9(2). <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018-0164-6>.
- Hunger, S. P. et al. 2009. "High Frequency of PTEN, PI3K, and AKT Abnormalities in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood* 114(3): 647–50.
- Intlekofer, Andrew M. et al. 2015. "Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate." *Cell Metabolism* 22(2): 304–11.
- Irwin, Mary E, Nilsa Rivera-del Valle, and Joya Chandra. 2013. "Redox Control of Leukemia : From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities Mary." *Antioxidants & Redox signaling* 18(11).
- Jaishy, Bharat, and E. Dale Abel. 2016. "Lipids, Lysosomes, and Autophagy." *Journal of Lipid Research* 57(9): 1619–35. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R067520>.
- Jakobsson, Andreas, Rolf Westerberg, and Anders Jacobsson. 2006. "Fatty Acid Elongases in Mammals: Their Regulation and Roles in Metabolism." *Progress in Lipid Research* 45(3): 237–49.
- Jordan, Mary Ann, Richard H Hirnes, and Leslie Wilson. 1985. "Comparison of the Effects of Vinblastine , Vincristine , Vindesine , and Vinepidine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation in Vitro." 45(June): 2741–47.
- Kallunki, T., O. D. Olsen, and M. Jäättelä. 2013. "Cancer-Associated Lysosomal Changes: Friends or Foes?." *Oncogene* 32(16): 1995–2004.
- Kasahara, Toshihiko et al. 2006. "Establishment of an in Vitro High-Throughput Screening Assay for Detecting Phospholipidosis-Inducing Potential." 90(1): 133–41.
- Kazmi, Faraz et al. 2013. "Lysosomal Sequestration ( Trapping ) of Lipophilic Amine ( Cationic Amphiphilic ) Drugs in Immortalized Human Hepatocytes." *Drug metabolism and disposition* 41(April): 897–905.
- Kebabian, John W, Gary L Petzold, and Paul Greengard. 1972. "Dopamine-Sensitive Adenylate Cyclase in Caudate Nucleus of Rat Brain, and Its Similarity to the 'Dopamine Receptor.'" 69(8): 2145–49.
- Kim, Sun Hee et al. 2014. "CG100649, a Novel COX-2 Inhibitor, Inhibits Colorectal Adenoma and Carcinoma Growth in Mouse Models." *Investigational New Drugs* 32(6): 1105–12.
- King, Bryan et al. 2013. "XThe Ubiquitin Ligase FBXW7 Modulates Leukemia-Initiating Cell Activity by Regulating MYC Stability." *Cell* 153(7): 1552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.041>.
- Kirkegaard, Thomas, and Marja Jäättelä. 2009. "Lysosomal Involvement in Cell Death and Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(4): 746–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.008>.
- Klionsky, Daniel J. 2007. "Autophagy: From Phenomenon to Mechanism in Less than a Decade." *Nature* 8(NoveMber).
- Knab, Lawrence M., Paul J. Grippo, and David J. Bentrem. 2014. "Involvement of Eicosanoids in the Pathogenesis of Pancreatic Cancer: The Roles of Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase." *World Journal of Gastroenterology* 20(31): 10729–39.
- Kodavanti, Urmila, and Harihara M Mehendale. 1990. "Cationic Amphiphilic Drugs

- and Phospholipid Storage Disorder \*." *Pharmacological reviews* 42: 327–54.
- Koeffler, H. Phillip, and David W. Golde. 1978. "Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Line Responsive to Colony-Stimulating Activity." *Science* 200(4346): 1153–54.
- Koizume, Shiro, and Yohei Miyagi. 2016. "Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia." *International Journal of Molecular Sciences* 17(9): 1–23.
- Kridel, Steven J., Fumiko Axelrod, Natasha Rozenkrantz, and Jeffrey W. Smith. 2004. "Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity." *Cancer Research* 64(6): 2070–75.
- Kroemer, Guido, and Marja Jäättelä. 2005. "Lysosomes and Autophagy in Cell Death Control." *Nature Reviews Cancer* 5(11): 886–97.
- Król, Sylwia Katarzyna, Michał Kiełbus, Adolfo Rivero-Müller, and Andrzej Stepulak. 2015. "Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent." *BioMed Research International* 2015: 1–11.
- Kula, Nora S, Ross J Baldessarini, and John W Keabian. 1997. "RBI-257 : A Highly Potent Dopamine D 4 Receptor-Selective Ligand." : 333–36.
- Kulkarni, Anita R et al. 2016. "HHS Public Access." 32(3): 178–82.
- Kuzu, Omer F., Mesut Toprak, M. Anwar Noory, and Gavin P. Robertson. 2017. "Effect of Lysosomotropic Molecules on Cellular Homeostasis." *Pharmacological Research* 117: 177–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.021>.
- Lapidot-Lifson, Y. et al. 1989. "Coamplification of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Genes in Blood Cells: Correlation with Various Leukemias and Abnormal Megakaryocytopoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(12): 4715–19.
- Lawrence, Rosalie E., and Roberto Zoncu. 2019. "The Lysosome as a Cellular Centre for Signalling, Metabolism and Quality Control." *Nature Cell Biology* 21(2): 133–42. <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0244-7>.
- Lazarevic-Pasti, Tamara et al. 2017. "Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs." *Current Medicinal Chemistry* 24(30): 3283–3309.
- Lennon, F.E., J; Moss, and Patrick A. Singleton. 2012. "The Mu-Opioid Receptor in Cancer Progression Is There a Direct Effect? Frances." *CLINICAL CONCEPTS AND COMMENTARY* (4).
- Li, Chenwei, C J Lee, and Diane M Simeone. 2009. "Identification of Human Pancreatic Cancer Stem Cells." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 568: 161–73.
- Li, J et al. 2016. "Abrogating Cholesterol Esteri Fi Cation Suppresses Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer." (March): 6378–88.
- Li, Ji Nong et al. 2001. "Pharmacological Inhibition of Fatty Acid Synthase Activity Produces Both Cytostatic and Cytotoxic Effects Modulated by P53." *Cancer Research* 61(4): 1493–99.
- Li, X., Y.-T. Chen, P. Hu, and W.-C. Huang. 2014. "Fatostatin Displays High Antitumor Activity in Prostate Cancer by Blocking SREBP-Regulated Metabolic Pathways and Androgen Receptor Signaling." *Molecular Cancer Therapeutics* 13(4): 855–66.
- Li, Xiangyan, Jason Boyang Wu, Leland W.K. Chung, and Wen-Chin Huang. 2015. "Anti-Cancer Efficacy of SREBP Inhibitor, Alone or in Combination with Docetaxel, in Prostate Cancer Harboring P53 Mutations." *Oncotarget* 6(38).

- Li, Yuan, Wei-xing Zong, and Wen-xing Ding. 2017. "Recycling the Danger via Lipid Droplet Biogenesis after Autophagy." 8627. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1371394>.
- Liang, Jie et al. 2013. "Sphingosine-1-Phosphate Links Persistent STAT3 Activation, Chronic Intestinal Inflammation, and Development of Colitis-Associated Cancer." *Cancer Cell* 23(1): 107–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.013>.
- Lienemann, Kai, Thomas Plötz, and Pestel Sabine. 2008. "NMR-Based Urine Analysis in Rats: Prediction of Proximal Tubule Kidney Toxicity and Phospholipidosis." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 58(1): 41–49.
- Lindqvist, L M, A K Simon, and E H Baehrecke. 2015. "Current Questions and Possible Controversies in Autophagy." *Cell Death Discovery* 1(1): 1–7. <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.36>.
- Liu, K., and M. J. Czaja. 2013. "Regulation of Lipid Stores and Metabolism by Lipophagy." *Cell Death and Differentiation* 20(1): 3–11. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.63>.
- Liu, Nanjun, Elizabeth A Tengstrand, Lisa Chourb, and Frank Y Hsieh. 2014. "Di-22 : 6-Bis ( Monoacylglycerol ) Phosphate : A Clinical Biomarker of Drug-Induced Phospholipidosis for Drug Development and Safety Assessment." *Toxicology and Applied Pharmacology* 279(3): 467–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.014>.
- Liu, P. P. et al. 2016. "Elimination of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Stromal Microenvironment by Targeting CPT with an Antiangina Drug Perhexiline." *Oncogene* 35(43): 5663–73.
- Liu, Ying et al. 2018. "The Implications of Signaling Lipids in Cancer Metastasis." *Experimental & Molecular Medicine* 50(9). <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0150-x>.
- Liu, Yu et al. 2017. "The Genomic Landscape of Pediatric and Young Adult T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia." *Nature Genetics* 49(8): 1211–18. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3909>.
- Logan, Randall, Alex C Kong, Erick Axcell, and Jeffrey P Krise. 2014. "Amine-Containing Molecules and the Induction of an Expanded Lysosomal Volume Phenotype: A Structure – Activity Relationship Study." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103(5): 1572–80. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23949>.
- Lonetti, A. et al. 2014. "Activity of the Pan-Class I Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor NVP-BKM120 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Leukemia* 28(6): 1196–1206. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.369>.
- Long, Jia et al. 2018. "Lipid Metabolism and Carcinogenesis, Cancer Development." *American journal of cancer research* 8(5): 778–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29888102><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5992506>.
- Lowe, Robert et al. 2012. "Predicting the Mechanism of Phospholipidosis." *Journal of Cheminformatics* 4(1): 1–9.
- Lu, Yiling et al. 2006. "Validation of an Anti-Sphingosine-1-Phosphate Antibody as a Potential Therapeutic in Reducing Growth, Invasion, and Angiogenesis in Multiple Tumor Lineages." *Cancer Cell* 9(3): 225–38.
- Lullmann-Rauch, R. 1974. "Lipidosis-like Ultrastructural Alterations in Rat Lymph Nodes after Treatment with Tricyclic Antidepressants or Neuroleptics."

- Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 286(2): 165–79.
- Lullmann, H, R Lullmann-Rauch, and O Wassermann. 1975. “Drug-Induced Phospholipidoses. II. Tissue Distribution of the Amphiphilic Drug Chlorphentermine.” *CRC critical reviews in toxicology* 4(2): 185–218.
- Ma, Wenxue et al. 2012. “Notch1 Signaling Promotes Human T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Initiating Cell Regeneration in Supportive Niches.” *PLoS ONE* 7(6).
- Magtanong, L, P J Ko, and S J Dixon. 2016. “Emerging Roles for Lipids in Non-Apoptotic Cell Death.” 24: 1099–1109.
- Maheswari, K Uma. 2001. “Lipid Bilayer–Methotrexate Interactions: A Basis for Methotrexate Neurotoxicity.” *Current Science* 81(5): 571–74. <http://www.jstor.org/stable/24105893>.
- Martelli, Alberto Maria et al. 2015. “PI3K Pan-Inhibition Impairs More Efficiently Proliferation and Survival of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines When Compared to Isoform-Selective PI3K Inhibitors.” *Oncotarget* 6(12).
- Mason, Robert J, and Ronald G Crystal. 1973. “Pulmonary Cell Biology.”
- Matsumoto, Rae R. et al. 1995. “Characterization of Two Novel  $\sigma$  Receptor Ligands: Antidystonic Effects in Rats Suggest  $\sigma$  Receptor Antagonism.” *European Journal of Pharmacology* 280(3): 301–10.
- Matsuzawa, Yuji, and Karl Y Hostetler. 1980. “Studies on Drug-Induced Lipidosis: Subcellular Localization of Phospholipid and Cholesterol in the Liver of Rats Treated with Chloroquine or 4,4'-Bis (Diethylaminoethoxy)-Diethyldiphenylethane.” *Journal of Lipid Research* 21(2): 202–14. <http://www.jlr.org/cgi/content/abstract/21/2/202>.
- Maude, Shannon L. et al. 2015. “Efficacy of JAK/STAT Pathway Inhibition in Murine Xenograft Models of Early T-Cell Precursor (ETP) Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Blood* 125(11): 1759–67.
- Maurice, Tangui, and Tsung Ping Su. 2009. “The Pharmacology of Sigma-1 Receptors.” *Pharmacology and Therapeutics* 124(2): 195–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.001>.
- May, G L et al. 1988. “Plasma Membrane Lipid Composition of Vinblastine Sensitive and Resistant Human Leukaemic Lymphoblasts.” *International journal of cancer* 42(5): 728–33.
- Mazzucchelli, Renata, and Scott K. Durum. 2007. “Interleukin-7 Receptor Expression: Intelligent Design.” *Nature Reviews Immunology* 7(2): 144–54.
- Meads, Mark B, Lori A Hazlehurst, and William S Dalton. 2008. “The Bone Marrow Microenvironment as a Tumor Sanctuary and Contributor to Drug Resistance.” *Clinical Cancer Research* 14(9): 2519–26.
- Medes, G, A Thomas, and S Weinhouse. 1953. “Metabolism of Neoplastic Tissue. IV. A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro.” *Cancer research* 13(1): 27–29.
- Medghalchi, S. M. et al. 2007. “Selective Inhibition of Fatty Acid Synthase for Lung Cancer Treatment.” *Clinical Cancer Research* 13(23): 7139–46.
- Van Meer, Gerrit, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. 2008a. “Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(2): 112–24.
- . 2008b. “Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(2): 112–24.
- Menendez, Javier A, and Ruth Lupu. 2007. “Fatty Acid Synthase and the Lipogenic



- Phenotype in Cancer Pathogenesis." *Nature Reviews Cancer* 7(10): 763–77.
- Merchant, K et al. 1996. "Pharmacological Characterization Oh U-101387, a Dopamine D4 Receptor Selective Antagonist." : 1392–1403.
- Migita, T. et al. 2008. "ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancer Research* 68(20): 8547–54.
- Mihaylova, Maria M., and Reuben J. Shaw. 2011. "The AMPK Signalling Pathway Coordinates Cell Growth, Autophagy and Metabolism." *Nature Cell Biology* 13(9): 1016–23. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2329>.
- Miller, Jacques F.A.P. 2007. "The Discovery of Thymus Function." *Immunology*: 75–84.
- Minocha, A, and H Long. 1984. "Inhibition of the DNA Catenation Activity of Type II Topoisomerase by VP16-213 and VM26." (1).
- Mo, Qianxing et al. 2014. "Blocking PGE2-Induced Tumour Repopulation Abrogates Bladder Cancer Chemoresistance." *Nature* 517(7533): 209–13. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14034>.
- Modica-Napolitano, Josephine S., and Volkmar Weissig. 2015. "Treatment Strategies That Enhance the Efficacy and Selectivity of Mitochondria-Targeted Anticancer Agents." *International Journal of Molecular Sciences* 16(8): 17394–421.
- Mortensen, Monika, Alexander Scarth Watson, and Anna Katharina Simon. 2011. "Of Hematopoietic Stem Cell Function and Dysregulated Myeloid Proliferation." *Autophagy* (September): 1069–70.
- Muehlbacher, Markus, Philipp Tripal, Florian Roas, and Johannes Kornhuber. 2012. "Identification of Drugs Inducing Phospholipidosis by Novel in Vitro Data." : 1925–34.
- Mulcahy Levy, Jean M; C.G. Towers; 2017. "Targeting Autophagy in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 17: 529–42. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.53>.
- Nelson, Colleen C. et al. 2015. "The Fatty Acid Synthase Inhibitor Triclosan: Repurposing an Anti-Microbial Agent for Targeting Prostate Cancer." *Oncotarget* 5(19).
- Nelson, David L, and Michael M Cox. 2009. *Principios de Bioquímica. Quinta Edición*. New York.
- Neri, L. M. et al. 2014. "Targeting the PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathway in B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Potential." *Leukemia* 28(4): 739–48. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.226>.
- Neuberg, D. S. et al. 2009. "Interconnecting Molecular Pathways in the Pathogenesis and Drug Sensitivity of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood* 115(9): 1735–45.
- Neufeld, Thomas P. 2010. "TOR-Dependent Control of Autophagy: Biting the Hand That Feeds." *Current Opinion in Cell Biology* 22(2): 157–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.005>.
- Nguyen, Truc B., and James A. Olzmann. 2017. "Lipid Droplets and Lipotoxicity during Autophagy." *Autophagy* 13(11): 2002–3. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1359451>.
- Nguyen, Truc B et al. 2017. "DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation- Induced Autophagy Article DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy." *Developmental Cell* 42(1): 9–21.e5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.06.003>.
- Nickels, Joseph T. 2018. "New Links between Lipid Accumulation and Cancer

- Progression." 1: 6635–36.
- Nieman, Kristin M. et al. 2011. "Adipocytes Promote Ovarian Cancer Metastasis and Provide Energy for Rapid Tumor Growth." *Nature Medicine* 17(11): 1498–1503.
- Niemann, Bernd, and Susanne Rohrbach. 2016. *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism Metabolically Relevant Cell Biology – Role of Intracellular Organelles for Cardiac*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5/00003-0>.
- Nishizawa, Satoru et al. 2017. "In Vitro and in Vivo Antitumor Activities of T-3764518 , a Novel and Orally Available Small Molecule Stearoyl-CoA Desaturase 1 Inhibitor." *European Journal of Pharmacology* 807(April): 21–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.064>.
- Nomura, Daniel K et al. 2010. "Monoacylglycerol Lipase Regulates a Fatty Acid Network That Promotes Cancer Pathogenesis." *Cell* 140(1): 49–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.027>.
- Nonoyama, Takashi, and Ryo Fukuda. 2008. "Drug-Induced Phospholipidosis — Pathological Aspects and Its Prediction." *Journal of Toxicology Pathology* 21: 9–24.
- Noto, A et al. 2013. "Stearoyl-CoA Desaturase-1 Is a Key Factor for Lung Cancer-Initiating Cells." 4(12): e947-11. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.444>.
- Novikoff, Alex B. 1957. "A Transplantable Rat Liver Tumor Induced By." 4(1).
- O'Brien, Catherine A, Aaron Pollett, Steven Gallinger, and John E Dick. 2007. "A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice." *Nature* 445(7123): 106–10.
- Ogretmen, Besim, and Yusuf A Hannun. 2004. "Biologically Active Sphingolipids in Cancer Pathogenesis and Treatment." *Nature Reviews Cancer* 4(August): 604–16.
- Okuyama, Shigeru et al. 1993. "NE-100, a Novel Sigma Receptor Ligand: In Vivo Test." 53: 285–90.
- Oliveira, Mariana L. et al. 2017. "From the Outside, from within: Biological and Therapeutic Relevance of Signal Transduction in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cellular Signalling* 38(June): 10–25.
- Omabe, Maxwell, Martin Ezeani, and Kenneth Nwobini Omabe. 2015. "Lipid Metabolism and Cancer Progression: The Missing Target in Metastatic Cancer Treatment." *Journal of Applied Biomedicine* 13(1): 47–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2014.09.004>.
- Ono, Koh, Sung O Kim, and Jiahuai Han. 2003. "Susceptibility of Lysosomes to Rupture Is a Determinant for Plasma Membrane Disruption in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Cell Death." *Molecular and cellular biology* 23(2): 665–76.
- Ostenfeld, Marie Stampe et al. 2008. "Anti-Cancer Agent Siramesine Is a Lysosomotropic Detergent That Induces Cytoprotective Autophagosome Accumulation." *Autophagy* 4(4): 487–99.
- Paganin, M., and A Ferrando. 2011. "Molecular Pathogenesis and Targeted Therapies for NOTCH1- Induced T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood Reviews* 25(2): 83–90.
- Palomero, Teresa, and Adolfo Ferrando. 2009. "Therapeutic Targeting of NOTCH1 Signaling in T-ALL Teresa." *Clin Lymphoma Myeloma* 9(Suppl 3).
- Pathak, Priyanka, Rosemary Hess, and Mark A Weiss. 2014. "Liposomal Vincristine for Relapsed or Refractory Ph-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia : A

- Review of Literature." *Therapeutic Advances in Hematology* 5: 18–24.
- Pavlova, Natalya N., and Craig B. Thompson. 2016. "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism." *Cell Metabolism* 23(1): 27–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- Peetla, C, and V Labhassetwar. 2009. "Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery." 6(5): 1264–76.
- Pehlivan, Katherine C., Brynn B. Duncan, and Daniel W. Lee. 2018. "CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease." *Current Hematologic Malignancy Reports* 13(5): 396–406.
- Peng, Qiaohua et al. 2017. "Autophagy Maintains the Stemness of Ovarian Cancer Stem Cells by FOXA2." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 36(1): 1–12.
- Perry, Seth W et al. 2011. "Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide." *BioTechniques* 50(2): 98–115.
- Petan, Toni, Eva Jarc, and Maida Jusović. 2018. "Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World." *Molecules*.
- Petersen, Nikolaj H.T. et al. 2013. "Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase." *Cancer Cell* 24(3): 379–93.
- Phan, Liem Minh, Sai-ching Jim Yeung, and Mong-hong Lee. 2014. "Cancer Metabolic Reprogramming: Importance, Main Features, and Potentials for Precise Targeted Anti-Cancer Therapies Glycolysis."
- Piao, Shengfu, and Ravi K. Amaravadi. 2016. "Targeting the Lysosome in Cancer." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1371(1): 45–54.
- Piccirillo, S G M et al. 2006. "Bone Morphogenetic Proteins Inhibit the Tumorigenic Potential of Human Brain Tumour-Initiating Cells." *Nature* 444(7120): 761–65.
- Piccotti, Joseph R et al. 2005. "Induction of Apoptosis by Cationic Amphiphilic Drugs Amiodarone and Imipramine." *Drug and Chemical Toxicology* 28(1): 117–33.
- Pierro, Joanna, Laura E Hogan, Teena Bhatla, and William L Carroll. 2017. "New Targeted Therapies for Relapsed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia." *Expert Review of Anticancer Therapy* 17(8): 725–36.
- Pizer, Ellen S., Fawn D. Wood, et al. 1996. "Inhibition of Fatty Acid Synthesis Delays Disease Progression in a Xenograft Model of Ovarian Cancer." *Cancer Research* 56(6): 1189–93.
- Pizer, Ellen S. et al. 2000. "Malonyl-Coenzyme-A Is a Potential Mediator of Cytotoxicity Induced by Fatty-Acid Synthase Inhibition in Human Breast Cancer Cells and Xenografts." *Cancer Research* 60(2): 213–18.
- Pizer, Ellen S, Christian Jackisch, et al. 1996. "Advances in Brief Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Programmed Breast Cancer Cells1 Cell Death in Human." *Cancer* (16): 2745–47.
- Ploemen, Jan-Peter H.T.M. et al. 2004. "Use of Physicochemical Calculation of PKa and CLogP to Predict Phospholipidosis-Inducing Potential." *Experimental and Toxicologic Pathology* 55(5): 347–55.
- Porta, Camillo, Chiara Paglino, and Alessandra Mosca. 2014. "Targeting PI3K/Akt/MTOR Signaling in Cancer." *Frontiers in Oncology* 4(April): 1–11.
- Prasetyanti, Pramudita R, and Jan Paul Medema. 2017. "Intra-Tumor Heterogeneity from a Cancer Stem Cell Perspective." *Molecular Cancer* 16(1): 1–9.

- Preetha, A, N Huilgol, and R Banerjee. 2006. "Comparison of Paclitaxel Penetration in Normal and Cancerous Cervical Model Monolayer Membranes." *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 53(2): 179–86.
- . 2007. "Effect of Fluidizing Agents on Paclitaxel Penetration in Cervical Cancerous Monolayer Membranes." *The Journal of membrane biology* 219(1–3): 83–91.
- Qiu, Bo, and MC Simon. 2016. "BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry Bo." 46(5): 1247–62.
- Qu, Q et al. 2016. "Fatty Acid Oxidation and Carnitine Palmitoyltransferase I: Emerging Therapeutic Targets in Cancer." : 1–9.
- Qu, Xueping et al. 2003. "Promotion of Tumorigenesis by Heterozygous Disruption of the Beclin 1 Autophagy Gene Find the Latest Version: Promotion of Tumorigenesis by Heterozygous Disruption of the Beclin 1 Autophagy Gene." *Journal of clinical Investigation* 112(12): 1809–20.
- Rambold, Angelika S, Sarah Cohen, and Jennifer Lippincott-schwartz. 2016. "Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy and Mitochondrial Fusion Dynamics." 32(6): 678–92.
- Reasor, Mark J, Kenneth L Hastings, and Roger G Ulrich. 2006. "Drug-Induced Phospholipidosis: Issues and Future Directions." *Expert Opinion on Drug Safety* 5(4): 567–83.
- Ribera, J-M. 2004. "Advances in Acute Lymphoblastic Leukemia." *Clinical Laboratory Science* 17(4): 235–45.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15559730](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15559730).
- Rodgers, Trudy, and Malcolm Rowland. 2006. "Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling 2 : Predicting the Tissue Distribution of Acids , Very Weak Bases , Neutrals and Zwitterions." 95(6): 1238–57.
- Rodríguez-enríquez, Sara et al. 2015. "Mitochondrial Free Fatty Acid Beta-Oxidation Supports Oxidative Phosphorylation and Proliferation in Cancer Cells." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 65(1): 209–21.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.06.010>.
- Roecklein, B A, and B Torok-Storb. 1995. "Functionally Distinct Human Marrow Stromal Cell Lines Immortalized by Transduction with the Human Papilloma Virus E6/E7 Genes." *Blood* 85(4): 997–1005.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7849321>.
- Roemeling, Christina A Von et al. 2013. "Stearoyl-CoA Desaturase 1 Is a Novel Molecular Therapeutic Target for Clear Cell Renal Cell Carcinoma." 19(9): 2368–81.
- Röhrig, Florian, and Almut Schulze. 2016. "The Multifaceted Roles of Fatty Acid Synthesis in Cancer." *Nature Publishing Group* 16(11): 732–49.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.89>.
- Romero, Iris L et al. 2015. "Molecular Pathways : Traf Fi Cking of Metabolic Resources in the Tumor Microenvironment." 21(5): 680–87.
- Roney, S.I, and S Park. 2018. "Antipsychotic Dopamine Receptor Antagonists , Cancer , and Cancer Stem Cells." *Archives of Pharmacal Research* 41(4): 384–408.  
<https://doi.org/10.1007/s12272-018-1017-3>.
- Roti, Giovanni, and Kimberly Stegmaier. 2014. "New Approaches to Target T-ALL." 4(July): 1–9.
- Rowley, Michael et al. 1996. "5-(4-Chlorophenyl)-4-Methyl-3-(1-(2-



- Phenylethyl)Piperidin-4-Yl)Isoxazole: A Potent, Selective Antagonist at Human Cloned Dopamine D4 Receptors." (Scheme 2): 1943–45.
- Roy, Debarshi et al. 2014. "Loss of HSulf-1 Promotes Altered Lipid Metabolism in Ovarian Cancer." : 1–17.
- Sabharwal, Simran S, and Paul T Schumacker. 2014. "Mitochondrial ROS in Cancer : Initiators, Amplifiers or an Achilles'heel?" *Nature Publishing Group* 14(11): 709–21. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3803>.
- Sachlos, Eleftherios et al. 2012. "Identification of Drugs Including a Dopamine Receptor Antagonist That Selectively Target Cancer Stem Cells." *Cell* 149(6): 1284–97.
- Saha, Sarbari, Debasna P. Panigrahi, Shankargouda Patil, and Sujit K. Bhutia. 2018. "Autophagy in Health and Disease: A Comprehensive Review." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 104(February): 485–95.
- Samudio, Ismael, Heinrich; Taegtmeier, and Michael; Andreeff. 2010. "Pharmacologic Inhibition of Fatty Acid Oxidation Sensitizes Human Leukemia Cells to Apoptosis Induction Ismael." *Journal of Clinical Investigation* 120(1): 142–56.
- Sanda, Takaomi et al. 2012. "Gene Expression Signatures Define Novel Oncogenic Pathways in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Cell* 9(2): 75–87.
- Santambrogio, Laura, and Ana Maria Cuervo. 2011. "Chasing the Elusive Mammalian Microautophagy." *Autophagy* 7(6): 652–54.
- Santander Ballestín, Sonia et al. 2012. "Cyclooxygenase Inhibitors Decrease the Growth and Induce Regression of Human Esophageal Adenocarcinoma Xenografts in Nude Mice." *International Journal of Oncology* 40(2): 527–34.
- Santos, Claudio R, and Almut Schulze. 2012. "Lipid Metabolism in Cancer." 279: 2610–23.
- Sarry, Jean-emmanuel et al. 2011. "Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells Are Rare and Heterogeneous When Assayed in NOD / SCID / IL2R g c-Deficient Mice Find the Latest Version : Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells Are Rare and Heterogeneous When Assayed in NOD / SCID / IL2R." 121(1).
- Sawada, Hiroshi, Kenji Takami, and Satoru Asahi. 2005. "A Toxicogenomic Approach to Drug-Induced Phospholipidosis: Analysis of Its Induction Mechanism and Establishment of a Novel in Vitro Screening System." 83(2): 282–92.
- Schaffer, Jean E. 2016. "Lipotoxicity: Many Roads to Cell Dysfunction and Cell Death : Introduction to a Thematic Review Series." 57: 1327–28.
- Scholnik-Cabrera, Alejandro et al. 2018. "Orlistat as a FASN Inhibitor and Multitargeted Agent for Cancer Therapy." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 27(5): 475–89. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1471132>.
- Schlaepfer, Isabel R et al. 2014. "Lipid Catabolism via CPT1 as a Therapeutic Target for Prostate Cancer." (12): 2361–72.
- Schmidt, William K, and D Ph. 2001. "Alvimopan ( ADL 8-2698 ) Is a Novel Peripheral Opioid Antagonist." 182(November): 27–38.
- Schoepp, D, J David, and Eli Lilly. 1990. "Pharmacological Characterization of LY233053 : A Structurally Novel Tetrazole-Su Bstituted Corn Petite N-Methyl . -D-Aspartic Acid Antagonist with a Short Duration of Action."
- Schulze, Heike, Thomas Kolter, and Konrad Sandhoff. 2008. "Principles of Lysosomal Membrane Degradation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(4): 674–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.020>.
- Scuntaro, Isabel, Urs Kientsch, Ulrich N. Wiesmann, and Ulrich E. Honegger. 1996.

- "Inhibition by Vitamin E of Drug Accumulation and of Phospholipidosis Induced by Desipramine and Other Cationic Amphiphilic Drugs in Human Cultured Cells." *British Journal of Pharmacology* 119(5): 829–34.
- Seglen, O, and P Gordon. 1982. "3-Methyladenine: Specific Inhibitor of Autophagic/Lysosomal Protein Degradation in Isolated Rat Hepatocytes." 79(March): 1889–92.
- Shen, Shensi, Oliver Kepp, and Guido Kroemer. 2012. "The End of Autophagic Cell Death?" *Autophagy* 8(1): 1–3.
- Shukla, Nidhi. 2017. "Expression of Alpha - Methylacyl - Coenzyme A Racemase (AMACR) in Colorectal Neoplasia." *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. [http://jcd.r.net/article\\_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2017&volume=11&issue=4&page=EC35&issn=0973-709x&id=9727](http://jcd.r.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2017&volume=11&issue=4&page=EC35&issn=0973-709x&id=9727).
- Sibley, D, E Leff, and I Creese. 1982. "Interactions of Novel Dopaminergic Ligands with D-1 and D-2 Dopamine Receptors." 31(c): 637–45.
- Singh, Rajat et al. 2009. "Autophagy Regulates Lipid Metabolism." *Nature* 458(7242): 1131–35. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07976>.
- Singh, Shikha Satendra et al. 2018. "Dual Role of Autophagy in Hallmarks of Cancer." *Oncogene* 37(9): 1142–58. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0046-6>.
- Singleton, Patrick A. et al. 2015. "The Mu Opioid Receptor: A New Target for Cancer Therapy?" *Cancer* 121(16): 2681–88.
- Snider, Ashley J et al. 2017. "Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets Article Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets." *Cell Metabolism* 25(3): 686–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.010>.
- Song, Seon Beom et al. 2017. "Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy." *Molecules and Cells* 40(7): 503–14.
- Soreq, Hermona, and Shlomo Seidman. 2001. "Acetylcholinesterase — New Roles for an Old Actor." 2(April): 294–302.
- Spence, AM, and LJ Rubinstein. 1975. "Cerebellar Capillary Hemangioblastoma: Its Histogenesis Studied by Organ Culture and Electron Microscopy." *Cancer*: 326–41.
- Sperling, L. E. et al. 2008. "Characterisation of Cholinesterase Expression during Murine Embryonic Stem Cell Differentiation." *Chemico-Biological Interactions* 175(1–3): 156–60.
- Spetea, Mariana; MF; Asim, G; Wolber, and H; Schmidhammer. 2014. "The  $\mu$  Opioid Receptor and Ligands Acting at the  $\mu$  Opioid Receptor, as Therapeutics and Potential Therapeutics." *Biochemistry* 61(4): 1757–68. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi5006915%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460711>.
- Spiro, Robert G. 2002. "Protein Glycosylation: Nature, Distribution, Enzymatic Formation, and Disease Implications of Glycopeptide Bonds." 12(4).
- Spruce, Barbara A. et al. 2004. "Small Molecule Antagonists of the  $\sigma$ -1 Receptor Cause Selective Release of the Death Program in Tumor and Self-Reliant Cells and Inhibit Tumor Growth in Vitro and in Vivo." *Cancer Research* 64(14): 4875–86.
- Stepulak, Andrzej, Radoslaw Rola, Krzysztof Polberg, and Chrysanthy Ikonomidou. 2014. "Glutamate and Its Receptors in Cancer." *Journal of Neural Transmission*

- 121(8): 933–44.
- Steube, Klaus G. et al. 1997. “A Model System in Haematology and Immunology: The Human Monocytic Cell Line MONO-MAC-1.” *Leukemia Research* 21(4): 327–35.
- Stranks, Amanda J. et al. 2011. “The Autophagy Protein Atg7 Is Essential for Hematopoietic Stem Cell Maintenance.” *The Journal of Experimental Medicine* 208(3): 455–67.
- Su, Tsung-Ping et al. 1991. “Sigma Compounds Derived from Phencyclidine : Of PRE-084, a New, Selective Sigma Ligand.” : 543–50.
- Sukhai, Mahadeo A et al. 2013. “Lysosomal Disruption Preferentially Targets Acute Myeloid Leukemia Cells and Progenitors.” *The Journal of clinical investigation* 123(1): 315–28.
- Suzuki, Takashi et al. 2002. “The First Molecular Evidence That Autophagy Relates Rimmed Vacuole Formation in Chloroquine Myopathy.” *Journal of Biochemistry* 131(5): 647–51.
- Svensson, Kjell, Anette M Johansson, Tor Magnusson, and C Arvid. 1986. “(+)-AJ 76 and ( + )-UH 232: Central Stimulants Acting as Preferential Dopamine Autoreceptor Antagonists Kjell.” : 234–45.
- Swinnen, Johannes V, Koen Brusselmans, and Guido Verhoeven. 2006. “Increased Lipogenesis in Cancer Cells : New Players , Novel Targets.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*: 358–65.
- Takahashi, T et al. 2015. “Inhibition of EP2/EP4 Signaling Abrogates IGF-1R-Mediated Cancer Cell Growth: Involvement of Protein Kinase C-Theta Activation.” *Oncotarget* 6(7): 4829–44.
- Terai, M et al. 1983. “SELECTIVE BINDING OF YM-09151-2 , A NEW POTENT RECEPTORS NEUROLEPTIC , TO D2-DOPAMINERGIC RECEPTORS.” 755: 749–55.
- Terwilliger, T. 2017. “Acute Lymphoblastic Leukemia : A Comprehensive Review and 2017 Update.” (April).
- Than, Nandor G et al. 2003. “Lipid Droplet and Milk Lipid Globule Membrane Associated Placental Protein 17b ( PP17b ) Is Involved in Apoptotic and Differentiation Processes of Human Epithelial Cervical Carcinoma Cells.” 1188: 1176–88.
- Thiam, Abdou Rachid, Robert V. Farese, and Tobias C. Walther. 2013. “The Biophysics and Cell Biology of Lipid Droplets.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(12): 775–86. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3699>.
- Thiele, Christoph, and Johanna Spandl. 2008. “Cell Biology of Lipid Droplets.” : 378–85.
- Thompson, Craig B. et al. 2005. “ATP Citrate Lyase Inhibition Can Suppress Tumor Cell Growth.” *Cancer Cell* 8(4): 311–21.
- Timoshenko, A. V., C. Chakraborty, G. F. Wagner, and P. K. Lala. 2006. “COX-2-Mediated Stimulation of the Lymphangiogenic Factor VEGF-C in Human Breast Cancer.” *British Journal of Cancer* 94(8): 1154–63.
- Tirinato, L. et al. 2017. “An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells.” *Stem Cells International* 2017.
- Tooze, Sharon A., and Tamotsu Yoshimori. 2010. “The Origin of the Autophagosomal Membrane.” *Nature Cell Biology* 12(9): 831–35. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-831>.
- Trabucchi, M, R Longoni, and P Fresia. 1975. “Sulpiride: A Study of the Effects on Dopamine Receptors in Rat Neostriatum and Limbic Forebrain.” : 1551–56.

- Transition, Epithelial-mesenchymal et al. 2014. "Loss of Abhd5 Promotes Colorectal Tumor Development and Progression by Inducing Aerobic Article Loss of Abhd5 Promotes Colorectal Tumor Development and Progression by Inducing Aerobic Glycolysis and Epithelial-Mesenchymal Transition." *CellReports* 9(5): 1798–1811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.016>.
- Tremblay, S. 2010. "Early T Cell Differentiation: Lessons from T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia I. Introduction." 92(10): 121–56.
- Tsuchiya, S et al. 1982. "Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester." *Cancer research* 42(4): 1530–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6949641>.
- Vadillo, Eduardo, Elisa Dorantes-acosta, Rosana Pelayo, and Michael Schnoor. 2018. "Blood Reviews T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia ( T-ALL ): New Insights into the Cellular Origins and in Fi Ltration Mechanisms Common and Unique among Hematologic Malignancies." *Blood Reviews* 32(1): 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.006>.
- Vadlamudi, Aravinda et al. 2007. "Fatty Acid Synthase Inhibition Activates AMP-Activated Protein Kinase in SKOV3 Human Ovarian Cancer Cells." *Cancer Research* 67(7): 2964–71.
- Vegliante, Rolando, Luca Di Leo, Fabio Ciccarone, and Maria Rosa Ciriolo. 2018. "Hints on ATGL Implications in Cancer : Beyond Bioenergetic Clues." *Cell Death and Disease*. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0345-z>.
- Veiga, J Pedro et al. 2006. "Leukemia-Stimulated Bone Marrow Endothelium Promotes Leukemia Cell Survival." *Experimental Hematology* 34(5): 610–21.
- Vejux, A, L Malvitte, and G Lizard. 2008. "Side Effects of Oxysterols: Cytotoxicity, Oxidation, Inflammation, and Phospholipidosis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41(7): 545–56.
- Vilas-Zornoza, A et al. 2012. "Preclinical Activity of LBH589 Alone or in Combination with Chemotherapy in a Xenogeneic Mouse Model of Human Acute Lymphoblastic Leukemia." (February): 1517–26.
- Vilimas, Tomas et al. 2007. "Targeting the NF-KB Signaling Pathway in Notch1-Induced T-Cell Leukemia." *Nature Medicine* 13(1): 70–77.
- Visvader, Jane E. 2011. "Cells of Origin in Cancer." *Nature* 469(7330): 314–22.
- Wakamiya, Tomihiro et al. 2014. "Elevated Expression of Fatty Acid Synthase and Nuclear Localization of Carnitine Palmitoyltransferase 1C Are Common among Human Gliomas." (May): 465–74.
- Wang, Chun et al. 2009. "Acetyl-CoA Carboxylase- $\alpha$  Inhibitor TOFA Induces Human Cancer Cell Apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385(3): 302–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.045>.
- Wang, Dingzhi et al. 2015. "Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice." *Gastroenterology* 149(7): 1884–1895.e4. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.064>.
- Wang, Huan, Michael V. Airola, and Karen Reue. 2017. "How Lipid Droplets 'TAG' along: Glycerolipid Synthetic Enzymes and Lipid Storage." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(10): 1131–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.010>.
- Wang, Xu et al. 2019. "The Prospective Value of Dopamine Receptors on Bio-Behavior of Tumor." *Journal of Cancer* 10: 1622–32.
- Wang, Yuan Yuan et al. 2017. "Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells Find the Latest



- Version : Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells." 2(4).
- Warburg, O., F; Wind, and E; Negelein. 1927. "The Metabolism of Tumors in the Body." *Journal of the American Chemical Society*.
- Ward, Carl et al. 2016. "Autophagy, Lipophagy and Lysosomal Lipid Storage Disorders." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861(4): 269–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.006>.
- Weiss, A, R L Wiskocil, and J D Stobo. 1984. "The Role of T3 Surface Molecules in the Activation of Human T Cells: A Two-Stimulus Requirement for IL 2 Production Reflects Events Occurring at a Pre-Translational Level." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133(1): 123–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327821>.
- Weissenrieder, Jillian S et al. 2019. "Cancer and the Dopamine D 2 Receptor : A Pharmacological Perspective."
- Wellen, Kathryn E. et al. 2010. "The Hexosamine Biosynthetic Pathway Couples Growth Factor-Induced Glutamine Uptake to Glucose Metabolism." *Genes and Development* 24(24): 2784–99.
- Welte, Michael A, and Alex P Gould. 2017. "Lipid Droplet Functions beyond Energy Storage." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862(10): 1260–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>.
- Weng, Andrew P et al. 2004. "Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Science (New York, N.Y.)* 306(5694): 269–71.
- White, E., J. M. Mehnert, and C. S. Chan. 2015. "Autophagy, Metabolism, and Cancer." *Clinical Cancer Research* 21(22): 5037–46. <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-0490>.
- White, Eileen. 2012. "Deconvoluting the Context-Dependent Role for Autophagy in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 12(6): 401–10. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3262>.
- Wilde, Lindsay, Katherina Tanson, Joseph Curry, and Ubaldo Martinez-Outschoorn. 2018. "Autophagy in Cancer: A Complex Relationship." *Biochemical Journal* 475(11): 1939–54.
- Williams, Juliet. 2018. "Using PDX for Preclinical Cancer Drug Discovery: The Evolving Field." *Journal of Clinical Medicine* 7(3): 41.
- Witkiewicz, Agnieszka K. et al. 2005. "α-Methylacyl-CoA Racemase Protein Expression Is Associated with the Degree of Differentiation in Breast Cancer Using Quantitative Image Analysis." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 14(6): 1418–23.
- Xia, Zhenlei et al. 2000. "Antidepressant-Induced Lipidosis with Special Reference to Tricyclic Compounds." *Progress in Neurobiology* 60(6): 501–12.
- Xu, Haoxing, and Dejian Ren. 2015. "Lysosomal Physiology." *Annual Review of Physiology* 77(1): 57–80.
- Yang, Chung S, Nanjoo Suh, and Ah-Ng Tony Kong. 2012. "Does Vitamin E Prevent or Promote Cancer?" *Cancer Prevention Research* 5(5): 701–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502042/pdf/nihms370343.pdf>.
- Yang, Nicole J, and Marlon J Hinner. 2015. "Getting across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1266: 29–53.
- Yang, Yi et al. 2017. "Autophagy Regulates the Stemness of Cervical Cancer Stem

- Cells." *Biologics: Targets and Therapy* 11: 71–79.
- Yi, Mei et al. 2018. "Emerging Role of Lipid Metabolism Alterations in Cancer Stem Cells." : 1–18.
- Yu, Li, Yang Chen, and Sharon A. Tooze. 2018. "Autophagy Pathway: Cellular and Molecular Mechanisms." *Autophagy* 14(2): 207–15.
- Yue, Zhenyu; Jin, Shengkan; Yang, Chingwen; J. Levine, Arnold; Heintz. 2003. "Beclin 1, an Autophagy Gene Essential for Early Embryonic Development, Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor." *Research Disclosure* 100: 6.
- Yue, Shuhua et al. 2014. "Article Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K / AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness." *Cell Metabolism* 19(3): 393–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.019>.
- Yun, Chul Won, and Sang Hun Lee. 2018. "The Roles of Autophagy in Cancer." *International journal of molecular sciences* 19(11).
- Zagani, Rachid, Wissal El-assaad, Isabelle Gamache, and Jose G Teodoro. 2015. "Inhibition of Adipose Triglyceride Lipase ( ATGL ) by the Putative Tumor Suppressor G0S2 or a Small Molecule Inhibitor Attenuates the Growth of Cancer Cells." 6(29).
- Zaugg, Kathrin et al. 2011. "Carnitine Palmitoyltransferase 1C Promotes Cell Survival and Tumor Growth under Conditions of Metabolic Stress." : 1041–51.
- Zhang, Feng, and Guangwei Du. 2012. "Dysregulated Lipid Metabolism in Cancer." 3(8): 167–74.
- Zhang, Jinghui et al. 2012. "The Genetic Basis of Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukaemia." *Nature* 481(7380): 157–63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10725>.
- Zhang, Lan et al. 2014. "Eliminates Tumorigenic Nanog-Positive Cells : Improving the Safety of IPS Cell Transplantation to Myocardium Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase Selectively Eliminates Tumorigenic Nanog-Positive Cells Improving the Safety of IPS Cell Transplantation To ." 4101.
- Zhang, Liang et al. 2015. "Anti-S1P Antibody as a Novel Therapeutic Strategy for VEGFR TKI-Resistant Renal Cancer." *Clinical Cancer Research* 21(8): 1925–34.
- Zhao, R. et al. 2012. "Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinase 1 Promotes Breast Cancer Progression by Stimulating Angiogenesis and Lymphangiogenesis." *Cancer Research* 72(3): 726–35.
- Zhao, Xianglong et al. 2014. "A Novel Mixed Phospholipid Functionalized Monolithic Column for Early Screening of Drug Induced Phospholipidosis Risk." *Journal of Chromatography A* 1367: 99–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.048>.
- Zhitomirsky, Benny, and Yehuda G. Assaraf. 2016. "Lysosomes as Mediators of Drug Resistance in Cancer." *Drug Resistance Updates* 24: 23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.004>.
- Zhou, Qun et al. 2000. "Rapid Induction of Histone Hyperacetylation and Cellular Differentiation in Human Breast Tumor Cell Lines Following Degradation of Histone Deacetylase-1 \*." 275(45): 35256–63.
- Zhou, Weibo et al. 2003. "Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells." *Cancer Research* 63(21): 7330–37.
- Zorova, Ljubava D et al. 2018. "Mitochondrial Membrane Potential." *Analytical biochemistry* 552: 50–59.
- Zúñiga-pflücker, Juan Carlos. 2004. "T-Cell Development Made Simple." 4(January).



## **8. Annexos**



## Annex I. Taula de pacients de SMD, LMMC i LMA avaluada l'expressió receptor de dopamina

Classificació de pacients de SMD i LMMC inclosos als estudis. Classificació feta segons (Arber et al. 2019) i risc segons el sistema IPSS-R. Abreviatures: Gèn., gènere; F, femení; M, masculí; LMMC, leucèmia mielomonocítica crònica; SMD-EB1: SMD amb excés de blasts 1; SMD-EB2, SMD amb excés de blasts 2; SMD-DU, SMD amb displàsia unilínia; SMD-DM, SMD amb displàsia multilínia; SMD-DM-SA: SMD amb displàsia multilínia i sideroblasts en anell; SMD-SA: SMD amb sideroblasts en anell; SMD del (5q): SMD amb deleció 5q aïllada; IPSS-R: sistema revisat de puntuació de pronòstic (*Revised international prognostic scoring system*); MO, medul·la òssia; N/A: informació no disponible.

Codi mostra	Edat	Gèn.	Classificació segons WHO 2016	Cariotip	IPSS-R	% Blasts en SP
MDS #1	76	M	LMMC-1	46, XY[20]	N/A	1
MDS #5	83	M	SMD-EB-1	47, XY,+8[3]/46,XY[28]	Alt	7
MDS #6	46	F	SMD-DM	46, XX[20]	Baix	2
MDS #9	70	F	SMD-DM	46, XX[20]	Intermedi	4
MDS #10	74	M	SMD-EB-2	45, X,-Y,del(1)(p13p32),der(11)t(Y;11)(q11;q13)[8]/46,XY[12]	Molt alt	12
MDS #12	73	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q22q33)[15]/46,XX[5]	Baix	2
MDS #14	72	M	LMMC-0	46, XY,del(5)(q31q33)[6]	N/A	0
MDS #15	51	M	SMD-DM	N/A (normal FISH 5p15.2, 5q31, 7q31 & 20q12)	N/A	2
MDS #16	59	F	LMMC-0	46, XX[20]	N/A	2
MDS #17	79	M	LMMC-2	46, XX[20]	N/A	13
MDS #20	52	M	LMMC-1	46, XY[20]	N/A	4
MDS #23	71	F	MDS del (5q)	46 XX, -11,+mar [20]	Intermedi	3
MDS #24	29	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q12q32)[11]/46,XX[9]	-	-
MDS #26	81	F	SMD-DM	46, XX[10]	Baix	0

MDS #27	59	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q13q33)[4]/46,XX[15]	Baix	2
MDS #28	65	M	SMD-DM-SA	46, XY[20]	Molt baix	2
MDS #29	86	F	SMD-DM	47, XX, +8[10]/48,idem,+mar[2]/46,XX[7]	Alt	3
MDS #30	65	M	SMD-DM-SA	46, XY[20]	Molt baix	2
MDS #31	71	M	MDS del (5q)	46, XY,del(5)(q14q34)[8]/46,XY[22]	Baix	7
MDS #32	78	M	MDS del (5q)	46, XY,del(5)(q13q33)[12]/46,XY[8]	Molt baix	2
MDS #33	77	M	SMD-EB-2	Complex	Molt alt	>5%
MDS #34	67	M	SMD-DM	46, XY[20]	Baix	4
MDS #35	78	F	SMD-SA	46, XX[20]	Molt baix	0
MDS #36	60	M	LMMC-1	N/A	N/A	0
MDS #37	60	F	SMD-DM	46, XX[20]	Molt baix	1
MDS #38	91	M	SMD-EB-1	45, X,-Y[14]/46,XY[6]	Intermedi	7
MDS #39	70	F	LMMC-1	46, XX[20]	N/A	1
MDS #40	67	M	SMD-EB-2	43, XY,-5,der(13;14)(q10;q10),add(15)(p10),add(16)(q24),-17,add(17)(p13),-18,+mar[cp14]	Molt alt	15
MDS #41	71	M	LMMC-0	46, XX[20]	N/A	0
MDS #43	83	M	SMD-DM	46, XY[20]	Molt baix	1
MDS #49	67	F	SMD-EB1	26/08/2015: 46, XX,del(5)(q11q31)[15]	Baix	8
MDS #50	75	M	SMD-DM	47, XY,+21[5]/46,XY[15]	Baix	2,5
MDS #52	78	F	SMD-DM	46, XX,del(5)(q22q35),del(11)(q13.1q23.3)[17]/46,XX[3]	Baix	3,5
MDS #53	56	M	SMD-DM	46, XY[20]	Baix	2
MDS #57	79	M	SMD-EB-1	46, XY[21]	Intermedi	5
MDS #60	80	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q13)[11]/46,XX[9]	Baix	4
MDS #68	94	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q13q33)[9]/46,XX[24]	Molt baix	1

MDS#73	76	M	CMML-0	46, XY[20]	Molt baix	1,5
MDS #74	80	M	SMD-DM	46, XY[20]	Baix	0
MDS #76	83	F	SMD-DM	del(5q)	Baix	<5
MDS #78	73	F	SMD-DM	46, XX,add(9)(p24),16qh+c[7]/46,XX,16qh+c[7]	Baix	<2
MDS#80	67	F	LMMC-2	46, XX[20]	Intermedi	13
MDS #93	79	F	SMD-DU-SA amb trombocitòsi	N/A	Baix	1
MDS#95	66	M	LMMC-0	46, XY,t(4;16)(q21;q24)[3]/47,sl,+8[17]	N/A	0
MDS #98	63	F	MDS del (5q)	del(5q) add(7)	Baix	1
MDS#103	70	M	LMMC-1	46, XY[20]	N/A	N/A
MDS#110	80	M	LMMC-1	46, XY[20]	N/A	N/A
MDS#113	56	M	LMMC-1	47, XY,+8[14]/46,XY[3]	N/A	N/A
MDS #119	53	F	SMD-EB1	46, XX,del(5)(q14q33)[7]/46,XX [13]	Intermedi	7,8
MDS#122	N/A	F	LMMC-1	47, XX,+21[13]	N/A	N/A
MDS #131	68	F	MDS-MLD	46, XX[20]	Molt baix	0
MDS #132	72	M	MDS-MLD	46, XY[20]	Molt baix	<2
MDS #134	45	M	MDS-MLD	46, XY[20]	Baix	1
MDS #138	68	F	MDS-MLD	46, XX, del(5)(q13q33), del(11)(q13q23)	Baix	1
MDS #140	69	F	MDS-RS-SLD	(-7)	N/A	N/A
MDS #145	83	M	MLD	45, X,-Y[18]/46,XY[2]	Baix	3
MDS #149	64	F	MDS del (5q)	46, XX del(5)(q15q33)[20]	Baix	1,6
MDS #151	53	F	SMD-EB2	N/A	Alt	12
MDS #154	79	F	SMD-EB-1	46, XX[20]	Intermedi	6
MDS #161	69	M	LMMC-1	46, XY[20]	N/A	N/A
MDS #162	54	M	SMD-EB2	46, XY,t(16;17)(q24;q22)	Molt alt	12
MDS #166	73	M	MDS-MLD	46, XY [2]	Baix	2
MDS #170	58	M	MDS-SLD	46, XY,inv(2)(p23q13),del(5)(q13q32)	Baix	1
MDS #176	70	F	MDS-MLD	46, XX[20]	Molt baix	1



MDS #181	73	F	MDS-MLD	46, XX,add(9)(p24),16qh+c[7]/46,XX,16qh+c[7]	Baix	<2
MDS #186	62	M	MDS-MLD	45, X, (-Y)[10]/46,XY[1]	Molt baix	1
MDS #187	84	F	MDS-MLD	46, XX[14]	Molt baix	2,1
MDS #188	80	M	MDS-MLD	46, XY[20]	Baix	0
MDS #195	72	M	MDS-MLD	46, XY[20]	Molt baix	<2
MDS #197	N/A	Male	LMMC	N/A	N/A	N/A
MDS #210	59	F	MDS del (5q)	46, XX,del(5)(q22q31-32)[5]/46,XX[15]	Baix	2
MDS #211	75	F	SMD-DM	46, XX,-5,-14,+mar1,+mar2[16]/45,XX,del(5)(q13q33),-6[2]/46,XX[8]	Alt	1
MDS #212	66	M	LMMC-0	46, XY[20]	N/A	4
MDS #213	83	F	SMD-EB-1	del(7) (q22q31)	Molt alt	5
MDS #214	30	F	SMD-DM	46, XX[20]	Molt baix	2

## Annex II. Taula de pacients de LMA

Relació de pacients de LMA inclosos als estudis de citotoxicitat. Classificació feta segons el criteri de l'OMS del 2016. (REF) i risc segons les recomanacions de 2017 (REF). Abreviatures: Gèn: gènere; Leuc: comptatge de leucòcits ( $\times 10^9/L$ ); %BSP: percentatge de blasts en sang perifèrica; %BMO: percentatge de blasts en medul·la òssia; QR: quimiorrefractorietat; SP: sang perifèrica.

#LMA	Mostra	Gèn.	Edat	Subtipus OMS	Leuc.	%BSP	%BMO	Cariotip	Alteracions moleculars	Risc	QR
1	SP	M	62	AML amb inv(3)(q21.3q26.2); GATA2, MECOM	1.77	18	61	46,XY,inv(3)(q21q26.2)[8]/46,XY[20]	DNMT3A i IDH1	Advers	No
2	SP	M	62	AML amb mutació RUNX1	51.16	49	81	6,XY,del(7)[19]/46,XY[1]	Cap detectada	Advers	No
3	SP	F	90	LMA amb canvis en relació amb mielodisplàsia	338	92	77	42,XX,del(5)(q22q34),del(7)(q22q32),add(8)(q24),-15,-16,add(17)(p13),-18,-19,-20,-21,-22,-22,+r(?),+mar[cp18]	TP53mut	Advers	No
4	SP	M	63	LMA amb canvis en relació amb mielodisplàsia	2.69	43	30	N/A	TP53mut	Advers	Sí



### Annex III. Publicacions

1. Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Etxabe A, **Banús-Mulet A**, Nomdedeu M, Torrente MA, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM. *Repositioning of Bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia.* J Trans Med. 2016 Sep 7;14:261.
2. Etxabe A, Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, **Banús-Mulet A**, Nomdedeu M, Torrente MA, Pratcorona M, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM. *Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem-cell functionality: a promising novel therapeutic target.* Leukemia. 2017 Nov;31(11):2238-2302.
3. **Banús-Mulet A**, Etxabe A, Cornet-Masana JM, Torrente MA, Lara-Castillo MC, Palomo L, Nomdedeu M, Solé F, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM. *Serotonin receptor type B constitutes a therapeutic target for MDS and CMML.* Scientific Reports. 2018. Sep 17;8(1):13883.
4. Cornet-Masana JM, **Banús-Mulet A**, Carbó, Josep M, Torrente MA, Guijarro F, Cuesta L, Esteve J, Risueño RM. *Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukemic cells.* En revisió



## Repositioning of Bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia

Journal of Translational Medicine. 2016 Sep 7;14;261. doi: 10.1186/s12967-016-1007-5.

Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Etxabe A, Banús-Mulet A, Nomdedeu M, Torrente MA, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM.

### Abstract

**BACKGROUND:** Treatment for acute myeloid leukemia (AML) has not significantly changed in the last decades and new therapeutic approaches are needed to achieve prolonged survival rates. Leukemia stem cells (LSC) are responsible for the initiation and maintenance of AML due to their stem-cell properties. Differentiation therapies aim to abrogate the self-renewal capacity and diminish blast lifespan.

**METHODS:** An in silico screening was designed to search for FDA-approved small molecules that potentially induce differentiation of AML cells. Bromocriptine was identified and validated in an in vitro screening. Bromocriptine is an approved drug originally indicated for Parkinson's disease, acromegaly, hyperprolactinemia and galactorrhoea, and recently repositioned for diabetes mellitus.

**RESULTS:** Treatment with bromocriptine reduced cell viability of AML cells by activation of the apoptosis program and induction of myeloid differentiation. Moreover, the LSC-enriched primitive AML cell fraction was more sensitive to the presence of bromocriptine. In fact, bromocriptine decreased the clonogenic capacity of AML cells. Interestingly, a negligible effect is observed in healthy blood cells and hematopoietic stem/progenitor cells.

**CONCLUSIONS:** Our results support the use of bromocriptine as an anti-AML drug in a repositioning setting and the further clinical validation of this preclinical study.

Lara-Castillo et al. *J Transl Med* (2016) 14:261  
DOI 10.1186/s12967-016-1007-5


Journal of  
Translational Medicine

RESEARCH

Open Access



## Repositioning of bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia

María Carmen Lara-Castillo<sup>1</sup>, Josep Maria Cornet-Masana<sup>1</sup>, Amaia Etxabe<sup>1</sup>, Antònia Banús-Mulet<sup>1</sup>, Miguel Ángel Torrente<sup>1,2</sup>, Meritxell Nomdedeu<sup>1,2</sup>, Marina Díaz-Beyá<sup>1,2,3</sup>, Jordi Esteve<sup>1,2,3</sup> and Ruth M. Risueño<sup>1\*</sup> 



## **Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem cell functionality: a promising novel therapeutic target**

Leukemia. 2017 Nov;31(11):2238-2302. doi:10.1038/leu.2017.52. Epub 2017 Feb 14.

Etxabe A, Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Nomdedeu M, Torrente MA, Pratcorona M, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM

### **Abstract:**

Acute myeloid leukemia (AML) is a clinically and molecularly heterogeneous neoplasia with poor outcome, organized as a hierarchy initiated and maintained by a sub-population with differentiation and self-renewal capacities called leukemia stem cells (LSCs). Although currently used chemotherapy is capable of initially reducing the tumor burden producing a complete remission, most patients will ultimately relapse and will succumb to their disease. As such, new therapeutic strategies are needed. AML cells differentially expressed serotonin receptor type 1 (HTR1) compared with healthy blood cells and the most primitive hematopoietic fraction; in fact, HTR1B expression on AML patient samples correlated with clinical outcome. Inhibition of HTR1s activated the apoptosis program, induced differentiation and reduced the clonogenic capacity, while minimal effect was observed on healthy blood cells. In vivo regeneration capacity of primary AML samples was disrupted upon inhibition of HTR1. The self-renewal capacity remaining in AML cells upon in vivo treatment was severely reduced as demonstrated by serial transplantation. Thus, treatment with HTR1 antagonists showed antileukemia effect, especially anti-LSC activity while sparing healthy blood cells. Our results highlight the importance of HTR1 in leukemogenesis and LSC survival and identify this receptor family as a new target for therapy in AML with prognostic value.

Leukemia (2017) 31, 2288–2302  
© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved 0887-6924/17  
[www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)

### **ORIGINAL ARTICLE**

## **Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem cell functionality: a promising novel therapeutic target**

A Etxabe<sup>1</sup>, MC Lara-Castillo<sup>1</sup>, JM Cornet-Masana<sup>1</sup>, A Banús-Mulet<sup>1</sup>, M Nomdedeu<sup>1,2</sup>, MA Torrente<sup>1,2</sup>, M Pratcorona<sup>1,2</sup>, M Díaz-Beyá<sup>2,3</sup>, J Esteve<sup>1,2,3</sup> and RM Risueño<sup>1</sup>





## Serotonin receptor type B constitutes a therapeutic target for MDS and CMML

Scientific Reports. 2018 Sep;13(8)13883. doi:10.1038/s41598-018-32306-4

Banús-Mulet A, Etxabe A, Cornet-Masana JM, Torrente MA, Lara-Castillo MC, Palomo L, Nomdedeu M, Solé F, Díaz-Beyá M, Esteve J, Risueño RM.

### Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) are chronic myeloid clonal neoplasms. To date, the only potentially curative therapy for these disorders remains allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation (HCT), although patient eligibility is limited due to high morbimortality associated with this procedure coupled with advanced age of most patients. Dopamine receptors (DRs) and serotonin receptors type 1 (HTR1s) were identified as cancer stem cell therapeutic targets in acute myeloid leukemia. Given their close pathophysiologic relationship, expression of HTR1s and DRs was interrogated in MDS and CMML. Both receptors were differentially expressed in patient samples compared to healthy donors. Treatment with HTR1B antagonists reduced cell viability. HTR1 antagonists showed a synergistic cytotoxic effect with currently approved hypomethylating agents in AML cells. Our results suggest that HTR1B constitutes a novel therapeutic target for MDS and CMML. Due to its druggability, the clinical development of new regimens based on this target is promising.

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Serotonin receptor type 1B constitutes a therapeutic target for MDS and CMML

Received: 3 April 2018  
Accepted: 22 August 2018  
Published online: 17 September 2018

Antònia Banús-Mulet<sup>1,2</sup>, Amaia Etxabe<sup>1,2</sup>, Josep Maria Cornet-Masana<sup>1,3,4</sup>, Miguel Àngel Torrente<sup>1,4,5</sup>, María Carmen Lara-Castillo<sup>1,6</sup>, Laura Palomo<sup>1</sup>, Meritxell Nomdedeu<sup>1,5</sup>, Marina Díaz-Beyá<sup>1,4,5,7</sup>, Francesc Solé<sup>1</sup>, Benet Nomdedeu<sup>4,5</sup>, Jordi Esteve<sup>1,4,5,7</sup> & Ruth M. Risueño<sup>1</sup>



## Dual lysosomal-mitochondrial targeting by antihistamines to eradicate leukemic cells.

En revisió

Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Carbó, Josep M, Torrente MA, Guijarro F, Cuesta L, Esteve J, Risueño RM.

### Abstract

Despite great efforts to identify druggable molecular targets for hematological neoplasias, there remains an unmet need for more effective therapies. We screened FDA-approved drugs that may revert an early transformation gene signature and identified a group of antihistamines (termed ANHAs) with distinct physicochemical properties associated with their cationic-amphiphilic nature, that selectively killed leukemic cells. ANHAs behaved as antileukemic agents against primary myeloid and lymphoblastic leukemia samples *ex vivo*, sparing healthy cells. Moreover, ANHAs severely impaired leukemic stem cell functionality *in vivo*. ANHAs' cytotoxicity relied on simultaneous mitochondrial and lysosomal disruption and induction of autophagy and apoptosis. The pharmacological effect was exerted based on their physico-chemical properties that permitted the passive targeting of both organelles, without the involvement of active molecular recognition. Thus, dual targeting of lysosomes and mitochondria has emerged as a new promising therapeutic approach for eradication of leukemia



