



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Reposicionament d'antihistamínics lisosomòtrops per a neoplàsies hematològiques

Josep Maria Cornet Masana

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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 Medicina
i Ciències de la Salut

Programa de Doctorat en Biomedicina

Reposicionament d'antihistamínics lisosomòtrops per a neoplàsies hematològiques

Memòria presentada per Josep Maria Cornet Masana per optar al títol de
doctor per la Universitat de Barcelona

Ruth Muñoz Risueño
la directora

Josep Maria Cornet Masana
el doctorand

Elías Campo Güerri
el tutor

Josep Maria Cornet Masana

Barcelona, 2018

Aquest estudi ha estat finançat pel fons “Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud 2015” de la Fundación Mutua Madrileña i s’ha dut a terme a l’Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras i a l’Institut d’Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Itaca t'ha donat el bell viatge,
sense ella no hauries sortit.
I si la trobes pobra,
no és que Itaca t'hagi enganyat.
Savi, com bé t'has fet,
sabràs el que volen dir les Itagues.

Kavafis - Carles Riba - Lluís Llach

Agraïments

“Preneu seient, companys, parlarem de bellesa.
Uns la busquen en els primers brots de la primavera.
Uns juren haver-la vist en fórmules matemàtiques,
surant en l'harmonia de les esferes.”
Jo competeixo - Manel

I hem vist la bellesa. En lisosomes brillant a la foscor de sales de microscòpia. En la remor del citòmetre quan esperes que passi el primer pou d'un experiment clau. En teories desesperades que acaben tenint sentit. Aquests tres anys han estat molt intensos i me n'enduc infinites coses bones. Malgrat les adversitats experimentals, malgrat la precarietat a què ens sotmet el sistema als investigadors predoctorals i malgrat les vicissituds de tot projecte de recerca: les coses bones fan que hagi valgut la pena. I qualsevol cosa que escrigui serà del tot insuficient per agrair a totes les persones que han estat al meu costat durant aquest camí ple d'entrebancs. Però cal reconèixer-les. I em sap greu si m'estenc, però ja sabeu que la síntesi no es la meva virtut principal.

En primer lloc a la **Ruth** (Rú), por algo sencillo pero importantísimo: haber confiado en mí, en muchas ocasiones más que yo mismo. No de la forma impostada con la que algunos jefes alientan a sus predocs, sino de forma sincera.

També a tots els que han anat passant pel laboratori: a **Vicky**, por llamarme la atención cuando era un “canelo”, a **Teresa**, por ponerle al mal tiempo buena cara (ya sabemos que *cloning is dark and full of terrors*) y al inestimable Dr. **Torrente**, por el show sin tregua que fue trabajar a tu lado (no puedo evitar sonreír cuando sigo encontrando eppendorfs de “Vola 1”). I a la **Laia**, que has d'agafar el relleu, i que de ben segur seràs un digna successora.

I a la **Merche** i a la **Natalia**, per escoltar les meves paranoies i llençar-me petons pels passadissos. Per omplir de somriures l'edifici. I als “**Fillatos**”, el nostre laboratori germà, per compartir tantes hores a cultius i perquè les misèries dels doctorats són més petites quan es socialitzen. I a l'**Alejandro**, porque aunque compartimos poco tiempo nunca olvidaré al argentino pesado que nos pedía magnets. Als nostres veïns la **Tània**, el **Guillermo**, l'**Esther**, la **Bea**, la **Lorena**, la **Sheila** i l'**Asier** per haver aguantat les nostres estridències a les tardes. Als Campitos: en **Joanen**, la **Patri**, les **Martes**, el **Robert**, en **Ferran**, el **David**, la **Núria**, la **Roser** i el **Martí**, perquè vam trigar a conèixe'ns, però el que ha unit l'EHA que no ho separi l'home. Perquè, us agradi o no, ens heu adoptat (o més aviat ens hem autoadoptat) i hem compartit penes i cerveses en una molt bona proporció. I a l'**Adam**, CEK is a darker place without your smile. I don't think there is a single person on earth immune to your charm, your mere presence helped me cope with the thesis. I **Martí**... es teus coions! Êts és més divò dê Mânâcò! Per fer ciència tan bona i amb tant entusiasme. Perquè gràcies a tu he acabat entenent

els teus gràfics que semblen arbres de Nadal. I per ajudar-me tantíssim amb els PCA i els *heatmaps*. Si fos pels meus coneixements de bioinformàtica els hauria fet amb paper mil·limetrat. Però sobretot per tots els cafès i tots els sopars dels tres divos. Et trobaré molt a faltar.

I és obligat agrair a tots els pacients i donants que, de manera altruista i en situacions sovint molt difícils, han cedit mostres per a la recerca, permetent-nos desenvolupar la nostra feina, i als metges que ho han fet possible, sobretot al Dr. Jordi Esteve i al Dr. Joan Cid.

També em cal fer un agraïment estrany i poc convencional: als aproximadament 200 ratolins que han format part dels experiments. La seva contribució ha estat necessària però involuntària, i ha de ser reconeguda. I posats a fer agraïments poc convencionals, també vull agrair la meva formació al sistema educatiu públic, sobretot a l'Escola Costa i Llobera, per haver ajudat a forjar el meu esperit crític i haver-me donat suport quan més el necessitava.

A les meves titis de Pérez-Galdós 37, perquè hem construït una autèntica llar i hem aconseguit el miracle de viure junts i no barallar-nos en dos anys. Perquè Pepe-**Duqui-Geltru** és una alineació guanyadora. Pels nostres esmorzars *british* de diumenge. Encara que seguïu confonent medul·la òssia i medul·la espinal jo us estimo igual, i saber que us trobaria en arribar a casa després de dies interminables al laboratori sempre em reconfortava

A la Dra. **Su**, la **Carmen** i la **Maria**, por haber mantenido vivo el espíritu del máster y porque cada vez que nos vemos es como si el tiempo no hubiera pasado. Y porque es un lujo tener a gente que entiende tan bien los problemas a los que te enfrentas en una tesis. I a la **Raquel**, la salmantina més barcelonina, que sempre volia saber com estaven les meves cèl·lules i sempre estava disponible per una birra d'emergència. I al **Lluís**, perquè tot i ser borinot i, per tant, l'enemic, ara sap tot el que ha de saber de la ciència i ha arribat a entendre la mort cel·lular a nivells inquietantment profunds. I perquè m'ha escoltat tot i ser un pesat també a nivells profunds.

A les castelleres i **castellers** de la Vila de Gràcia. Perquè en aquesta tesi, com en un castell, si ara faig l'aleta és perquè tinc una gran estructura que em sustenta. Perquè he après molt dels castells i en una tesi també cal força, equilibri, valor i seny. Fent pinya amb vosaltres he oblidat els problemes que m'angoixaven i he compartit moments inoblidables amb la gran família blava. Gràcies per ser-hi i per, junts, haver aconseguit coses tan brutals. Cada castell de nou descarregat m'ha donat un xute d'energia per seguir endavant, i una emoció que només nosaltres podem entendre. I amb una menció molt especial per a l'**Eli**, la castellera més compromesa, per escoltar-me fins i tot quan la seva hèrnia-monstre amenaçava amb robar-li el somriure.

A tots els qui m'han acompanyat als viatges durant la tesi, per haver-me permès mantenir intacta la salut mental. To **Savo**, ti znaš, ti si moj brate! And I'm so glad we still have the chance to meet from time to time after some many years. To **Alice** and **Mariana**, we were the true Karadžević royal family by the lake. To the whole Anafi crew to show me the greek paradise in the middle of my thesis, particularly to the sweet **Nikólas**, Ευχαριστώ πολύ! I a la **Marta**, perquè només nosaltres sabem fins a quin punt va molar la nostra aventura autoestopista als Balcans. A la **Judith**, perquè estem els dos igual de bojos i perquè encara al·lucino d'aquell viatge d'intrèpids inconscients fent couchsurfing a Tanzània i tornant amb tots els òrgans. Perquè molem molt. And to **Kunta**, our brother from another mother, for having such a blast together in Arusha even if we were not "standing at the top of the Kilimanjaro". We three were probably the most remarkable ukulele-reggaeton performers in all eastern Africa. And I swear those days I even forgot what my thesis was all about. Asante sana, kaka.

I un agraïment tècnic i molt especial que no voldria oblidar: a tota la gent que ha contribuït a desenvolupar el meravellós kit d'activació de caspases CaspaseGLO. Ells no sabran mai la profunditat i sinceritat de l'estima que els professo. El món seria un lloc millor si tots els experiments fossin de la senzillesa que ells han possibilitat. I evidentment també a la **Maria**, l'**Elisenda** i l'**Anna** del servei de microscòpia de l'UB, per haver ajudat tant a aquest pobre ignorant de la microscòpia confocal i haver-me permès obtenir aquestes imatges tan precioses dels lisosomes. I parlant de lisosomes, a tots els investigadors que han estudiat els lisosomes en càncer abans, sobretot a l'equip de la Dra Jäättelä a Copenhagen, ja que malgrat no conèixe'ns i malgrat ells no ho sàpiguen, el seu precedent d'antihistamínics m'ha salvat la tesi.

També als meus amics de sempre, els **Malapafabaca** (tot i que segueixo preferint la forma adaptada *malapafuckers*), perquè encara que estiguem dispersos pel món i siguem tots tan diferents seguim trobant moments per reunir-nos. Encara que sigui per fer divendres de crispetes i pelis dels 80. I perquè devem ser la colla amb més doctorands de l'univers (no sé que ens posaven al menjar del Costa perquè ens tornéssim tan bojos).

I ara que m'acosto al final, a les tres persones que més temps m'han acompanyat al laboratori i que han fet que aquests tres anys fossin meravellosos: la Mari, l'Amaia (perdó, Dra. Etxabe) i l'Antònia. En primer lloc per haver-me aguantat fins i tot en els meus pitjors moments, que té un mèrit immens. Però sobretot per tots els moments compartits pels "minions". Por tus bromas, **Mari**. Por tu sentido del humor extraordinario y por ser, y lo digo en serio, la mejor persona que conozco. Por los momentos *Backstreet boys* en la poyata. Por preocuparte siempre tanto y haberme salvado el culo en tantas ocasiones. Por tu sabiduría. Ya sabes que eres mi amor platónico. Eta **Amaia**... badakizu. Contigo empezó todo. Por esa norma no escrita de ir al surtidor de cerveza los días que teníamos que salir a las mil. Por los incontables *afterworks* y las conversaciones en cultivos. Por nuestro odio compartido a Ting-Chao Chou. Por ser mi heroína y ayudarme incluso cuando no me lo merecía. Y por haber dejado el listón tan alto. Mila esker, maitea! I a l'**Antònia**, perquè no hi ha Zipi sense Zape. Perquè entre els dos hem creat uns

sobrenoms dignes de Nobel. Per totes les tardes al “salxixaman”, com dius tu. Per regalar-me frases tan excelses com “ets més ruc que un tupí de pixar” o “té el cul com una senalla”. Per accedir a ser la meva *personal shopper* (que també s’ha de tenir paciència). Per les batucades carnavalesques triturant fèmurs i les tardes en què cultius semblava Pacha Ibiza. En definitiva perquè sense tu aquests tres anys haurien passat molt més lents. Moltes gràcies! I a l’últim membre dels minions, FACSCantoII (carinyosament, la Canto), amb qui tots hem compartit incomptables hores i hem acabat tractant com si fos una persona (una persona tossuda i amb mala llet però entranyable). Amb les tesis en aquest laboratori ens haurien de convalidar el títol d’enginyer superior de citometria. Hem arribat a conèixer tots els problemes possibles d’un citòmetre i, noies, no en tingueu cap dubte, a l’eterna lluita *Scientists VS Machines* hem acabat guanyant nosaltres.

Però a qui més he de donar les gràcies és a la meva família. Perquè molt abans d’aquesta tesi van regar la curiositat d’un nen inquiet i mai no li van tallar les ales. A la meva àvia **Montserrat**, per prometre ciris a Sant Eudald pels meus experiments, i a l’àvia **Maria Lluïsa** per interessar-se sempre tant pels meus progressos i pels ratolins (encara que parli de mi a desconeguts dient que sóc “el seu nét que mata ratolins a la fundació” com si pertanyés a una secta satànica). A la **Cris** i a l’**Albert** per ser tan “ardes” i riure’s sempre tant del Pepens i els seus aminoàcids. I per conèixe’m tant bé. I a la meva mare i al **Xavi**, per haver-me fet costat tots aquests anys. I al **Sergi**, no cal estendre’s quan resulta tan fàcil explicar-ne el perquè: perquè ets la meva família i has aguantat estoicament la meva tesi. Segur que d’aquí poc ens contracten a tots per fer el nostre propi *Modern Family*.

Però sobretot sobretot a la meva **mare** i al meu avi “**Alfredu**”. Probablement no s’explicaria el meu caràcter ni la meva set de coneixement sense la llibertat i estímuls que em van proporcionar. I ara que culmino la meva tesi no puc deixar de pensar en l’avi i al meu cap sembla com si fóssim la mateixa persona vivint vides paral·leles als mateixos espais però en diferents temps. Un home extraordinari que, moltes dècades abans que jo investigués a l’Hospital Clínic, ell hi feia de practicant per curar ferits de guerra; que moltes dècades abans que jo publicués un article sobre leucèmia, ell en redactava sobre electricitat. Un home que em va ensenyar, per sobre de tot, a fer el possible per ser una bona persona i a no deixar d’aprendre mai, i que va portar l’amor pel coneixement fins les últimes conseqüències donant el seu cos al mateix Hospital Clínic. I me’l puc imaginar perfectament, orgullós de la meva tesi com si fos la que ell mai no va fer i dedicant-me el seu màxim elogi: ets un home molt ferm.

Resum

Els antihistamínics són un conjunt de fàrmacs antagonistes del receptor d'histamina 1 (HRH1) àmpliament emprats per al tractament de l'al·lèrgia. Els darrers anys s'ha investigat la importància de HRH1 en càncer, i s'han descrit efectes antitumorals d'alguns antihistamínics. Al present treball s'ha ampliat aquesta recerca a les neoplàsies hematològiques, amb especial interès en leucèmia mieloide aguda (LMA), una malaltia amb recaigudes freqüents i mal pronòstic, i on existeix la necessitat de tractaments innovadors. Aquí, es descriu l'expressió en superfície de HRH1 en neoplàsies hematològiques, però descartant-ne un efecte clau en la leucemogènesi. Es descriuen, així mateix, els efectes antileucèmics selectius d'ebastina, terfenadina, loratadina i rupatadina al rang micromolar baix, validats en experiments en línies cel·lulars i amb mostres primàries de pacients en experiments *ex vivo* i *in vivo*. Aquest grup de fàrmacs, que hem anomenat antihistamínics antineoplàsics (ANHA), mostren efectes sinèrgics amb quimioteràpia convencional i posseeixen capacitat d'eliminar cèl·lules mare leucèmiques de LMA, considerades responsables de les recaigudes, preservant majoritàriament l'hematopoesi normal. El mecanisme pel qual els ANHA exerceixen els seus efectes antileucèmics és independent de HRH1, i es produeix mitjançant acumulació a lisosomes i mitocondris. Aquest tropisme dual inicia un procés de mort cel·lular caracteritzat per un augment de superòxid mitocondrial, una permeabilització de la membrana lisosomal i una activació de caspases. En línia amb aquestes observacions, els ANHA es caracteritzen per ser fàrmacs hidrofòbics amb estructura catiònica i amfifílica, característiques que s'han relacionat prèviament amb l'acumulació a aquests orgànuls. A partir d'aquestes observacions, es proposa l'ús de fàrmacs lisosomo- i mitocondriòtrops com a estratègia terapèutica per a la LMA i la resta de neoplàsies hematològiques, en la qual s'està treballant mitjançant química mèdica.

Abstract

Antihistamines constitute a drug family comprising antagonists of histamine receptor 1 (HRH1), extensively used for the relief of allergic symptoms. Over the last years, the importance of HRH1 in cancer has been investigated, and antitumoral effects of some antihistamines have been reported. The present work has expanded this research to hematological neoplasias, with special interest in acute myeloid leukemia (AML), a disease characterized by frequent relapse and bad prognosis for which novel treatments are desperately needed. Herein, we report surface expression of HRH1 in hematological neoplasias, while ruling out a key role in leukemogenesis. Likewise, we report selective antileukemic effects induced by ebastine, terfenadine, loratadine and rupatadine at the low micromolar range, as assessed in cell lines and in patient samples in *ex vivo* and *in vivo* experiments. This group of drugs, hereafter referred to as antineoplastic antihistamines (ANHA), display synergic effects when combined with conventional chemotherapy and are active against the AML leukemic stem cell compartment, considered responsible for the relapses, while mostly sparing healthy hematopoiesis. ANHA-mediated antileukemic effects are HRH1-independent, and rely instead on lysosomal and mitochondrial accumulation. This dual tropism triggers a cell death process characterized by an increase in mitochondrial superoxide species, a lysosomal membrane permeabilization and caspase activation. In line with these findings, ANHAs possess a cationic amphiphilic structure with overall hydrophobicity, features previously related to accumulation in those organelles. Considering these observations, the use of lysosomo- and mitochondriotropic drugs is proposed as a therapeutic strategy in AML and other hematological neoplasias. Drug optimization to reach clinics is being currently pursued by medicinal chemistry.

Abreviatures

ADCD: Mort cel·lular dependent d'autofàgia

ADME: Absorció Distribució Metabolisme i Excreció

Al·loTPH: Al·lotrasplantament de progenitors hematopoètics

AMPK: Proteïna-cinasa activada per AMP

ANHA: Antihistamínic antineoplàsic (sigles pròpies)

ATG: Gen relacionat amb l'autofàgia

ATPasa-V: ATPasa vacuolar

AutoTPH: Autotrasplantament de progenitors hematopoètics

BHE: Barrera hematoencefàlica

BME: β -mercaptoetanol

BSA: Albúmina sèrica bovina

CAD: Fàrmac catiònic amfifílic

CDK: Cinasa dependent de ciclina

CFSE: Èster de succinimidil-carboxifluoresceïna

CFU: Unitat formadora de colònia

CHRM: Receptor muscarínic d'acetilcolina

CI: Índex de combinació

CLEAR: Xarxa d'expressió i regulació lisosomal coordinada

CONGA: Grup de consens sobre els antihistamínics de nova generació

CRISPR: Repeticions curtes palindròmiques agrupades de forma regular

CSC: Cèl·lules mare del càncer

Ct: Cicle llindar

DIC: Contrast per interferència diferencial

DMSO: Dimetilsulfòxid

DOT1L: Histona metiltransferasa semblant al disruptor del silenciament telomèric

DTT: Ditiotreitòl

EDQM: Direcció europea de qualitat del medicament i l'assistència sanitària

EMA: Agència europea del medicament

EOBA: Excés sobre l'aditivisme de Bliss

FBS: Sèrum boví fetal

FDA: Administració d'aliments i fàrmacs dels Estats Units

FLT3: Tirosina cinasa semblant a fms-3

FLT3L: Lligand de FLT3

FSC: Dispersió frontal de la llum

GFP: Proteïna verda fluorescent

GPCR: Receptor acoblat a proteïnes G

HBSS: Solució salina equilibrada de Hanks

HER2: Receptor del factor de creixement epidèrmic humà 2

HRH: Receptor d'histamina

HSC: Cèl·lules mare hematopoètiques

HTR: Receptor de serotonina

IDH: Isocitrat deshidrogenasa

IL: Interleucina

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

LCM: Limfoma de cèl·lules del mantell

LDCD: Mort cel·lular dependent de lisosomes

LLA: Leucèmia limfoblàstica aguda

LMA: Leucèmia mieloide aguda

LMC: Leucèmia Mieloide Crònica

LMMC: Leucèmia mielomonocítica crònica

LMP: Permeabilització de la membrana lisosomal

LogD: Logaritme del coeficient de distribució

LogP: Logaritme del coeficient de partició

LSC: Cèl·lules mare leucèmiques

LTR: Lysotracker

MFI: Intensitat mitjana de la fluorescència

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

NMP: Neoplàsia mieloproliferativa

NPM1: Nucleofosmina

OMS: Organització mundial de la salut

PBS: Tampó fosfat salí

PCA: Anàlisi de components principals

PCD: Mort cel·lular programada

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa

PLK: Cinasa semblant a Polo

PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfoni

RCD: Mort cel·lular regulada

ROS: Espècies reactives de l'oxigen
SCF: Factor de cèl·lules mare
SDS: Dodecil sulfat sòdic
SEM: Error estàndard de la mitjana
SMD: Síndrome mielodisplàsica
SSC: Dispersió lateral de la llum
TBS: Sèrum salí tamponat amb Tris
TCA: Antidepressiu tricíclic
TPO: Trombopoetina
TPSA: Àrea topològica de la superfície polar
TFEB: Factor de transcripció EB
ULK1: Cinasa activadora de l'autofàgia semblant a Unc-51
VEGF: Factor de creixement de l'endoteli vascular

Índex

1. INTRODUCCIÓ	29
1.1 Biologia del càncer	31
1.1.1 Conceptes universals en la biologia del càncer.....	31
1.1.2 Implicacions terapèutiques.....	31
1.1.3 Lisosomes, autofàgia i mitocondris en càncer.....	33
1.1.3.1 Els lisosomes.....	33
1.1.3.2 L'autofàgia.....	34
1.1.3.3 Lisosomes i càncer.....	37
1.1.3.4 Autofàgia i càncer.....	38
1.1.3.5 Mitocondris i càncer.....	39
1.2 Neoplàsies hematològiques	41
1.2.1 Neoplàsies mieloides.....	41
1.2.1.1 Leucèmia mieloide aguda.....	41
1.2.1.2 Síndromes mielodisplàsiques i leucèmia mielomonocítica crònica.....	46
1.2.1.3 Leucèmia Mieloide Crònica.....	47
1.2.2 Neoplàsies limfoides.....	48
1.2.2.1 Leucèmia limfoblàstica aguda.....	48
1.2.2.2 Limfoma de Burkitt i de cèl·lules del mantell.....	48
1.2.2.3 Mieloma múltiple i leucèmia de cèl·lules plasmàtiques.....	49
1.2.3 Lisosomes, autofàgia i mitocondris en neoplàsies hematològiques.....	50
1.3 Mort cel·lular	52
1.3.1 Conceptes generals.....	52
1.3.2 Tipus de mort cel·lular.....	53
1.3.2.1 Apoptosi.....	53
1.3.2.1 Mort cel·lular dependent d'autofàgia.....	55
1.3.2.2 Mort cel·lular dependent de lisosomes.....	56
1.3.3 Plasticitat i causes últimes de les vies de mort cel·lular.....	57
1.4. Antihistamínics	60
1.4.1 Farmacologia general dels antihistamínics.....	60
1.4.1.1 Antihistamínics de primera generació.....	60
1.4.1.2 Antihistamínics de segona generació.....	60
1.4.1.3 Estudis de l'ús d'antihistamínics i càncer.....	62
1.4.2 La histamina i els receptors d'histamina.....	64
1.4.2.1 La histamina.....	64
1.4.2.2 Els receptors d'histamina.....	65
1.4.2.3 Histamina, receptors d'histamina i càncer.....	67
1.5. Propietats fisicoquímiques i distribució subcel·lular de fàrmacs	70
1.5.1 Propietats fisicoquímiques en farmacologia.....	70
1.5.2 Distribució subcel·lular de fàrmacs.....	71
1.5.3 Lisosomotropisme, mitocondriotropisme i compostos catiónics amfífils.....	73
1.5.4 Propietats fisicoquímiques dels antihistamínics.....	75
2. OBJECTIUS	79
3. METODOLOGIA	83
3.1. Materials	85
3.1.1 Línies i cultius cel·lulars.....	85
3.1.2 Mostres primàries.....	86
3.1.3 Compostos.....	87

3.1.4. Anticossos acoblats a fluoròfor	91
3.2. Mètodes	91
3.2.1. Generalitats i estadística	91
3.2.2. Comptatge cel·lular i viabilitat.....	92
3.2.3. Anàlisi d'expressió de proteïnes en superfície.....	92
3.2.3.1 Anàlisi d'expressió de HRH1 en superfície	92
3.2.3.2. Anàlisi de diferenciació mieloide.....	93
3.2.4. Microscòpia de fluorescència	93
3.2.4.1. Anàlisi de l'expressió de HRH1 per microscòpia de fluorescència	93
3.2.4.2. Anàlisi del compartiment lisosomal mitjançant <i>LysoTracker</i>	93
3.2.4.3. Anàlisi de la fragmentació nuclear	94
3.2.4.4. Anàlisi de la permeabilització de la membrana lisosomal mitjançant la detecció de galectina-1	94
3.2.5. Anàlisi de l'expressió de gens per PCR semi-quantitativa.....	94
3.2.6. Clonatge i transducció de construccions.....	96
3.2.6.1. Clonatge al plàsmid intermediari pJET1.2	96
3.2.6.2. Mutagènesi dirigida	96
3.2.6.3. Clonatge al vector lentiviral pULTRA.....	96
3.2.6.4. Clonatge al plàsmid d'expressió transitòria pEF1	97
3.2.6.5. Clonatge de shRNAs al plàsmid pLKO.1	97
3.2.6.6. Construccions en pLentiCRISPR.v2.....	98
3.2.6.7. Transducció de vectors lentivirals en cèl·lules leucèmiques	98
3.2.6.8. Anàlisi de la senyalització de HRH1 amb vectors reporters	99
3.2.7. Estudis de supervivència i proliferació.....	99
3.2.7.1. Citotoxicitat	99
3.2.7.2. Càlcul de concentracions efectives mitjanes (EC ₅₀).....	100
3.2.7.3. Sinergisme.....	100
3.2.7.4. Co-cultiu amb cèl·lules d'estroma.....	100
3.2.7.5. Assaig de proliferació amb CFSE.....	100
3.2.7.6. Anàlisi del cicle cel·lular.....	101
3.2.7.7. Anàlisi de reversions de la citotoxicitat	101
3.2.8. Estudis de mort cel·lular i apoptosi.....	101
3.2.8.1. Tinció amb annexina V	101
3.2.8.2. Anàlisi de l'activació de caspases efectores.....	102
3.2.9. Estudis d'afectació mitocondrial i lisosomal.....	102
3.2.9.1. Anàlisi del compartiment lisosomal mitjançant <i>LysoTracker</i>	102
3.2.9.2. Anàlisi del compartiment autofàgic mitjançant CYTO-ID	102
3.2.9.3. Anàlisi d'espècies reactives d'oxigen mitocondrials mitjançant MitoSOX.....	102
3.2.9.4. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial mitjançant rodamina-123	103
3.2.10. Assaigs de clonogenicitat.....	103
3.2.11. Estudis <i>in vivo</i>	103
3.2.11.1. Xenotrasplantament amb línies cel·lulars.....	104
3.2.11.2. Xenotrasplantament amb mostres primàries de leucèmia mieloide aguda.....	104
3.2.11.3. Xenotrasplantament amb mostres de cordó umbilical de donant sa.....	105
3.2.12. <i>Western blot</i>	105
3.2.13. Anàlisis bioinformàtics.....	106
3.2.13.1. <i>Connectivity Maps</i>	106
3.2.13.2. <i>Heatmaps</i>	107
3.2.13.3. <i>Clustering</i> i anàlisi de components principals	107
4. RESULTATS	109
4.1. Resultats preliminars	111
4.2. Estudi del receptor HRH1 en neoplàsies hematològiques	113
4.2.1. Expressió de HRH1 en línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques.....	113
4.2.2. Expressió de HRH1 en cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques.....	115

4.2.3. Implicació de HRH1 en LMA	119
4.2.4. Implicació de la histamina en LMA	122
4.3. Estudi preclínic del potencial dels antihistamínics per a neoplàsies hematològiques...	125
4.3.1. Estudi preclínic en línies cel·lulars de LMA	125
4.3.2. Estudi preclínic en cèl·lules hematopoètiques primàries sanes i neoplàsiques.....	134
4.3.3. Estudis <i>in vivo</i>	139
4.3.4. Estudis preclínics en altres neoplàsies hematològiques.....	141
4.4. Estudi dels mecanismes d'acció dels antihistamínics associats a la seva acció antileucèmica	145
4.4.1. Cerca de dianes candidates	145
4.4.2. Mecanisme dependent del receptor d'histamina 1	145
4.4.3. Mecanisme dependent de receptors de serotonina	147
4.4.4. Mecanisme dependent de canals de potassi	148
4.4.5. Mecanisme dependent de receptors muscarínics d'acetilcolina	150
4.4.6. Efectes dels antihistamínics sobre el compartiment lisosomal i autofàgic	151
4.4.7. Efectes dels antihistamínics sobre la funció mitocondrial.....	162
4.4.8. Cinètica dels efectes dels antihistamínics sobre els diferents compartiments cel·lulars...	168
4.4.9. Relació de l'acció dels antihistamínics amb les seves propietats fisicoquímiques.....	171
4.4.10. Estudi de nous compostos	175
5. DISCUSSIÓ	179
6. CONCLUSIONS	201
7. BIBLIOGRAFIA.....	205
8. ANNEXOS	229
I. Taula de pacients de LMA.....	231
II. Taula de pacients de LMMC i SMD	235
III. Publicacions.....	239

Llista de figures

Figura 1. Esquema general del compartiment autofàgic i endolisosomal.....	35
Figura 2. Model jeràrquic de la LMA aplicant consideracions d'evolució darwiniana.	43
Figura 3. Implicacions sobre la mort cel·lular de la permeabilització de la membrana lisosomal...	57
Figura 4. Alteracions causants de mort cel·lular. Adaptat de Galuzzi 2015	58
Figura 5. Síntesi de la histamina	64
Figura 6. Mecanisme d'atrapament iònic.....	72
Figura 7. Mapa del plàsmid lentiviral pULTRA.....	97
Figura 8. Mapa del plàsmid pLKO.1	
Figura 9. Agrupació dels compostos seleccionats al cribratge en funció dels codis ATC i validació primària.	112
Figura 10. Expressió en superfície de HRH1 en línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques	114
Figura 11. Un línia HL-60 resistent a citarabina mostra una expressió de HRH1 més alta que HL-60 parental	114
Figura 12. HRH1 s'expressa a la superfície de línies cel·lulars de LMA.....	115
Figura 13. HRH1 s'expressa similarment en diversos tipus de subconjunts neoplàsics i no està relacionat amb la supervivència	117
Figura 14. Expressió de HRH1 en superfície en cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques. .	119
Figura 15. Les formes de HRH1 clonades indueixen senyalització, però no aconsegueixen una sobreexpressió en línies de LMA	121
Figura 16. Expressió de HRH1 en línies transduïdes amb shRNAs.....	121
Figura 17. Expressió de gens relacionats amb histamina en LMA	123
Figura 18. Un subgrup d'agonistes inversos de HRH1 mostren efectes antileucèmics en línies cel·lulars de LMA.....	126
Figura 19. Els ANHA tenen efectes antileucèmics al rang micromolar baix.....	127
Figura 20. Els ANHA disminueixen la proliferació de línies cel·lulars de LMA	128
Figura 21. Alguns antihistamítics indueixen la diferenciació de línies cel·lulars de LMA.....	129
Figura 22. Els ANHA indueixen arrest del cicle cel·lular en fase G2/M	130
Figura 23. Els ANHA redueixen la capacitat clonogènica de línies cel·lulars de LMA	131
Figura 24. L'estroma reverteix només parcialment els efectes dels ANHA.....	131
Figura 25. Ebastina permet efectes citotòxics addicionals als de citarabina	133
Figura 26. Els ANHA mostren sinergisme amb citarabina	133
Figura 27. Els ANHA disminueixen l'expressió de <i>BIRC5</i>	134
Figura 28. Els ANHA mostren efectes antileucèmics <i>ex vivo</i>	135
Figura 29. Els ANHA afecten menys les cèl·lules hematopoètiques sanes que les leucèmiques	138
Figura 30. Ebastina i rupatadina no són efectius en experiments <i>in vivo</i> amb línies cel·lulars de LMA.....	140
Figura 31. Els ANHA eliminen selectivament cèl·lules de LMA <i>in vivo</i> amb mostres de pacients. ..	142

Figura 32. Els ANHA mostren efectes citotòxics en línies cel·lulars de diverses neoplàsies hematològiques.....	143
Figura 33. Els ANHA mostren efectes citotòxics en mostres primàries de LMMC i LLA-T	144
Figura 34. L'efecte dels antihistamínics no es correlaciona amb HRH1.....	146
Figura 35. La histamina no reverteix la citotoxicitat dels ANHA.	147
Figura 36. L'efecte dels ANHA no està relacionat amb HTR1A.	149
Figura 37. Inhibidors de hERG no tenen efectes citotòxics consistents en línies cel·lulars de LMA.	150
Figura 38. L'acetilcolina no reverteix la citotoxicitat dels ANHA.....	151
Figura 39. Els ANHA indueixen un augment de la massa lisosomal	153
Figura 40. L'ebastina indueix una expansió del compartiment lisosomal en línies cel·lulars de LMA.	153
Figura 41. Ebastina indueix un augment del volum dels lisosomes	155
Figura 42. Els ANHA indueixen un augment del compartiment autofàgic.	156
Figura 43. Els ANHA indueixen un augment del marcador autofàgic LC3II en LMA.....	157
Figura 44. Els ANHA no tenen efectes consistents sobre mostres primàries de LMA.....	158
Figura 45. Ebastina indueix LMP.....	159
Figura 46. L'esfingomielinasa àcida recombinant només reverteix la mort induïda per ebastina en KG1.....	160
Figura 47. A-tocoferol reverteix els efectes citotòxics dels ANHA.....	161
Figura 48. 3-MA no reverteix els efectes citotòxics dels ANHA	162
Figura 49. Els ANHA indueixen un augment de cèl·lules Annexina V+	163
Figura 50. Els ANHA indueixen una mort cel·lular compatible amb l'apoptosi.....	164
Figura 51. Els ANHA indueixen una condensació i fragmentació del nucli compatible amb l'apoptosi	165
Figura 52. Els ANHA indueixen una activació de caspases efectores a les 24h	165
Figura 53. L'inhibidor de caspases zVAD-fmk no reverteix la mort induïda per ANHAs.....	166
Figura 54. Els ANHA indueixen una acumulació de mitROS	167
Figura 55. Ebastina i rupatadina indueixen una pèrdua de potencial de la membrana mitocondrial.	168
Figura 56. Cinètica d'esdeveniments observats després del tractament amb ANHAs.....	169
Figura 57. Estudi del compartiment lisosomal i l'activació de caspases a les 12h de tractament amb ANHAs.....	170
Figura 58. Agrupació de propietats fisicoquímiques dels antihistamínics segons els seus efectes antileucèmics.....	172
Figura 59. El logP dels antihistamínics es correlaciona amb el seu efecte antileucèmic	173
Figura 60. Els ANHA tenen valors de logD alts i valors de TPSA intermedis	173

Figura 61. L'agrupament de fàrmacs per característiques fisicoquímiques coincideix amb els efectes antileucèmics.....	174
Figura 62. Estructura química dels antihistamínics estudiats	175
Figura 63. El cribratge identifica diversos compostos d'interès.....	177
Figura 64. Representació dels compostos del cribratge segons logP i TPSA.....	177
Figura 65. Distribució de les espècies d'ebastina als diferents compartiments cel·lulars.....	193
Figura 66. Model proposat per a l'efecte dels ANHA.....	198

Llista de taules

Taula 1. Característiques dels tipus de mort cel·lular acceptats per Comitè de Nomenclatura de la Mort Cel·lular 2018.....	54
Taula 2 . Llistat d'antihistamínics segons classificació química i funcional.....	62
Taula 3. Estudis realitzats amb antihistamínics en càncer.....	64
Taula 4. Potencials de membrana i valors de pH típics dels diferents compartiments subcel·lulars en cèl·lules de mamífer	71
Taula 5. Propietats fisicoquímiques i farmacològiques dels antihistamínics més rellevants per a aquest treball.....	76
Taula 6. Informació de les línies cel·lulars	85
Taula 7. Relació de compostos emprats.....	90
Taula 8. Informació dels anticossos de marcadors humans.....	91
Taula 9. Llistat d'encebadors emprats per a PCR semiquantitativa	95
Taula 10. Encebadors emprats per a l'amplificació de HRH1, introducció de V5 i flanqueig amb dianes de XbaI	96
Taula 11. Relació d'encebadors emprats per a la mutagènesi dirigida amb oligonucleòtids solapants.....	96
Taula 12. Encebadors específics dels shRNA.....	97
Taula 13. Relació de plàsmids complementaris necessaris per a la generació de lentivirus de tercera generació.....	99
Taula 14. Llistat d'anticossos emprats per a <i>Western Blot</i>	106
Taula 15. Mutacions en gens del sistema de senyalització per histamina en la cohort de pacients de TCGA-LAML.....	124

1. Introducció

1.1 Biologia del càncer

1.1.1 Conceptes universals en la biologia del càncer

El consens científic actual considera el càncer com el resultat final d'un procés de característiques evolutives al llarg del qual una cèl·lula adquireix múltiples lesions genètiques i epigenètiques (Flavahan, Gaskell et al. 2017) que li confereixen avantatges adaptatives i proliferatives (Hahn i Weinberg 2002; Flavahan, Gaskell et al. 2017; Martincorena, Raine et al. 2017). Si bé resten encara moltes preguntes per respondre quant als processos de transformació, sembla clar que es tracta d'un procés extremament intricat, format per una successió complexa d'esdeveniments oncogènics en estreta interacció amb el context cel·lular, i que desemboquen en el fenotip característic de les cèl·lules tumorals (Puisieux, Pommier et al. 2018) .

A la complexitat dels processos de transformació cal sumar-hi la complexitat aportada per l'enorme diversitat intra i intertumoral, fet que dificulta en gran mesura establir conceptes universals sobre la biologia de les cèl·lules tumorals. Tanmateix, un celebrat article de Hanahan i Weinberg l'any 2000 (Hanahan i Weinberg 2000) va suggerir que l'ampli repertori de genotips tumorals es manifestava en última instància en sis alteracions fonamentals que guiaven el creixement tumoral (batejades com a *hallmarks of cancer*): manteniment de la senyalització proliferativa, evasió dels supressors del creixement, replicació il·limitada, resistència a la mort cel·lular, inducció de l'angiogènesi i activació de mecanismes d'invasió i metàstasi. L'any 2011 i en vista dels progressos en la recerca, els mateixos autors van ampliar la llista, incloent-hi l'alteració del metabolisme, l'evasió del sistema immune, la inestabilitat genòmica i la inflamació pro-tumoral (Hanahan i Weinberg 2011). Així, les cèl·lules normals evolucionarien progressivament, adquirint aquestes característiques en múltiples etapes i en general en llargs períodes de temps fins a esdevenir malignes (Puisieux, Pommier et al. 2018).

1.1.2. Implicacions terapèutiques

Com hem vist, doncs, una gran diversitat de lesions genètiques, de vies de senyalització alterades, de tipus de tumor o de tipus de cèl·lules dins un mateix tumor acaben confluint en una sèrie de característiques comunes. Tot plegat pot traslladar-se, també, a les estratègies terapèutiques contra el càncer: mentre que alguns antitumorals afecten característiques generals de les cèl·lules malignes, d'altres n'afecten lesions moleculars específiques.

En el primer grup s'hi inscriurien la majoria dels quimioterapèutics convencionals, que inhibeixen la proliferació cel·lular, però també fàrmacs més recents com els inhibidors de la telomerasa, que afecten la immortalitat replicativa, els inhibidors de VEGF que afecten l'angiogènesi, els inhibidors de CDKs que incideixen en l'evasió dels supressors del creixement o els que eviten l'evasió del sistema immune (Hanahan i Weinberg 2011).

Al segon grup hi trobaríem una fornada de fàrmacs desenvolupats les darreres dècades sovint anomenats teràpies dirigides, que suposen una de les pedres angulars de la medicina personalitzada. Per la seva rellevància cal destacar diversos tractaments desenvolupats al llarg dels 1980s i 1990s: trastuzumab, un anticòs monoclonal dirigit a HER2, una cinasa sobreexpressada en un percentatge important de tumors mamaris (McNeil 1998), imatinib, un inhibidor de la proteïna de fusió aberrant BCR-ABL observada en leucèmia mieloide crònica (LMC) (Druker, Talpaz et al. 2001) i rituximab, un anticòs anti-CD20 per al tractament de limfomes (Grillo-Lopez, White et al. 1999). Tots tres van suposar una revolució en el tractament dels seus respectius tipus de tumor, en atacar de forma més específica les cèl·lules tumorals i permetre la seva administració només a pacients amb les aberracions que tenien com a diana (Afghahi i Sledge 2015). Avui en dia i diversos fàrmacs després hi ha una explosió en el camp de les teràpies dirigides i molts esforços es concentren en el desenvolupament de fàrmacs contra un gran nombre d'alteracions genètiques discretes.

Tot això no obstant, tots dos grups d'antitumorals presenten nombroses limitacions. Mentre que els primers són en general menys específics i comporten efectes secundaris més severes, els segons són tan específics que afecten només una alteració genètica sense tenir en compte la complexitat genòmica i l'arquitectura clonal; en ambdós casos, es possibilita que el tumor evadeixi el seu efecte en la seva dinàmica evolutiva (Estey, Levine et al. 2015).

Així, cal tenir en compte que en la majoria de tumors trobem mutacions en un gran nombre de gens (de 10 a més de 100) (Vogelstein, Papadopoulos et al. 2013), que diferents cèl·lules dins el mateix tumor contenen mutacions diferents (Gerlinger, Rowan et al. 2012) i que no sempre resulta clar quines d'aquestes mutacions són realment crítiques (Longo 2014).

En aquesta línia, cada cop sembla més clar que només les teràpies de combinació ens podran dur a una eradicació sostinguda dels tumors, atesa la redundància i diversitat de

les vies sobre les quals es sustenta el creixement tumoral, dificultant la resistència “darwiniana” freqüentment observada en monoteràpies, i en vista de l'experiència que, si bé les teràpies dirigides desenvolupades fins al dia d'avui han suposat avenços terapèutics importantíssims, cap d'elles no ha resultat curativa, depenent la curació de la combinació amb altres agents (Longo 2014).

En aquest context, cal seguir treballant en el desenvolupament de nous fàrmacs en tots els fronts que la recerca ha obert i incidir en la seva combinació.

1.1.3. Lisosomes, autofàgia i mitocondris en càncer

1.1.3.1. Els lisosomes

Els lisosomes són orgànuls intracel·lulars que constitueixen el principal compartiment digestiu de les cèl·lules eucariotes. Descrits per primer cop per l'equip liderat per de Duve els anys 1950s com a vesícules membranoses que contenen hidrolases (Appelmans, Wattiaux et al. 1955), el seu paper va ser considerat molts anys el de simple bossa d'escombraries cel·lular. Dins la biologia cel·lular actual, però, es consideren orgànuls avançats involucrats en múltiples processos i reguladors crucials de l'homeòstasi cel·lular (Appelqvist, Waster et al. 2013).

Els lisosomes es troben pràcticament en totes les cèl·lules eucariotes, llevat dels eritròcits madurs (Geminard, de Gassart et al. 2002). En els humans solen trobar-se'n diversos centenars per cèl·lula, tot i que aquest nombre es pot veure dràsticament reduït en situacions de manca de nutrients (Xu i Ren 2015). Presenten heterogeneïtat en termes de mida, morfologia i distribució (Mellman 1989) i estan delimitats per una bicapa fosfolipídica que conté fins a 25 proteïnes de membrana lisosomal amb un alt grau de glicosilació (Lubke, Lobel et al. 2009). A banda, també presenten membranes intraliosomals, on es produeix la degradació de membranes danyades (Schulze, Kolter et al. 2009). Una de les característiques més rellevants del lumen lisosomal és la seva acidesa, amb un pH que oscil·la entre 4,5 i 5 i que es genera i manté gràcies a l'acció de l'ATPasa vacuolar (ATPasa-V) que bombeja protons cap a dins de l'orgànul. (Ohkuma, Moriyama et al. 1982).

La principal funció dels lisosomes és la degradació de macromolècules i orgànuls, funció que a la cèl·lula desenvolupen principalment dos actors; el sistema ubiquitina-proteasoma, que s'encarrega de la degradació de proteïnes intracel·lulars de vida curta i els lisosomes, que degraden tot tipus de macromolècules d'origen intracel·lular segregades per

autofàgia o d'origen extracel·lular que li arriben a través de processos d'endocitosi i fagocitosi (Appelqvist, Waster et al. 2013; Xu i Ren 2015).

Aquesta degradació es duu a terme gràcies a l'acció coordinada de la seixantena d'enzims hidrolítics que resideixen al lumen de l'orgànul, principalment lipases, nucleases, glicosidases, i proteases (Kolter i Sandhoff 2005). Dins aquest grup d'hidrolases lisosomals destaquen les catepsines, una família de proteases de serina, cisteïna o aspàrtic que es troben en abundància dins l'orgànul (Rossi, Deveraux et al. 2004). En línies generals aquestes hidrolases presenten una activitat òptima a pH àcid com el que s'observa als lisosomes, tot i que algunes d'elles retenen activitat si s'alliberen al citosol. Els catabòlits resultants de la degradació de macromolècules són reutilitzats per la cèl·lula després del transport per diferents vies cap al citoplasma (Lloyd 1996).

La biogènesi de lisosomes es troba regulada per una xarxa gènica específica anomenada xarxa d'expressió i regulació lisosomal coordinada (CLEAR per les seves sigles angleses), de la qual formen part nombrosos gens que codifiquen sobretot proteïnes lisosomals i que contenen una seqüència GTCACGTGAC a la qual s'uneix el factor de transcripció EB (TFEB) (Sardiello, Palmieri et al. 2009), que es considera el regulador mestre que permet adaptar la funció lisosomal a les necessitats cel·lulars de degradació (Palmieri, Impey et al. 2011). Quan la cèl·lula té disponibilitat de nutrients, un regulador crucial de l'homeòstasi cel·lular, el complex mTORC1, es troba activat i manté TFEB a la membrana lisosomal. Per contra, davant l'escassetat de nutrients, mTORC1 s'inhibeix i permet a TFEB entrar al nucli i activar la transcripció de gens lisosomals i autofàgics (Shimobayashi i Hall 2014). A nivell físic, els lisosomes sorgeixen a partir de la maduració d'endosomes tardans que provenen de l'aparell de Golgi i de fet endosomes i lisosomes constitueixen un continu en el qual resulta difícil establir frontera (Appelqvist, Waster et al. 2013). Cada cop més, s'estén la noció que els lisosomes actuen com el node central de senyalització que recull informació sobre l'estat de disponibilitat de nutrients i la transmet a les principals xarxes que regulen el metabolisme cel·lular (Settembre, Fraldi et al. 2013; Hamalisto i Jaattela 2016).

1.1.3.2. L'autofàgia

L'autofàgia és un procés cel·lular a través del qual components citoplasmàtics, proteïnes mal plegades o orgànuls sencers són lliurats als lisosomes per a la seva degradació i posterior reciclatge. Des que els anys 60 de Duve encunyés el terme (De Duve i Wattiaux 1966) múltiples investigacions han constatat que es tracta d'un procés conservat evolutivament en eucariotes que resulta fonamental per a l'homeòstasi cel·lular i amb

fortes connexions amb el càncer, les malalties degeneratives o l'envelliment (Klionsky 2007; Nencioni, Cea et al. 2013).

En cèl·lules de mamífer es distingeixen tres tipus d'autofàgia; l'autofàgia mitjançada per xaperones, en la qual proteïnes amb certs motius de reconeixement són transportades als lisosomes (Dice, Terlecky et al. 1990), la microautofàgia, en la qual hi ha una captació directa per part del lisosoma de petites quantitats de material citoplasmàtic (Li, Li et al. 2012) i la macroautofàgia (en endavant, simplement autofàgia), que és la principal forma d'autofàgia i que implica la inclusió del material a degradar en vesícules amb doble membrana (Klionsky i Emr 2000). Aquest procés és complex i consta de múltiples etapes, en les quals els gens relacionats amb autofàgia (ATG per les sigles angleses) juguen un paper crucial (Levy, Towers et al. 2017).

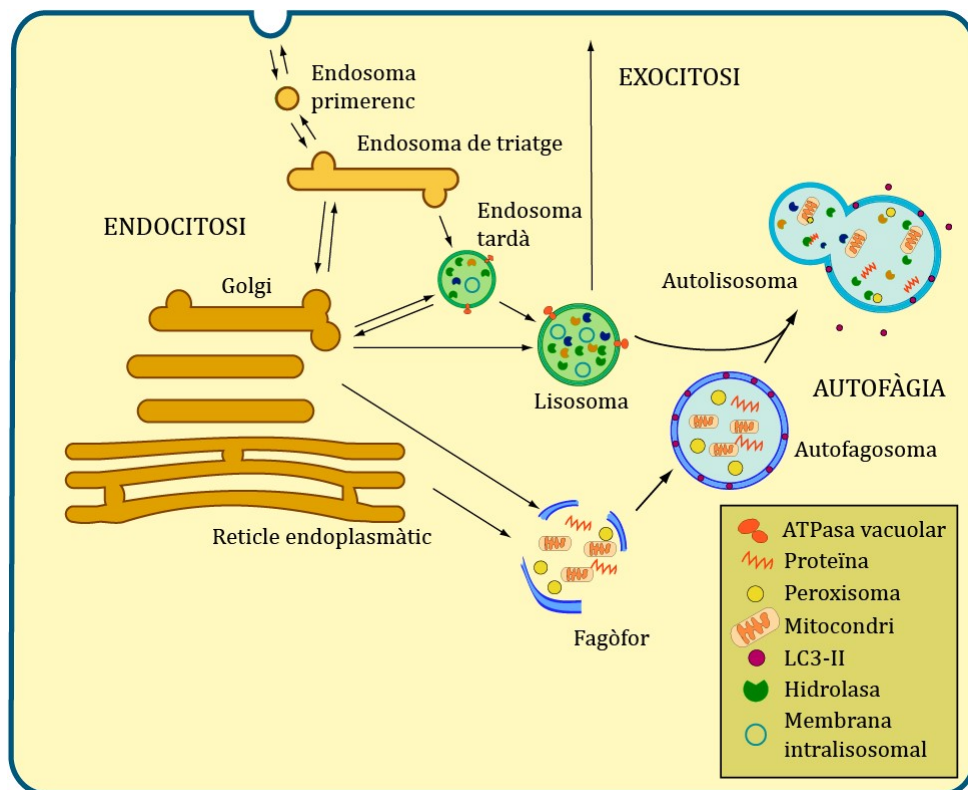


Figura 1. Esquema general del compartiment autofàgic i endolisosomal

Un dels primers esdeveniments del procés autofàgic és l'assemblatge dels components del complex ULK1 i la formació del fagòfor, una membrana que neix a partir de material membranós provinent de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi i mitocondris (Tooze i Yoshimori 2010). Un cop format, aquest complex promou l'assemblatge del complex PI3K, que activa efectors *downstream* que permeten la nucleació de la membrana, envoltant el

material citoplasmàtic a retirar (Lamb, Yoshimori et al. 2013). A continuació, el complex Atg12-Atg5-Atg16L recluta LC3 afavorint l'elongació i tancament de la membrana del fagòfor, que en aquest punt passa a denominar-se autofagosoma. LC3, distribuït per la membrana, pateix un procés de lipidació durant el qual se li uneix fosfatidiletanolamina. La forma lipidada de LC3 (LC3-II) constitueix un dels marcadors d'autofagosoma més àmpliament acceptats, i s'usa extensament com a mesura de l'activitat autofàgica (Klionsky, Abdelmohsen et al. 2016). Un cop l'autofagosoma s'ha format i és madur, aquest es fusiona o bé directament amb lisosomes donant lloc a autolisosomes o bé amb endosomes tardans donant lloc a amfisosmes que posteriorment es fusionaran amb lisosomes. La fusió amb els lisosomes permetrà la degradació del contingut segregat i el seu posterior reciclatge. Per a què es produeixi aquesta fusió són necessàries una correcta funció lisosomal i un pH prou àcid (Yamamoto, Tagawa et al. 1998).

L'autofàgia es troba controlada per un conjunt d'elements senyalitzadors altament regulats que permeten que es produeixi permanentment de manera basal i que s'indueixi davant certs estímuls d'estrès fisiològic, sobretot la manca de nutrients, la hipòxia, l'estrès oxidatiu i el dany mitocondrial (Mizushima i Komatsu 2011). És important no oblidar, però, que la majoria de la maquinària autofàgica és pliotròpica, i els mecanismes de senyalització es troben interconnectats en gran mesura amb altres xarxes de senyalització com les d'ubiquitinització, mort cel·lular, fagocitosi o cicle cel·lular (Lindqvist, Simon et al. 2015). Si bé com hem dit la regulació és complexa, dos reguladors mestres s'han apuntat com a especialment rellevants: el complex mTORC1 (que com hem vist també és regulador de la funció lisosomal) i AMPK (Mihaylova i Shaw 2011; Efeyan, Zoncu et al. 2013).

Alguns dels processos on s'ha destacat la importància de l'autofàgia són la diferenciació cel·lular i el manteniment de cèl·lules mare. Entre d'altres, l'autofàgia selectiva d'òrgans permet una ràpida remodelació de la composició cel·lular, contribuint al procés de diferenciació (Riffelmacher i Simon 2017). Pel que fa a les cèl·lules mare, s'ha descrit el paper citoprotector de l'autofàgia, que contribuiria al manteniment de les cèl·lules quiescents a llarg termini mitjançant una eliminació d'òrgans danyats i una protecció davant les espècies reactives d'oxigen (ROS). De fet, diversos gens relacionats amb l'autofàgia s'han identificat d'entre els més rellevants en signatures gèniques de *stemness* (Cheung i Rando 2013) i en cèl·lules mare hematopoètiques (HSC) s'ha observat un alt nivell d'autofàgia basal, que decau a mida que els progenitors es comprometen a llinatges concrets (Warr, Binnewies et al. 2013). En aquesta línia, ratolins amb delecions en gens

vitals per a l'autofàgia mostren múltiples defectes en el manteniment de les HSC, amb fenotips fins i tot letals embrionaris (Riffelmacher i Simon 2017).

La desregulació de l'autofàgia pot portar, així mateix, a la mort cel·lular, aspecte que serà discutit en més profunditat en pàgines posteriors (apartat 1.3). Un esquema de la dinàmica del compartiment endolisosomal i autofàgic es pot trobar a la Figura 1.

1.1.3.3. Lisosomes i càncer

Les cèl·lules transformades es caracteritzen per una necessitat contínua de producció de nova biomassa, i en aquest sentit els lisosomes juguen un paper fonamental en el subministrament de precursors i l'adaptació a l'estrès nutricional. En consonància amb aquesta noció, s'han observat múltiples alteracions lisosomals en cèl·lules transformades que apunten en general a una hiperactivitat de l'òrganul. Diverses de les característiques fonamentals del càncer prèviament esmentades, a més, s'han descrit com a causa o conseqüència de la disfunció lisosomal (Hamalisto i Jaattela 2016; Davidson i Vander Heiden 2017). Un dels canvis més destacats que s'han relacionat amb la transformació és el de l'increment del volum i pH lisosomal, de l'activitat de les seves proteases, i de la secreció d'aquestes, i molts estudis s'han centrat en les catepsines i el seu possible paper pro-neoplàsic (Kirkegaard i Jaattela 2009; Kallunki, Olsen et al. 2013; Piao i Amaravadi 2016). També s'han observat alteracions en la distribució dels lisosomes: d'una localització eminentment perinuclear a un augment dels lisosomes en zones més properes a la membrana, que s'ha descrit que tindrien funcions especials en l'adhesió, l'exocitosi, la invasió, la metastasi i la senyalització (Hamalisto i Jaattela 2016).

Estudis més específics de transformació han observat diferents alteracions lisosomals en funció de les mutacions emprades com a model de transformació. Així, mentre que mutacions en *KRAS*, *MYC* i *TEAD1* augmenten la biogènesi de lisosomes i les seves corresponents hidrolases, la inactivació de p53 duu a una disminució en l'activació de catepsines (Kroemer i Jaattela 2005). Les alteracions lisosomals també s'han relacionat amb la resistència a quimioteràpia (Zhitomirsky i Assaraf 2016), el reciclatge de receptors relacionats amb la proliferació (Goh i Sorkin 2013) o la inflamació pro-tumoral (Kobayashi, Tanaka et al. 2013) entre d'altres.

D'altra banda, la intensa activitat lisosomal també comporta una major fragilitat de la seva membrana, característica que fa els lisosomes més vulnerables a la seva disrupció mitjançant certs fàrmacs. Aquesta inestabilitat de membrana s'ha proposat que seria

deguda a un augment de la biogènesi d'òrgànuls que excediria el ritme de síntesi d'esfingolípids, juntament amb l'acumulació de ROS que solem observar en cèl·lules transformades. Així, les cèl·lules serien més propenses a l'alliberament de catepsines que activen una via de mort cel·lular que serà discutida amb més profunditat més endavant (Fehrenbacher, Gyrd-Hansen et al. 2004; Davidson i Vander Heiden 2017).

Tot aquest reguitzell d'estudis que subratllen la importància dels lisosomes en càncer, han despertat un interès en aquest òrgànul com a diana, tant d'elements que el componen com de la funció lisosomal en global, sumant-se a una nova corrent de teràpies dirigides a òrgànuls concrets (Sakhrani i Padh 2013). Les múltiples propostes terapèutiques, que abracen des de la inhibició de catepsines fins a l'augment del pH lisosomal han estat recentment resumides per Davidson i Vander Heiden (Davidson i Vander Heiden 2017) i, si bé resulten prometedores, encara presenten molts reptes, atesa la manca de coneixement profund sobre la funció lisosomal en càncer i fins i tot del funcionament de fàrmacs que afecten els lisosomes com la cloroquina i els seus derivats.

1.1.3.4. Autofàgia i càncer

La relació de l'autofàgia amb el càncer ha estat estudiada extensament, observant-se efectes diferents segons el tipus de tumor, l'estadi o les característiques genètiques (Eisenberg-Lerner, Bialik et al. 2009) però mostrant en general un paper bipolar; d'una banda actua com a supressor tumoral prevenint l'aparició del càncer o l'evolució de lesions pre-malignes i de l'altra afavoreix la supervivència i proliferació tumoral un cop el càncer s'ha establert (Singh, Vats et al. 2018).

Aquests papers contraposats i en aparença paradoxals no són, però, contradictoris. Abans de l'aparició del tumor, l'autofàgia eliminaria proteïnes i òrgànuls danyats i contribuiria a mantenir uns baixos nivells de ROS, limitant la inestabilitat genòmica i, en conseqüència, protegint de l'aparició de tumors. En aquesta línia, s'ha observat com defectes en l'autofàgia en diferents models animals comporten un augment de la inestabilitat genòmica i de la tumorigènesi (Kung, Budina et al. 2011). D'altra banda, un cop establert el càncer, l'autofàgia contribuiria a mantenir els alts requeriments metabòlics de les cèl·lules transformades, i fer front a l'estrès causat per fàrmacs, manca de nutrients o hipòxia (Kung, Budina et al. 2011) tal com corroborarien els múltiples estudis en què la inhibició farmacològica de l'autofàgia ha permès una disminució de la proliferació tumoral (Levy, Towers et al. 2017). L'autofàgia s'ha relacionat, així mateix amb la resistència a

quimioteràpia en diversos tipus de tumor, i la seva inhibició té en general un efecte sensibilitzador (Sui, Chen et al. 2013).

La relació amb les cèl·lules mare del càncer (CSC) ha estat també objecte d'estudi, i s'ha descrit un efecte essencial de l'autofàgia en CSCs de pàncrees, mama i glioblastoma. A més, s'ha descrit que les CSCs presenten nivells més alts d'autofàgia (observació que d'altra banda també és certa per a moltes cèl·lules mare sanes) i s'ha hipotetitzat que l'autofàgia contribuiria a la supervivència en els nínxols hipòxics on resideixen les CSCs (Vitale, Manic et al. 2015).

Totes aquestes observacions han despertat un interès creixent en la modulació de l'autofàgia com a estratègia terapèutica en càncer, majoritàriament basant-se en la seva inhibició en diferents punts del procés com a monoteràpia o com a estratègia de quimiosensibilització (Levy, Towers et al. 2017). Contràriament, basant-se en el fet que la majoria d'agents quimioterapèutics indueixen autofàgia i que un excés d'aquesta també duu a la mort cel·lular, també s'ha proposat l'ús d'inductors d'autofàgia com a teràpia (Singh, Vats et al. 2018). Alguns detractors dels inhibidors d'autofàgia, com Kroemer i els seus col·laboradors, han destacat que no afecten una diana específica i que redueixen la resposta T antitumoral (Ma, Galluzzi et al. 2013) i que, per tant, es tractaria d'una estratègia poc útil a l'hora de fer front al càncer (Levy, Towers et al. 2017).

1.1.3.5. Mitocondris i càncer

El mitocondri ha estat durant dècades un orgànul àmpliament estudiat en relació al càncer. Com a centre metabòlic i energètic de la cèl·lula, la seva regulació és clau en molts processos protumorals com la proliferació i la resistència a l'apoptosi. No és estrany doncs, que s'hagin observat múltiples diferències entre els mitocondris de cèl·lules sanes i els mitocondris de cèl·lules tumorals, entre d'altres en termes de mida, nombre, morfologia, taxa de renovació, perfils lipídics de les membranes o potencials de membrana (Modica-Napolitano i Weissig 2015). Molt destacables són, així mateix, les alteracions metabòliques observades en mitocondris de cèl·lules tumorals, particularment el conegut com a efecte Warburg, que consisteix en una preponderància de la glucòlisi per sobre del cicle de Krebs en presència d'oxigen (Warburg 1956; Velez, Hail et al. 2013).

Per a aquest treball resulta d'especial rellevància la formació mitocondrial d'espècies reactives d'oxigen (mitROS), sorgides a partir de la interacció amb l'oxigen molecular d'electrons escapats de la cadena transportadora d'electrons mitocondrial donant lloc a

superòxid (O_2^-), que pot ser convertit a peròxid d'hidrogen (H_2O_2) mitjançant les superòxid dismutases mitocondrials. Les mitROS, que representen la majoria de ROS cel·lulars, juguen diversos papers en la fisiologia normal de la cèl·lula, sobretot relacionats amb la resposta a estrès i la proliferació (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013). Quant al seu rol en cèl·lules tumorals, les mitROS poden ser favorables o desfavorables per a la seva homeòstasi en funció principalment de la quantitat i de la taxa de generació. Així, d'una banda les mitROS a nivells moderats poden activar vies proliferatives i afavorir la inestabilitat genòmica, actuant com a promotores de la tumorigènesi i la progressió tumoral. D'altra banda, un excés de ROS pot induir dany oxidatiu irreversible i finalment la mort cel·lular, majoritàriament a través de l'activació de l'apoptosi (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013; Sabharwal i Schumacker 2014). En estreta relació amb aquestes observacions, s'han constatat alteracions en l'estat oxidatiu de les cèl·lules del càncer, que mostren una tendència a la sobreproducció de mitROS. Aquestes alteracions fan les cèl·lules més vulnerables a increments addicionals de ROS i, per tant, a fàrmacs que n'indueixin la producció (Sabharwal i Schumacker 2014; Modica-Napolitano i Weissig 2015).

En base a totes aquestes diferències, s'han proposat tractaments específics que se'n puguin aprofitar per atènyer efectes selectius en cèl·lules tumorals. En serien exemples inhibidors de la fosforilació oxidativa, reguladors de ROS o inductors de l'apoptosi intrínseca (Modica-Napolitano i Weissig 2015). Malgrat s'han iniciat assaigs clínics amb aquests tractaments, cap d'ells ha demostrat els estàndards d'eficàcia i selectivitat necessaris per a la seva aprovació.

1.2 Neoplàsies hematològiques

Les neoplàsies hematològiques constitueixen un grup divers de malalties oncològiques de la sang, la medul·la òssia i el sistema limfàtic que inclouen leucèmies, limfomes, malalties mieloproliferatives i mielodisplàsiques i mielomes, entre d'altres. La classificació d'aquestes malalties ha estat recentment actualitzada per l'organització mundial de la salut (OMS) (Arber, Orazi et al. 2016) i, per l'interès en aquest treball, només es tractaran un nombre reduït d'aquestes malalties, posant l'accent en la leucèmia mieloide aguda.

1.2.1. Neoplàsies mieloides

1.2.1.1. Leucèmia mieloide aguda

La leucèmia mieloide aguda (LMA) és una neoplàsia hematològica caracteritzada per l'expansió clonal de precursors mieloides transformats anomenats blasts que s'acumulen a la sang, la medul·la òssia i a d'altres teixits resultant en una hematopoesi ineficient i una greu disfunció medul·lar. Aquests blasts presenten un fenotip immadur determinat per un bloqueig de la diferenciació i una gran capacitat proliferativa. La LMA és la leucèmia aguda més comuna en adults, amb una incidència anual de 3-5/100.000 a Europa. La incidència mostra un increment gradual a partir dels 40 anys i una edat mitjana al diagnòstic de 65 (Deschler i Lubbert 2006), per bé que també hi ha casos pediàtrics, especialment al llarg del primer any de vida. Es considera una malaltia rara, permetent que alguns dels nous medicaments desenvolupats per a la LMA rebin la designació de fàrmacs orfes per part de l'agència europea del medicament (EMA) i l'administració d'aliments i fàrmacs dels Estats Units (FDA), facilitant-ne l'entrada en assaigs clínics i escurçant-ne les etapes regulatòries (Stein i Tallman 2016).

A nivell biològic, la LMA és una malaltia heterogènia, complexa i dinàmica, caracteritzada per múltiples mutacions somàtiques iniciadores, la coexistència de clons que competeixen i una evolució al llarg del temps (Döhner, Estey et al. 2017). Fins al 86% dels casos, de fet, mostren més d'una alteració iniciadora (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2016). Pel que fa a la citogenètica, s'han identificat diverses alteracions cromosòmiques recurrents en LMA, algunes de les quals defineixen subtipus de la malaltia com t(8;21) o inv(16), si bé la meitat de les LMAs presenten un cariotip normal (Welch, Ley et al. 2012). Els avenços en les tècniques de seqüenciació han permès la identificació de molts gens freqüentment mutats en LMA i que inclouen gens supressors de tumors, relacionats amb senyalització, de factors de transcripció mieloide o relacionats amb la modificació de la cromatina entre d'altres. Algunes d'aquestes mutacions aporten informació rellevant per al diagnòstic i el

pronòstic, com les mutacions en *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *TET2*, *DNMT3A* o *IDH1* (Welch, Ley et al. 2012).

El procés leucemogènic, com la malaltia mateixa, és altament complex, i en disposem d'un coneixement molt limitat. A dia d'avui, només els gens de fusió de MLL, un regulador de la transcripció gènica, s'han demostrat capaços d'iniciar la leucemogènesi humana *in vivo*, en ser la seva expressió suficient per a transformar progenitors hematopoètics humans en cèl·lules de LMA (Barabe, Kennedy et al. 2007; Buechele, Breese et al. 2015). Concretament, l'oncogen de fusió MLL-AF9 indueix la transformació leucèmica sense necessitar la col·laboració de cap altra mutació (Barabe, Gil et al. 2017), resumint fidelment aspectes claus de la malaltia, incloent la capacitat regeneradora *in vivo* i el fenotip. El fet que aquesta alteració sigui l'única coneguda amb capacitat transformadora pròpia només remarca la complexitat del procés i la importància de la cooperació entre diferents alteracions.

Cèl·lules mare leucèmiques

Com hem explicat, la LMA és una malaltia altament heterogènia, i ho és a molts nivells: hi ha una gran heterogeneïtat mutacional entre pacients, una adquisició de mutacions seqüencials en un mateix pacient, una diversitat en la capacitat proliferativa i el fenotip, una jerarquització funcional i una gran diversitat en els patrons globals d'expressió gènica (Paguirigan, Smith et al. 2015; Thomas i Majeti 2017). Tota aquesta heterogeneïtat resulta fonamental per entendre la resposta de la LMA al tractament, sobretot les recaigudes, i s'han proposat diversos models per explicar-la. El model més acceptat avui en dia es basa en l'existència de les anomenades cèl·lules mare leucèmiques (LSC per les sigles angleses), proposades als anys 90 (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet i Dick 1997) i definides funcionalment com a cèl·lules capaces d'iniciar la malaltia en ser trasplantades a animals immunodeficients i reproduir-ne les característiques i el fenotip (Thomas i Majeti 2017). Així, el conjunt heterogeni de cèl·lules de LMA estaria organitzat de manera jeràrquica, i sols un subgrup de cèl·lules més primitives seria responsable del manteniment de la malaltia i les seves recaigudes.

Durant anys s'ha presentat aquesta jerarquia com una caricatura del sistema hematopoètic sa, però diversos estudis han subratllat que la biologia de la LMA és molt més dinàmica i plàstica, que es tracta d'una estructura jeràrquica molt més inestable que pateix molts canvis al llarg del desenvolupament de la malaltia (Pollyea i Jordan 2017) i que es troba subjecte a processos d'evolució darwiniana. D'aquesta manera, les LSCs

canviarien al llarg del temps adquirint noves alteracions genètiques i es produirien canvis de predominància de subclons segons la seva major adaptació (Campbell, Cabrera et al. 1996; Takebe i Ivy 2010; Meacham and Morrison 2013; Grove i Vassiliou 2014) (Figura 2). També, cèl·lules de LMA per sota de les LSCs en la jerarquia podrien adquirir alteracions que els conferissin característiques de LSCs. Un dels pioners en aplicar el darwinisme a la LMA, Mel Greaves, ha fet bona la frase més cèlebre de Dobzhansky, i l'ha readaptat al càncer: *Nothing in cancer makes sense except in the light of evolution* (Greaves 2015).

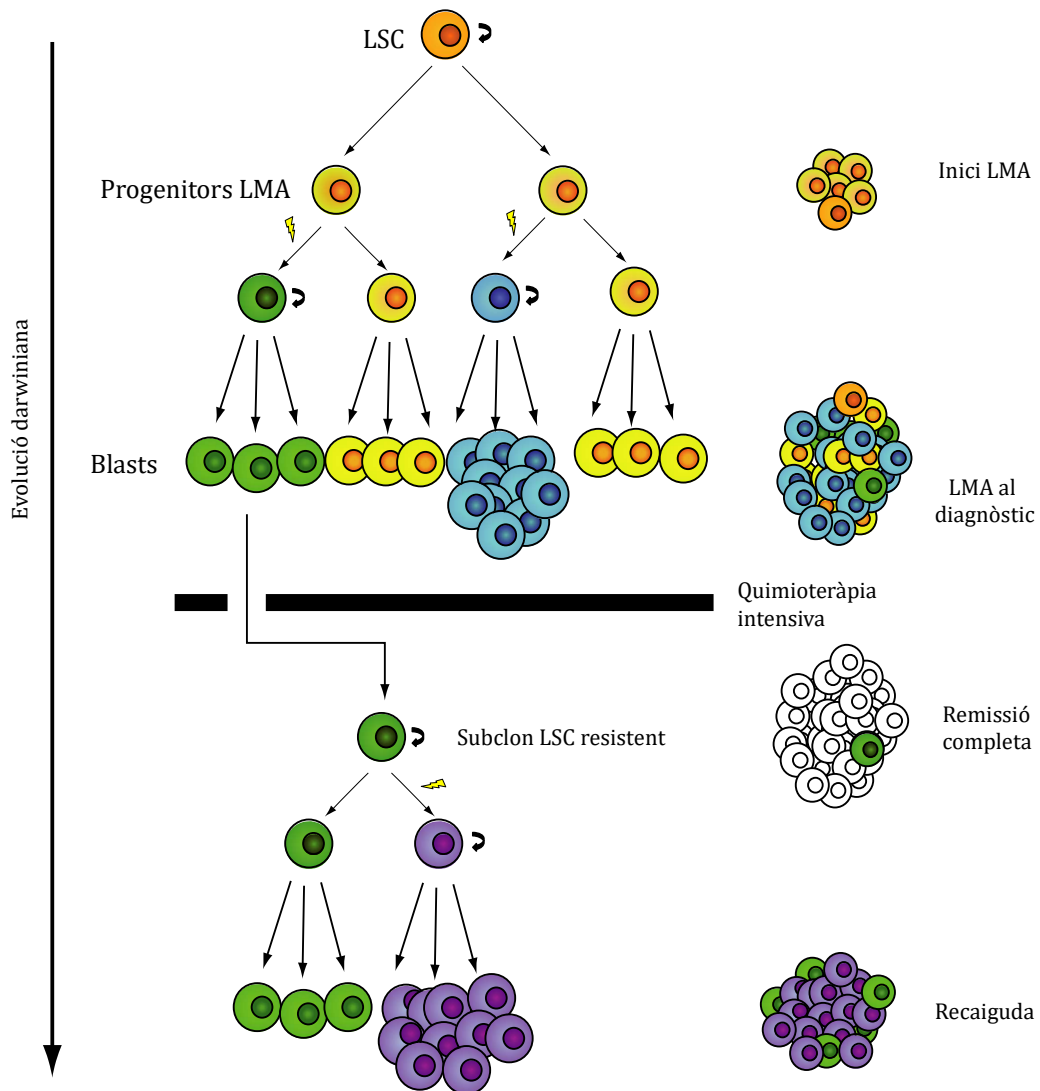


Figura 2. Model jeràrquic de la LMA aplicant consideracions d'evolució darwiniana. Diferents colors representen diferents clons, els llamps representen alteracions genètiques i les fletxes de les cèl·lules sobre elles mateixes representen cèl·lules mare amb capacitat d'autorenovació, que donen lloc a una progènie jerarquizada.

Altres nocions assentades durant molts anys, com que les LSCs són quiescents, resistent a quimioteràpia i altament infreqüents també han estat matisades, mostrant més diversitat de la que es creia (Pollyea i Jordan 2017) i alguns han proposat que les LSCs tindrien una certa plasticitat fenotípica (Sarry, Murphy et al. 2011; Magee, Piskounova et al. 2012). Sigui com vulgui, l'existència de cèl·lules capaces de regenerar la malaltia en la seva complexitat després de tractaments intensius és molt rellevant per a la teràpia: si es vol eradicar la LMA, no n'hi ha prou amb eliminar la majoria de les cèl·lules sinó que cal dissenyar teràpies capaces d'eliminar les LSCs al més aviat possible, preferentment abans de l'ús de quimioteràpia, en ser el moment en què la població de LSC és més vulnerable atesa la seva menor freqüència i complexitat (Pollyea i Jordan 2017). Cal atendre's també a la pròpia diversitat de LSCs derivada de l'evolució darwiniana, que pot fer que subclons poc preponderants al diagnòstic resisteixin els tractaments i produeixin recaigudes (Valent, Bonnet et al. 2012). Tal i com ho han descrit recentment Pollyea i Jordan, *si la LMA és un foc, la quimioteràpia n'apaga les flames, mentre que la teràpia dirigida a les LSCs n'extingeix les brases* (Pollyea i Jordan 2017).

Tractament de la LMA

La teràpia actual ha romàs pràcticament inalterada des de fa dècades, i si bé s'han observat petites millores en la supervivència, aquestes són degudes a una millora dels trasplantaments de progenitors hematopoètics, a una optimització de la quimioteràpia i a un millor suport hospitalari, més que no a l'aparició de tractaments innovadors (Dombret i Gardin 2016). Aquells pacients que són candidats a rebre tractament quimioterapèutic intensiu són tractats en primer lloc amb una teràpia d'inducció "7+3" (7 dies de citarabina i 3 d'una antraciclina), que produeix una remissió completa en un 60-80% dels pacients menors de 60 anys i un 40-60% dels majors de 60 (Döhner, Weisdorf et al. 2015). Posteriorment, s'aplica una teràpia de consolidació amb quimioteràpia intensiva basada en citarabina seguida, quan és possible, d'un auto- o al·lotrasplantament de progenitors hematopoètics (autoTPH, al·lotPH), opció també aplicada als pacients quimiorrefractaris (Döhner, Estey et al. 2017). Els pacients que no tolerarien la quimioteràpia intensiva, especialment aquells d'edats més avançades, reben sols tractament de suport o tractaments de baixa intensitat com dosis baixes de citarabina, observant-se un modest percentatge de remissions que repercuteixen en una curta supervivència mitjana (Döhner, Estey et al. 2017). Encara que en global un percentatge important de pacients assoleix una remissió completa, la majoria té un període curt de remissió, i recau als tres anys posteriors al diagnòstic. La supervivència després de les recaigudes és molt baixa, i és el principal factor que explica el mal pronòstic de la malaltia; la supervivència mitjana als 5

anys és del 40-50% en pacients joves i de menys del 10% en pacients d'edats avançades (Dohner, Estey et al. 2010; Grove i Vassiliou 2014; Stein i Tallman 2016).

La majoria de nous agents que s'han avaluat els darrers 40 anys per a la LMA han acabat, en paraules de Stein i Tallman, a la paperera de la història (Stein i Tallman 2016), palesant l'enorme dificultat que suposa el desenvolupament de fàrmacs en aquesta neoplàsia. Nogensmenys, el progressiu increment del coneixement de la malaltia ha permès seguir amb el disseny d'estratègies innovadores que intenten millorar-ne el tractament. D'una banda s'han avaluat els darrers anys noves formulacions de quimioteràpia citotòxica, com la formulació de citarabina i daunorubicina en liposomes CPX-351, aprovada recentment per la FDA (Talati i Lancet 2018) o la guadecitabina, un derivat de la decitabina que ha de permetre superar alguns dels problemes associats als agents hipometilants actuals (Roboz, Kantarjian et al. 2018). D'altra banda, hi ha hagut un gran interès per les teràpies dirigides en LMA, atesos els descobriments fets les últimes dècades al voltant de les alteracions genètiques en LMA i la seva biologia. Així, s'han desenvolupat diferents inhibidors de tirosina cinases aberrants en LMA, sobretot FLT3, com midostaurina, quizartinib, crenolanib o gilterinib, alguns dels quals actualment en assaigs clínics de fase III. També els enzims metabòlics *IDH1* i *IDH2*, mutats en alguns pacients de LMA, han estat atacats amb inhibidors de les seves formes mutants, amb resultats esperançadors en assaigs clínics que han culminat amb la recent aprovació per la FDA d'enasidenib, un inhibidor d'*IDH2* mutant (Kayser i Levis 2018). S'han desenvolupat així mateix agents que, sense afectar el producte directe d'una alteració genètica, n'afecten mediadors moleculars essencials alterats o desregulats. En serien exemples els inhibidors de DOT1L, de BCL-2, d'histona desacetilases o de PLKs (Stein i Tallman 2016). Tot aquest grup de teràpies tan prometedores han topat, però, amb múltiples problemàtiques derivades de la complexitat i el dinamisme de la LMA; la coexistència de clons i subclons amb diferents lesions genètiques i la manca de relació entre la capacitat d'empeltament d'un clon i la seva contribució a les recaigudes dificulta l'efectivitat d'una sola teràpia dirigida (Estey, Levine et al. 2015). En canvi, la seva combinació amb altres agents s'ha demostrat molt més prometedora (Kayser i Levis 2018).

Una altra estratègia per a la recerca de nous fàrmacs que està emergint en moltes malalties, també en la LMA, és el **reposicionament de fàrmacs**, que consisteix en aplicar medicaments o tractaments ja aprovats o abandonats per a una patologia a una altra (Andresen i Gjertsen 2017). Es tracta d'una estratègia que possibilita la identificació de fàrmacs potencials dels quals es coneix la seguretat i propietats farmacològiques, i que per

tant permeten estalviar-se un tram important del desenvolupament regulatori, revertint en uns temps més curts per arribar al pacient i uns menors costos econòmics, i suposant un avantatge respecte al desenvolupament *de novo* (Boguski, Mandl et al. 2009). D'altra banda, presenta també diverses limitacions, sobretot la poca capacitat d'optimització per a la nova malaltia: qualsevol canvi en la molècula caldrà ser avaluat en fase I, perdent-se els avantatges principals de l'estratègia. A tall d'exemple, al grup on s'ha desenvolupat el present treball s'ha proposat el reposicionament per a LMA d'apomorfinina, un inhibidor de receptors de serotonina actualment indicat per al Pàrkinson (Etxabe, Lara-Castillo et al. 2017), que es troba a les portes d'un assaig clínic de fase II en LMA només 6 anys després de l'inici del desenvolupament.

1.2.1.2. Síndromes mielodisplàsiques i leucèmia mielomonocítica crònica

Les síndromes mielodisplàsiques (SMD) i la leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC) engloben un conjunt heterogeni de patologies sanguínies caracteritzades per una hematopoesi ineficient, una morfologia displàsica en un o més llinatges hematopoètics i una freqüent progressió a LMA (Jaiswal i Ebert 2014).

Les **SMDs** presenten una incidència que augmenta amb l'edat, en especial a partir dels 70 anys (Unnikrishnan, Papaemmanuil et al. 2017), i produeix un grau més o menys important de citopènia, una condició *sine qua non* per al diagnòstic (Zini 2017). S'han identificat un bon nombre de mutacions i alteracions citogenètiques presents en la malaltia relacionades amb l'empalmament de RNA, modificacions epigenètiques, regulació de la cromatina i senyalització cel·lular (Papaemmanuil, Gerstung et al. 2013; Haferlach, Nagata et al. 2014). La complexitat i heterogeneïtat de la malaltia en fan difícil la classificació, que es basa sobretot en el grau de displàsia i el percentatge de blastos, i també en la presència de sideroblasts en anell. A més, dins les SMD s'hi inclou un subtipus basat en una alteració genètica: les SMD amb delecions a 5q, una aberració cromosòmica que confereix unes característiques clínic-biològiques pròpies (Arber, Orazi et al. 2016). L'alta heterogeneïtat de la malaltia es tradueix també en heterogeneïtat quant als tractaments: mentre que alguns pacients no requereixen tractament o sols teràpia de suport, els pacients d'alt risc reben agents hipometilants com azacitidina o decitabina, conjuntament quant és possible amb quimioteràpia intensiva semblant a la de la LMA. Molts pacients, però, no responen als tractaments, resultant en un molt mal pronòstic, mentre que la majoria dels que responen pateixen recaigudes al llarg dels dos anys següents (Prébet, Gore et al. 2011). En les SMD amb 5q(-), en línia amb la resta de diferències biològiques, el tractament és diferent i es basa en la lenalidomida. D'altra

banda, l'al·loTPH és l'única opció potencialment curativa, però està associada a una alta morbimortalitat (Sperling, Gibson et al. 2017).

La **LMMC**, si bé es troba estretament relacionada amb les SMDs, presenta també característiques pròpies de les neoplàsies mieloproliferatives (NMP), i en concordança està classificada per l'OMS com a SMD/NMP (Arber, Orazi et al. 2016). Es diferencia de les SMD per presentar una hematopoesi clonal que desemboca en una proliferació monocítica descontrolada, motiu pel qual el diagnòstic es fa sobretot a partir de l'observació de monocitosi persistent en sang (Moyo i Savona 2017). A nivell molecular, s'han identificat tres gens molt recurrentment mutats (*ASXL1*, *TET2* i *SRSF2*), així com d'altres implicats en l'empalmament de RNA, modificacions epigenètiques o vies de senyalització de citocines. En general, les cèl·lules de LMMC presenten un nombre baix de mutacions somàtiques si es compara amb altres càncers, una relativa homogeneïtat molecular que fa que encara no es pugui explicar l'heterogeneïtat clínica (Ball, List et al. 2016). La classificació de les LMMCs feta per l'OMS es basa en el percentatge de blasts, establint-se tres nivells de menys a més (LMMC-0, 1 i 2), tot i que sovint també es distingeixen les LMMCs segons siguin predominantment displàsiques o proliferatives (Moyo i Savona 2017). El tractament s'inicia només davant l'aparició de símptomes, i les estratègies terapèutiques són força similars a les de les SMD, amb l'ús de teràpia de suport, citarabina i agents hipometilants entre d'altres. També com en les SMD, la resposta a aquests tractaments és molt variable, hi ha un alt percentatge de recaigudes i l'única opció curativa és l'al·loTPH (Moyo i Savona 2017).

En el 30% dels casos, els pacients de SMD i LMMC progressen a LMA, anomenada LMA secundària (LMAs), caracteritzada per una mala resposta a tractaments i un pitjor pronòstic, i que mostra unes característiques biològiques també pròpies (Dohner, Estey et al. 2010; Niscola, Tendas et al. 2014; Sperling, Gibson et al. 2017).

1.2.1.3. Leucèmia Mieloide Crònica

La leucèmia mieloide crònica (LMC) és una neoplàsia mieloide caracteritzada per la leucocitosi i el seu curs en tres fases. Presenta una fase crònica inicial, que pot durar anys, en què hi ha una expansió del compartiment mieloide, però mantenint la capacitat de diferenciació. A continuació la malaltia presenta una fase accelerada, en què apareixen cèl·lules mieloides més immadures i finalment la fase blàstica, quan les cèl·lules immadures comencen a predominar, convertint-se en una malaltia agressiva i refractària (Soverini, Mancini et al. 2018). En CML, a diferència de la majoria de neoplàsies

hematològiques, una sola alteració genètica concreta es considera responsable de la iniciació en la immensa majoria de pacients: la translocació $t(9;22)(q34;q11)$, que dóna lloc a l'anomenat cromosoma Philadelphia, i que provoca l'aparició de la proteïna de fusió BCR-ABL1, una cinasa molt important en la patogènesi de la malaltia (Chereda i Melo 2015). La progressió de la fase crònica a la blàstica es produiria per un augment de la inestabilitat genètica que duria a l'acumulació de defectes addicionals al cromosoma Philadelphia, incrementant la resistència a fàrmacs (Soverini, Mancini et al. 2018). Precisament gràcies al coneixement de la base molecular de la malaltia es va poder dissenyar un inhibidor de BCR-ABL1, imatinib, que ha millorat dràsticament la supervivència convertint la CML en una malaltia de bon pronòstic (Saikia 2018).

1.2.2. Neoplàsies limfoides

1.2.2.1. Leucèmia limfoblàstica aguda

La leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) és un tipus de leucèmia caracteritzat per la proliferació descontrolada de precursors limfoides transformats que s'acumulen a la medulla òssia, a la sang, i a d'altres teixits. La seva incidència té un pic molt alt entre els 2 i els 5 anys (el 80% dels pacients són pediàtrics), i un altre pic a partir dels 50 anys, amb un 75% dels casos de llinatge B i el 25% restant de llinatge T (Inaba, Greaves et al. 2013; Terwilliger i Abdul-Hay 2017). Com en la majoria de neoplàsies hematològiques, les cèl·lules tumorals mostren una gran diversitat d'aberracions cromosòmiques que activen oncogens (com *MYC*), que activen tirosina-cinases (com ABL-1) o que causen una disrupció en gens reguladors del desenvolupament limfoide i l'hematopoesi normal (com *RUNX1* o *ETV6*). En LLA-T, a més, són especialment rellevants les alteracions en gens dels receptors de cèl·lules T (TCR) i en *NOTCH1* (Chiaretti i FoÀ 2009). Totes aquestes alteracions són similars en leucèmia pediàtrica i adulta, i són el determinant principal per a l'estratificació i el pronòstic de la malaltia, especialment en LLA-B (Malouf i Ottersbach 2018). Malgrat avenços en l'optimització dels tractaments i el suport hospitalari, el tractament consisteix encara en quimioteràpia basada en vincristina, corticosteroides i una antraciclina, amb l'al·loTPH com a opció per als pacients aptes. Això ha permès assolir taxes de curació del 90% en els casos pediàtrics, mentre que en pacients adults només un 30-40% dels pacients aconseguix remissions a llarg termini, constituint encara una malaltia de mal pronòstic en adults (Terwilliger i Abdul-Hay 2017).

1.2.2.2. Limfoma de Burkitt i de cèl·lules del mantell

El **limfoma de Burkitt** és un limfoma B no-Hodgkin altament agressiu que es considera el tumor humà de creixement més ràpid. La malaltia es troba associada al virus d'Epstein-

Barr i presenta translocacions cromosòmiques ((t(8;14)(q24;q32) en la majoria dels pacients) que activen l'oncogen c-Myc (Boerma, Siebert et al. 2009). La incidència és més alta en pacients immunosuprimits o amb VIH i, malgrat la quimioteràpia intensiva ha permès una gran millora en les taxes de curació en casos pediàtrics, el pronòstic en pacients d'edat avançada encara és dolent (Molyneux, Rochford et al. 2012).

El **limfoma de cèl·lules del mantell** (LCM) és una forma rara i agressiva de limfoma B no-Hodgkin que afecta sobretot persones d'edat avançada i que mostra en general una ràpida progressió i un mal pronòstic. A nivell genètic es caracteritza per la translocació t(11;14)(q13;q32) i la sobreexpressió de la ciclina D1, que probablement faciliten la transformació de cèl·lules pre-B a través d'una desregulació del cicle cel·lular (Campo i Rule 2015). A nivell molecular i de comportament clínic, es distingeixen dos grups principals: la LCM clàssica, amb IGHV no mutat i expressió de SOX11, i el tipus no nodal, amb un comportament més indolent i caracteritzat per cèl·lules amb mutacions a IGHV i negatives per a SOX11 (Royo, Navarro et al. 2012; Quintanilla-Martinez 2017). Avui en dia el tractament amb citarabina i rituximab seguit normalment per un autoTPH és l'estàndard per als pacients més joves, mentre que per als pacients no aptes per a tractaments intensius se solen emprar altres tractaments d'intensitat menor. Malgrat avenços, però, la LCM segueix sent una malaltia altament incurable (Campo i Rule 2015).

1.2.2.3. Mieloma múltiple i leucèmia de cèl·lules plasmàtiques

El **mieloma múltiple** és una neoplàsia de cèl·lules B caracteritzada per l'acumulació de cèl·lules plasmàtiques clonals a la medul·la òssia, que suposa el 13% de les neoplàsies hematològiques i que afecta sobretot pacients d'edat avançada (Jovanovic, Roche-Lestienne et al. 2018). Les cèl·lules neoplàsiques presenten una extensiva hipermutació somàtica de gens d'IgG, una absència d'expressió d'IgM i alteracions freqüents en la via de la ciclina D/retinoblastoma (Bergsagel, Kuehl et al. 2005; Kuehl i Bergsagel 2012). La darrera dècada s'ha observat un augment del temps de supervivència a la malaltia, sobretot per l'adveniment de nous fàrmacs com els inhibidors del proteasoma i les millores en els trasplantaments, però en la majoria dels casos segueix sent una malaltia incurable (Rollig, Knop et al. 2015).

La **leucèmia de cèl·lules plasmàtiques** (LCP) presenta moltes similituds amb el mieloma múltiple, en ser també una neoplàsia de cèl·lules plasmàtiques, però representa una entitat pròpia. Rara i molt agressiva, es tracta d'una malaltia amb molt mal pronòstic que

sol presentar translocacions cromosòmiques que impliquen alteracions en la cadena pesada de la immunoglobulina (IgH) (Mina, D'Agostino et al. 2017).

1.2.3. Lisosomes, autofàgia i mitocondris en neoplàsies hematològiques

La importància dels lisosomes, l'autofàgia i els mitocondris en algunes neoplàsies hematològiques ha despertat, com en la resta de càncers, un interès creixent els darrers anys. Pel que fa als **lisosomes**, l'estudi més complet de la seva rellevància s'ha efectuat en LMA, on s'ha observat que les cèl·lules leucèmiques presenten lisosomes més grans que els seus equivalents sans, que la població més primitiva sobreexpressa gens de biogènesi lisosomal i que la disrupció dels lisosomes mitjançant mefloquina condueix a una mort de les cèl·lules leucèmiques però no de les sanes (Sukhai, Prabha et al. 2013) . De manera similar, en LMC, la disrupció lisosomal per Leu-LeuOMe provoca la mort de cèl·lules tant sensibles com resistents a imatinib causada per l'alliberament de catepsina B al citoplasma (Puissant, Dufies et al. 2010). En neoplàsies de llinatge B s'ha descrit com alguns anticossos contra CD38 i CD20 produeixen una mort de cèl·lules malignes dependent de lisosomes (Alduaij, Ivanov et al. 2011; Jiang, Acharya et al. 2016).

Quant a l'**autofàgia**, s'ha descrit que permet el manteniment de les LSCs de LMA i LMC (Helgason, Mukhopadhyay et al. 2013; Sumitomo, Koya et al. 2016), que disminueix l'activitat de fàrmacs com daunorubicina, imatinib o doxorubicina, i que la seva inhibició restaura la quimiosensibilitat (Nencioni, Cea et al. 2013). En vistes a la millora dels tractaments actuals, s'han proposat teràpies basades en la modulació de l'autofàgia, i alguns estudis preclínic han apuntat a l'efecte favorable de combinar inhibidors d'autofàgia amb quimioteràpia en limfoma, CML, i LMA (Amaravadi, Yu et al. 2007; Bellodi, Lidonnici et al. 2009; Torgersen, Engedal et al. 2013; Palmeira dos Santos, Pereira et al. 2014). D'altra banda, també s'han observat efectes citotòxics després de la inducció d'autofàgia provocada per la inhibició de mTORC1/2 en LMA, T-ALL i limfoma (Yazbeck, Buglio et al. 2008; Evangelisti, Ricci et al. 2011; Willems, Chapuis et al. 2012). Diversos assaigs clínics es troben en marxa, i els propers anys s'espera obtenir més dades sobre la validesa clínica de l'estratègia.

Respecte als **mitocondris** i de manera similar a la majoria de càncers, s'han descrit diverses alteracions en neoplàsies hematològiques. D'una banda, s'ha observat que les cèl·lules leucèmiques tenen una major massa mitocondrial, taxes més altes de fosforilació oxidativa i depenen de l'oxidació d'àcids grassos per a la supervivència (Samudio, Harmancey et al. 2010; Skrtic, Sriskanthadevan et al. 2011). A més, s'han descrit en

leucèmies mutacions relacionades amb proteïnes mitocondrials com *IDH1* i *IDH2* (Carew, Zhou et al. 2003; Medeiros, Fathi et al. 2017). També pel que fa a la producció de ROS, les cèl·lules leucèmiques presenten nivells basals més elevats (Quillet-Mary, Jaffrezou et al. 1997; Carew, Zhou et al. 2003; Er, Tsai et al. 2007; Silva, Girio et al. 2011; Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013). En LMA, s'ha proposat explotar la vulnerabilitat oxidativa de les cèl·lules leucèmiques, especialment les LSCs, amb inductors de mitROS o altres elements relacionats amb l'estat oxidatiu (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013; Zhang, Fang et al. 2014; Sriskanthadevan, Jeyaraju et al. 2015; Farge, Saland et al. 2017). Alguns compostos que afecten específicament els mitocondris, com l'avocatina B, han mostrat potencial preclínic en LMA, en part mitjançant per la formació de mitROS (Lee, Angka et al. 2015).

1.3 Mort cel·lular

1.3.1. Conceptes generals

Les primeres observacions de mort cel·lular de què es té constància van ser efectuades per Vogt estudiant la metamorfosi de capgrossos de tòtil (*Alytes obstetricans*) l'any 1842, tan sols tres anys després de l'aparició del concepte mateix de cèl·lula proposat a la teoria cel·lular de Schwann (Clarke i Clarke 2012; Maghsoudi, Zakeri et al. 2012). No va ser fins a un segle després que una influent revisió recollint totes les observacions de mort cel·lular en vertebrats fetes fins al moment realitzada per Glucksmann (Glucksmann 1951) va començar a apuntar a la importància de la mort cel·lular durant el desenvolupament. Des de llavors, s'ha estudiat amb profusió la mort cel·lular en pràcticament tots els contextos imaginables, i diversos paradigmes han intentat classificar i explicar els seus mecanismes. La pròpia definició de mort cel·lular és menys trivial del que a priori podria semblar, i malgrat la complexitat del concepte avui en dia sol considerar-se una cèl·lula morta quan exhibeix una permeabilització irreversible de la membrana plasmàtica o bé presenta una fragmentació completa (Galluzzi, Bravo-San Pedro et al. 2015). Pel que fa a la classificació dels tipus de mort cel·lular, actualment, s'accepta¹ una primera distinció general entre mort cel·lular accidental i regulada (ACD i RCD respectivament per les seves sigles angleses) (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

La mort cel·lular accidental inclou aquells casos en què es produeix una descomposició estructural de la cèl·lula de manera instantània i descontrolada després de l'exposició a estímuls extrems de naturalesa física (com ara altes temperatures o forces osmòtiques), química (com ara variacions extremes de pH o exposició a detergents potents) o mecànica (com ara forces de cisalla). Contràriament, en la mort cel·lular regulada s'hi inscriurien les situacions en què la mort es troba mitjançada per una certa maquinària molecular, que pot ser modulada genèticament i farmacològicament. Aquesta, es pot donar com a part de programes fisiològics (mort cel·lular programada, PCD) o ser activada davant el fracàs de respostes adaptatives a pertorbacions intra i extracel·lulars (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Fins fa pocs anys, la classificació de la mort cel·lular es realitzava majoritàriament en base a morfotips, distingint-se la mort cel·lular de tipus I (morfotip apoptòtic), de tipus II (morfotip autofàgic) i de tipus III (morfotip necròtic). Avui en dia, si bé la morfologia de la mort cel·lular ens pot aportar informació valuosa, sabem que els aspectes morfològics i funcionals de la mort cel·lular no estan necessàriament relacionats (Galluzzi, Bravo-San

¹ La mort cel·lular és un camp envoltat de polèmica, més encara en tot allò respectiu a la classificació. Per aquest motiu, en aquest treball s'acceptaran i usaran les recomanacions del Comitè de Nomenclatura de la Mort Cel·lular, recentment actualitzades (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

Pedro et al. 2015). També en relació amb anteriors classificacions de mort cel·lular, es considerava la mort que es manifestava en morfotips necròtics com a inflamatòria a nivell sistèmic, mentre que el morfotip apoptòtic es considerava fisiològicament més inocu, en ser reconeguts i retirats els cossos apoptòtics per part de fagòcits (Kloditz, Chen et al. 2016). Si bé en part aquestes consideracions segueixen sent vàlides, avui sabem que no sempre l'apoptosi és silent, ni tots els tipus de mort cel·lular que mostren morfologia necròtica comporten les mateixes conseqüències fisiològiques (Green, Oguin et al. 2016).

1.3.2. Tipus de mort cel·lular

La mort cel·lular programada és un procés ubic que es dona en tots els eucariotes multicel·lulars i que resulta indispensable per al desenvolupament i l'homeòstasi tissular (Kreuzaler i Watson 2012). Durant molts anys es va emprar el terme com a sinònim d'apoptosi, però avui en dia es coneixen múltiples formes de PCD i altres RCD que mostren gran plasticitat en l'execució de la mort (Kroemer, Galluzzi et al. 2009) i l'evasió de les quals suposa una característica fonamental de les cèl·lules tumorals (Hanahan i Weinberg 2011). Per a aquest treball resulten d'especial interès l'apoptosi, i la mort dependent de lisosomes (LDCD) i dependent d'autofàgia (ADCD). La Taula 1 inclou les característiques d'aquestes i de la resta de vies de mort cel·lular regulada actualment reconegudes.

1.3.2.1 Apoptosi

L'apoptosi és, sens dubte, el tipus de mort cel·lular més estudiat. Des de la seva definició en base a trets morfològics fa més de 40 anys (Kerr, Wyllie et al. 1972), se n'ha investigat a fons la maquinària molecular i totes les seves implicacions. Es tracta d'un programa de mort cel·lular sofisticat que serveix als organismes multicel·lulars per a eliminar cèl·lules danyades o senescent, amb múltiples implicacions patofisiològiques i una contribució cabdal als programes de desenvolupament (Hengartner 2000).

Es distingeixen dues vies principals d'apoptosi; l'extrínseca i la intrínseca. La via extrínseca s'inicia a la membrana plasmàtica mitjançant l'activació de la família de receptors *Death* o bé de receptors de dependència. L'activació comporta la formació del complex multiproteic DISC a la part intracel·lular del receptor, que opera com a plataforma moduladora de la caspasa 8. Aquesta caspasa, al seu torn, activa les caspases 3 i 7, entre d'altres executors de la mort cel·lular (Galluzzi, Vitale et al. 2018).

Tipus de mort	Desencadenants principals	Efectors principals	Morfotip
Apoptosi intrínseca	Estrès replicatiu, ROS, dany a DNA	Bcl-2, BAX, XIAP, caspases etc.	Apoptòtic
Apoptosi extrínseca	Diverses pertorbacions extracel·lulars	FAS, caspasa 8 etc.	Apoptòtic
Necrosi derivada de MPT	Estrès oxidatiu, sobrecàrrega Ca ²⁺	CYPD	Necròtic
Ferroptosi	Peroxidació lipídica	GPX4	Necròtic
Necroptosi	Pertorbacions intra i extracel·lulars diverses	RIPKs	Necròtic
Piroptosi	Invasió de patògens	Caspases inflamatòries, gasdermines	Morfotip propi
Parthanatos	Hiperactivació de PARP-1 en resposta a múltiples estímuls	AIF, MIF	Apoptòtic
Mort entòtica	Alteracions en l'adhesió entre cèl·lules	ROCK1/2	Autofàgic
Mort NETòtica	ROS, invasió microbiana	NADPH oxidases	Necròtic
Mort immunogènica	Infecció viral, quimioteràpia, radioteràpia	Múltiples	Autofàgic
ADCD	Diversos tipus d'estrès fisiològic	Maquinària autofàgica	Autofàgic
LDCD	ROS, fàrmacs lisosomotròpics	Catepsines	Divers

Taula 1. Característiques dels tipus de mort cel·lular acceptats per Comitè de Nomenclatura de la Mort Cel·lular 2018. MPT: Transició de permeabilitat de la membrana mitocondrial. ADCD: Mort cel·lular dependent d'autofàgia. LDCD: mort cel·lular dependent de lisosomes.

La via intrínseca, en canvi s'origina al mitocondri en resposta a diversos estímuls com ara excés de ROS, dany al DNA, estrès fisiològic de tot tipus, o disrupció del citoesquelet (Brumatti, Salmanidis et al. 2010). Mecanísticament, el pas crític és la permeabilització irreversible de la membrana mitocondrial externa (MOMP per les sigles angleses), que es troba controlada per proteïnes de la família de Bcl-2 (Tait i Green 2010). Subseqüentment, s'alliberen al citosol proteïnes apoptogèniques normalment residents al mitocondri, sobretot citocrom c i SMAC (Tait i Green 2013). Aquests elements precipiten la formació

d'un complex conegut com a apoptosoma que activa la caspasa 9, que al seu torn activa les caspases executores 3 i 7 (Groth-Pedersen i Jaattela 2013; Galluzzi, Vitale et al. 2018). Si bé aquestes caspases precipiten el procés de mort i desmantellament de la cèl·lula, cada cop més evidències suggereixen que no són essencials (Galluzzi, Bravo-San Pedro et al. 2015). Avui en dia es coneixen un gran nombre de proteïnes implicades en el procés i en la seva regulació i les dues vies d'apoptosi es troben connectades a través de la proteïna Bid (Groth-Pedersen i Jaattela 2013). Com s'ha exposat en pàgines anteriors, les cèl·lules tumorals es caracteritzen per evadir l'apoptosi, i per aquesta raó és de gran interès en el camp de l'oncologia la recerca de procediments per resensibilitzar les cèl·lules a la mort apoptòtica o cercar formes alternatives per matar-les com les que s'exposen tot seguit (Kreuzaler i Watson 2012; Groth-Pedersen i Jaattela 2013).

1.3.2.1 Mort cel·lular dependent d'autofàgia

Com s'ha exposat amb anterioritat, l'autofàgia actua en general com a mecanisme de supervivència i adaptació a l'estrès. No és estrany, doncs, que s'hagi descrit un augment d'autofàgia en moltes cèl·lules en procés de mort (Shen, Kepp et al. 2012). Aquesta observació va dur a la definició als anys 1980s d'un nou tipus de mort cel·lular, que es va anomenar mort programada tipus II i que estava basada sobretot en l'observació de nombrosos autolisosomes i característiques que no encaixaven amb l'apoptosi ni la necrosi (Clarke i Puyal 2012). De seguida, però, van sorgir dubtes sobre el paper de l'autofàgia en la mort cel·lular i sobre si es tracta sols d'un mecanisme que l'acompanya o també d'un mecanisme que l'executa mitjançant l'autodigestió total de la cèl·lula i constitueix per tant una via pròpia (Fulda i Kogel 2015). En les últimes recomanacions del Comitè de Nomenclatura de la Mort Cel·lular (NCCD per les sigles angleses) només s'accepta el terme mort cel·lular dependent d'autofàgia quan la maquinària autofàgica precipita la mort cel·lular (i per tant aquesta pot ser atenuada per inhibidors de l'autofàgia) i no quan l'aparell autofàgic simplement acompanya la mort cel·lular o modula altres vies com la ferroptosi, l'apoptosi o la necroptosi (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Malgrat aquestes recomanacions, la ADCD és probablement el més polèmic dels tipus de mort cel·lular i alguns científics dins el camp han advocat per la seva desaparició, en considerar que no existeixen evidències que l'autofàgia sigui un mecanisme de mort per ell mateix, i esgrimint la inespecificitat dels inhibidors d'autofàgia i els múltiples papers de les proteïnes implicades en el procés (Shen, Kepp et al. 2012).

Altres científics, per contra, no comparteixen aquests arguments, i recalquen les evidències que recolzen l'existència de la ADCD (Clarke i Puyal 2012). L'arrel del problema

es troba, probablement, en el poc coneixement que tenim sobre els determinants moleculars responsables d'implicar l'autofàgia en la mort cel·lular (Fulda i Kogel 2015). Sigui com vulgui i seguint els requeriments del Comitè NCCD, diversos antitumorals s'ha descrit que produïrien una mort dependent d'autofàgia, com ara obatoclastax (un inhibidor de Mcl-1) o temozolomida (un agent alquilant), i aquesta mort s'ha proposat com a mecanisme de reserva per evadir la resistència a apoptosi i sensibilitzar les cèl·lules tumorals a la quimioteràpia (Fulda i Kogel 2015).

1.3.2.2 Mort cel·lular dependent de lisosomes

Durant anys es va observar que en moltes cèl·lules en procés de mort es produïa una ruptura dels lisosomes, però es considerava un efecte secundari accidental de la mort (Edinger i Thompson 2004). L'escenari va canviar quan van començar a aparèixer evidències que la permeabilització de la membrana lisosomal (LMP per les sigles angleses) podria ser el motor que orquestrava una via de mort cel·lular alternativa a les anteriorment descrites (Ferri i Kroemer 2001). La LMP comporta un alliberament d'hidrolases lisosomals al citoplasma, de les quals les catepsines B, D i L semblen les més importants, en línia amb el fet que a pH citoplasmàtic retenen activitat proteolítica (Turk, Bieth et al. 1995; Kreuzaler i Watson 2012). Al citosol, aquestes catepsines actuarien com a proteases executores, amb un ampli ventall de dianes, algunes compartides amb les caspases. La relació entre LMP i apoptosi ha estat esquematitzada a la Figura 3.

Pel que fa a l'inici del procés, els desencadenants de la LMP són diversos. En alguns casos es produeix després d'una permeabilització de la membrana mitocondrial externa, en relació amb l'apoptosi, mentre que en molts altres casos la seqüència és inversa. La LMP també pot ser desencadenada per ROS, per TNF o per molècules lisosomòtrofes, entre d'altres, tot i que no sempre es coneix bé el mecanisme pel qual es permeabilitza la membrana (revisió de Groth-Pedersen i Jaattela 2013). Al seu torn, LMP indueix un augment de ROS que pot afectar la funció mitocondrial i l'homeòstasi cel·lular en general, comportant en alguns casos l'activació de caspases i un morfotip apoptòtic, i en d'altres casos executant la mort cel·lular per altres vies. La mort cel·lular relacionada amb LMP és diferent segons el grau de permeabilització. Quan es produeix una ruptura massiva del lisosoma s'alliberen tots els seus continguts al citosol, iniciant una cascada d'hidròlisi del contingut cel·lular i una acidificació de la cèl·lula que acaben en una mort ràpida més semblant a la mort accidental que a la regulada (Serrano-Puebla i Boya 2018). Per contra, quan es produeix una permeabilització parcial i progressiva, s'inicia una via de mort més regulada i amb la implicació de maquinària molecular específica.

Com s'ha exposat amb anterioritat, les cèl·lules tumorals en general presenten una major sensibilitat a les alteracions de la membrana lisosomal, i per tant una major vulnerabilitat a LMP i a la mort dependent de lisosomes (Groth-Pedersen i Jaattela 2013). Així, si bé hi havia fins fa pocs anys una idea general que aquesta ruta era impracticable com a estratègia terapèutica atesa la ubiqüitat dels lisosomes, darrerament sembla clar que els canvis lisosomals en cèl·lules tumorals permeten explorar-la.

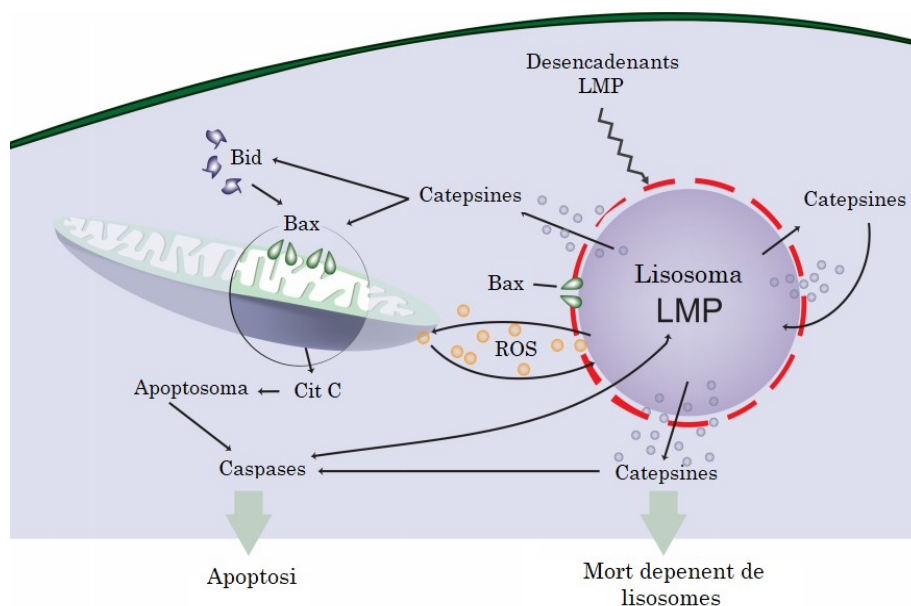


Figura 3. Implicacions sobre la mort cel·lular de la permeabilització de la membrana lisosomal. Adaptat de Serrano-Puebla i Boya 2018.

1.3.3. Plasticitat i causes últimes de les vies de mort cel·lular

Malgrat la tendència general a classificar i compartimentalitzar les diferents vies de mort cel·lular, cada cop es posa més èmfasi en la interconnexió entre els diferents mòduls de senyalització involucrats en la RCD. De fet, a mida que el coneixement sobre la mort cel·lular en totes les seves formes augmenta, es van descobrint més elements de convergència entre vies, i més casos en què un tipus de mort cel·lular en modula un altre.

Un dels casos en què s'ha caracteritzat més a fons aquesta interconnexió és entre l'autofàgia i l'apoptosi. Ambdós processos depenen d'una complexa xarxa de proteïnes, una part de la qual és compartida (Mukhopadhyay, Panda et al. 2014). L'element més rellevant conegut és, probablement Bcl-2, un regulador clau de tots dos processos que interacciona d'una banda amb Beclina-1 (important en autofàgia) i de l'altra amb Bax/Bak (important en apoptosi). A banda de Bcl-2, altres proteïnes tradicionalment apoptòtiques com PUMA o XIAP s'ha descrit que modulen l'autofàgia, mentre que algunes proteïnes tradicionalment autofàgiques com ATG3 o Beclina-1 s'ha descrit que regulen l'apoptosi

intrínseca (Marino, Niso-Santano et al. 2014; Mukhopadhyay, Panda et al. 2014). Això es relaciona amb l'observació que sovint un augment d'autofàgia i una activació de l'apoptosi es donen en la mateixa cèl·lula, majoritàriament de manera seqüencial i amb l'autofàgia precedint l'apoptosi, tot i que també s'ha observat a l'inrevés. Per explicar-ho, s'ha exposat que l'estrès a nivells subletals estimula l'autofàgia, però quan aquest estrès supera un cert llindar de duració o d'intensitat s'activa l'apoptosi. Aquesta observació també explicaria que molts estímuls que condueixen a la mort cel·lular també estimulin l'autofàgia (Marino, Niso-Santano et al. 2014).

La mort cel·lular dependent de lisosomes també es troba en part entrelaçada amb l'apoptosi i altres tipus de RCD. Així, la permeabilització de la membrana lisosomal pot observar-se com a efecte col·lateral de l'activació d'altres programes de RCD (Groth-Pedersen i Jaattela 2013; Serrano-Puebla i Boya 2018), mentre que en altres casos la LMP modula altres vies. Concretament, com ja s'ha comentat, les catepsines alliberades al citosol poden estimular el programa apoptòtic en diferents etapes (Droga-Mazovec, Bojic et al. 2008), en part a través de l'activació de la caspasa 3, de la qual es disposa de diverses evidències *in vivo* i *in vitro* (Hishita, Tada-Oikawa et al. 2001).

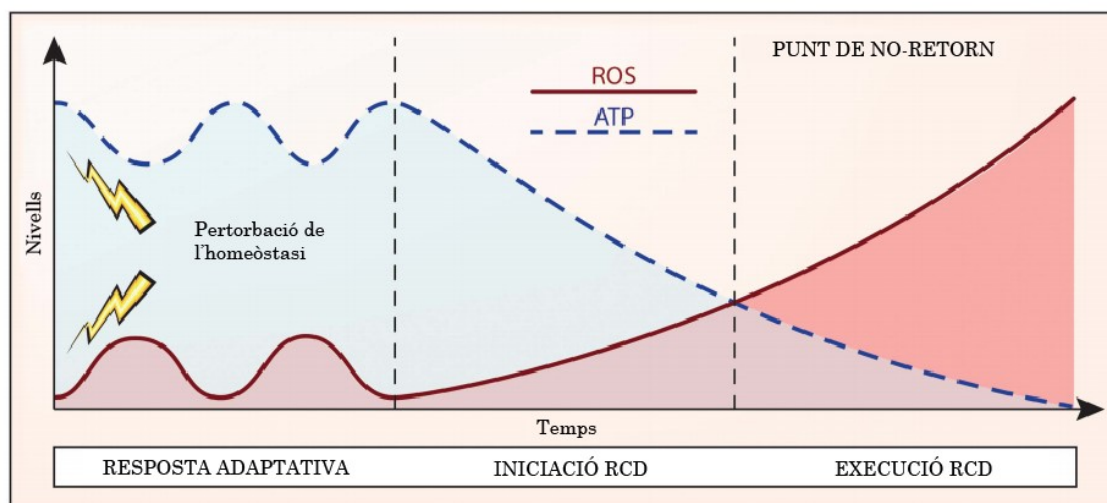


Figura 4. Alteracions causants de mort cel·lular. Adaptat de Galluzzi 2015

Si durant molts anys la recerca s'ha centrat en executors específics de vies de mort concretes, avui en dia creixen les veus que afirmen que aquests executors acceleren o gestionen la mort de la cèl·lula, més que no determinar-la causalment i que en serien per tant sols manifestacions bioquímiques. Darrere de tots els mecanismes relacionats amb la mort cel·lular i com a causa última hi trobaríem, segons autors com Guido Kroemer, crisis bioenergètiques i d'homeòstasi redox (Galluzzi, Bravo-San Pedro et al. 2015)(Figura 4).

D'una banda la davallada de nivells d'ATP aboliria l'activitat dels enzims ATP-dependents i de l'altra un desequilibri redox inactivaria diversos enzims i inflingiria dany oxidatiu a orgànuls i membranes (Brookes, Yoon et al. 2004). Al principi la resposta adaptativa intentaria fer front als desequilibris, però s'arribaria a un punt de no-retorn en què s'executarien els mecanismes de mort cel·lular. Ens podríem trobar doncs, davant de causes de mort cel·lular molt més homogènies i poc caracteritzades del que prèviament es creia (Vanden Berghe, Vanlangenakker et al. 2010), i amb dificultats afegides per a la recerca, com la complexitat d'inhibir-les farmacològicament (Galluzzi, Bravo-San Pedro et al. 2015). Malgrat tot, el coneixement sobre les causes últimes de la mort cel·lular segueix sent molt incomplet i queda molta recerca per endavant.

1.4. Antihistamínics

1.4.1 Farmacologia general dels antihistamínics

Els antihistamínics constitueixen un grup de fàrmacs divers a nivell estructural i farmacològic que actuen inhibint els efectes de la histamina sobre el receptor d'histamina H1 (HRH1). Són principalment emprats per a l'alleujament dels símptomes al·lèrgics de tot tipus provocats per l'alliberament d'histamina, tot i que alguns també es poden aplicar a la urticària idiopàtica crònica, l'insomni, el vertigen o el cinetisme (Carson, Lee et al. 2010). A excepció de l'acrivastina, la cetirizina, la levocetirizina, la desloratadina i la fexofenadina, els antihistamínics presenten un metabolisme hepàtic mitjançat pel sistema citocrom p450 (Simons i Simons 2002).

Tradicionalment els antihistamínics s'havien classificat en sis grups químics (Taula 2). Tanmateix, segons els seus efectes sobre el sistema nerviós central, que s'han anat disminuint en successives millores farmacològiques, els antihistamínics es divideixen en els grups de primera generació i de segona generació, una classificació de caire funcional que impera en l'actualitat. Les últimes dècades s'ha proposat l'ús del terme antihistamínics de tercera generació, que inclou els metabòlits actius de diversos antihistamínics de segona generació (levocetirizina, fexofenadina, norastemizole o desloratadina entre d'altres), si bé aquesta nomenclatura és polèmica, i el Grup de Consens Sobre els Antihistamínics de Nova Generació (CONGA per les seves sigles angleses) la desaconsella (Holgate, Canonica et al. 2003).

1.4.1.1. Antihistamínics de primera generació

Els antihistamínics de primera generació, desenvolupats entre les dècades dels 1940 i 1980, es caracteritzen per actuar sobre els receptors HRH1 tant perifèrics com centrals, atesa la seva capacitat de creuar la barrera hematoencefàlica (BHE)(Panula, Chazot et al. 2015). Així mateix, també destaquen per la seva potent activitat inhibidòria dels receptors muscarínics, i en menor mesura, serotoninèrgics i adrenèrgics. Aquestes propietats expliquen els seus efectes secundaris sobre el sistema nerviós central, principalment sedació, somnolència i disminució del processament cognitiu (Carson, Lee et al. 2010). Precisament els efectes secundaris indesitjats van ser el principal revulsiu per al descobriment de tota una nova generació d'antihistamínics que els evitessin.

1.4.1.2. Antihistamínics de segona generació

Durant la dècada dels 1980s van ser aprovats per la FDA terfenadina i astemizole, els primers antihistamínics de segona generació, que no mostraven els efectes secundaris dels

seus antecessors i en mantenien l'activitat antihistamínica. Si bé aquests dos fàrmacs van ser posteriorment retirats del mercat per efectes cardiotòxics relacionats amb el bloqueig de canals de potassi (Salata, Jurkiewicz et al. 1995; Simons i Simons 2011), van obrir camí als antihistamínics d'ús més comú avui en dia. Aquest grup d'antihistamínics es caracteritza per una menor afinitat per als receptors muscarínics, serotoninèrgics i adrenèrgics, i una major selectivitat envers els receptors HRH1 perifèrics respecte als centrals, donada sobretot per una menor capacitat per creuar la BHE. Aquestes propietats permeten uns efectes secundaris sobre el sistema nerviós central molt limitats (Simons 2004), fet que va suposar un gran pas endavant en la seva seguretat i en l'extensió del seu ús. Els avenços en la seguretat, a més, van anar acompanyats d'increments en la vida mitjana dels fàrmacs, permetent l'administració de sols una o dues dosis diàries, en comptes de les múltiples dosis diàries que requerien els antihistamínics de primera generació (Blais 2004).

Paral·lelament al desenvolupament clínic d'aquests fàrmacs, s'ha avançat en el coneixement sobre la farmacologia molecular dels antihistamínics, i s'ha determinat que la seva acció sobre HRH1 és d'agonisme invers i no d'antagonisme (Bakker, Wieland et al. 2000), és a dir, que no només impedeixen l'efecte de la histamina sobre HRH1 sinó que a més inhibeixen l'activitat constitutiva del receptor.

Grup químic	Grup funcional	
	Primera generació	Segona generació
Alquilamines	Bromfeniramina Clorfeniramina Dimetindè Feniramina Triprolidina	Acrivastina
Piperazines	Buclizina Ciclizina Hidroxizina Mebhidrolina Meclizina Oxatomida	Cetirizina <i>Levocetirizina</i>
Piperidines	Azatadina Ciproheptadina Difenilpiralina	Astemizole Bilastina <i>Desloratadina</i>

	Ketotifèn	Ebastina <i>Fexofenadina</i> Levocabastina Loratadina Mizolastina <i>Norastemizole</i> Olopatadina Rupatadina Terfenadina <i>Eletirizina</i>
Etanolamines	Carbinoxamina Clemastina Difenhidramina Dimenhidrinat Doxilamina Feniltoloxamina	
Etilendiamines	Antazolina Pirilamina Tripeleennamina	
Fenotiazines	Mequitazina Metdilazina Prometazina Trimeprazina	
Altres	Doxepina	Azelastina Emedastina Epinastina

Taula 2 . Llistat d'antihistamínics segons classificació química i funcional. En cursiva els antihistamínics considerats per alguns autors com de tercera generació.

1.4.1.3. Estudis de l'ús d'antihistamínics i càncer

Diversos estudis epidemiològics han analitzat la relació entre l'ús d'antihistamínics i el risc de desenvolupar càncer, la majoria dels quals no han trobat cap associació rellevant (Cianchi, Vinci et al. 2008). Sigui com vulgui, els resultats globals són complexos i sovint contradictoris i resulta complicat extreure'n conclusions (Faustino-Rocha, Ferreira et al. 2017).

Pel que fa al potencial dels antihistamínics com a antitumorals, s'han realitzat un bon nombre d'estudis, alguns dels quals es troben resumits a la Taula 3. Una abassegadora majoria dels estudis preclínics publicats observen una disminució del creixement tumoral o una inducció d'apoptosi en càncers de tot tipus, sobretot amb l'ús de terfenadina, loratadina, ciproheptadina i astemizole. D'especial interès per aquest treball resulta remarcar el fet que diversos estudis han trobat efectes molt diferents d'antihistamínics estructuralment similars. Així, tant en LMC com en càncer de pulmó s'han observat efectes antitumorals potents amb loratadina i terfenadina que no es produïen amb fexofenadina, i s'han proposat mecanismes d'acció antitumoral independents de HRH1 (Aichberger, Mayerhofer et al. 2006; Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016).

Càncer	Fàrmac	Acció	Referència
Carcinoma de còlon	Loratadina	Sensibilització a radioteràpia	Soule, Simone et al. 2010
Carcinoma de pròstata	Terfenadina	Inhibició de la proliferació, inducció d'apoptosi	Wang, Chen et al. 2014
Carcinoma ductal invasiu	Astemizole	Inhibició de la proliferació	Garcia-Quiroz, Garcia-Becerra et al. 2012
Melanoma	Terfenadina, astemizole, difenhidramina, triprolidina	Inducció d'apoptosi	Jangi, Diaz-Perez et al. 2006
Leucèmia mastocítica	Terfenadina, loratadina	Inducció d'apoptosi	Hadzijušufovic, Peter et al. 2010
Adenocarcinoma de còlon	Meclizina	Disminució del número de cèl·lules	Lin, Ho et al. 2007
Càncer de mama	Clorfeniramina	Disminució del número de cèl·lules	Medina, Garcia de Veas et al. 1995
Melanoma	Terfenadina	Inducció d'apoptosi i autofàgia	Nicolau-Galmes, Asumendi et al. 2011
Limfoma de cèl·lules del mantell	Ciproheptadina	Inducció d'apoptosi, sinergisme amb bortezomib	Paoluzzi, Scotto et al. 2009
Limfoma T	Desloratadina,	Inducció apoptosi	Dobbeling, Waeckerle-

	clemastina		Men et al. 2013
Melanoma	Loratadina, astemizole	Promoció del creixement tumoral	Brandes, Warrington et al. 1994
Carcinoma hepatocel·lular	Ciproheptadina	Remissió en dos pacients	Feng, Feng et al. 2012
Càncer de pulmó de cèl·lula no petita	14 antihistamínic	Només els antihistamínic catiònics amfifílics indueixen mort cel·lular	Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016
Leucèmia Mieloide Crònica (LMC)	Loratadina, fexofenadina, terfenadina	Fexofenadina sense efecte. Loratadina i terfenadina inhibició del creixement	Aichberger, Mayerhofer et al. 2006

Taula 3. Estudis realitzats amb antihistamínic en càncer. Adaptat de Faustino-Rocha, Ferreira et al. 2017

1.4.2. La histamina i els receptors d'histamina

1.4.2.1 La histamina

La histamina és una amina biogènica endògena ubiqua al cos humà que va ser descrita en un ésser viu per primer cop l'any 1910, quan Dale i Laidlow la van aïllar del fong paràsit *Claviceps purpurea* i en van descriure els primers efectes fisiològics (Dale i Laidlaw 1910). Aquesta, es sintetitza i s'emmagatzema en grànuls en basòfils i mastòcits i la seva síntesi es produeix a partir de la descarboxilació de l'aminoàcid L-histidina mitjançada per l'enzim histidina descarboxilasa (HDC, Figura 5)(Parsons i Ganellin 2006). El catabolisme es produeix a través de dues vies enzimàtiques: la via de la histamina-N-metiltransferasa (HNMT) i la via de la diamina-oxidasa (DAO), cadascuna de les quals resulta de més rellevància en determinats teixits o contextos fisiològics (Maintz i Novak 2007).

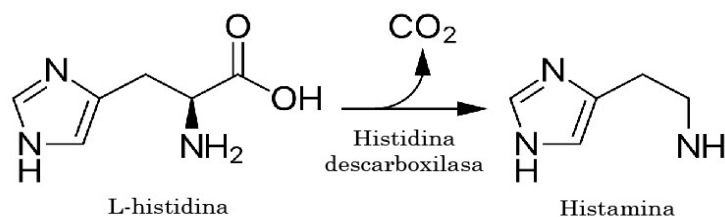


Figura 5. Síntesi de la histamina

La histamina actua com a mediador pliotròpic i es troba involucrada en múltiples processos fisiològics i patofisiològics. A grans trets, es pot descriure com a neurotransmissor al sistema nerviós i com a mediador local a l'intestí, la pell i el sistema immune. Dins el seu ampli rang d'accions podem destacar la inflamació, la contracció muscular, la dilatació de capil·lars, la quimiotaxi, la secreció d'àcid gàstric i la neurotransmissió (Panula, Chazot et al. 2015).

1.4.2.2. Els receptors d'histamina

Aquesta plètora d'accions mediatees per histamina es produeixen a través dels receptors d'histamina (HR), dels quals avui en dia en coneixem 4 (HRH1-4). Aquests receptors formen part de la família de receptors acoblats a proteïnes G (GPCR), caracteritzats pels seus set dominis transmembrana i la seva senyalització a través de proteïnes G heterotrimèriques.

L'especificitat de la resposta a histamina ve donada per l'acció sobre els diferents receptors i les diferents subunitats de proteïnes G implicades. A això hi contribueix el fet que les concentracions locals relatives d'histamina requerides per a l'activació dels receptors varia segons el subtipus, tenint els receptors HRH1 i HRH2 una afinitat més baixa que HRH3 i HRH4.

Com a GPCRs, els HRHs es troben en un equilibri dinàmic entre la conformació activa i inactiva del receptor. La histamina actua com a agonista afavorint la conformació activa, mentre que els antagonistes dels diversos receptors actuen impedit l'acció de la histamina, i els agonistes inversos afavorint la conformació inactiva en contextos d'activitat constitutiva, que s'ha descrit en tots 4 HRHs (Leurs, Hoffmann et al. 2002; van Rijn, Chazot et al. 2006; Bongers, Krueger et al. 2007; Smit, Vischer et al. 2007; Bakker, Jongejan et al. 2008). També rellevant per a la seva activitat resulta el fet que els HRHs, com la majoria de GPCRs, es troben a la membrana formant homooligòmers i heterooligòmers (Fukushima, Asano et al. 1997; Hancock, Esbenshade et al. 2003; Leurs, Vischer et al. 2011).

HRH1

Les primeres evidències de l'existència d'aquest receptor van venir amb la caracterització farmacològica mitjançant antagonistes l'any 1937 (Staub i Bovet 1937), tot i que no va ser clonat fins el 1991 (Yamashita, Fukui et al. 1991). Es tracta del receptor d'histamina més ubic, ja que es troba distribuït àmpliament al cos en teixit vascular i muscular, en

condròcits, hepatòcits, cèl·lules endotelials, cèl·lules dendrítiques, monòcits, neutròfils, limfòcits Bs i Ts, sistema nerviós i cervell (Togias 2003; Panula, Chazot et al. 2015). Cal remarcar que l'expressió del receptor al cos humà s'ha estudiat per molts mètodes diferents, i cal prendre's les dades d'expressió amb cautela. A través de HRH1 la histamina duu a terme gran part de les seves accions, com ara la neurotransmissió, la broncoconstricció, la permeabilitat vascular i les respostes al·lèrgiques (Panula, Chazot et al. 2015). Les accions dels seus antagonistes i agonistes inversos han estat anteriorment tractats. També el seu paper en el sistema immune ha estat extensament estudiat; HRH1 bloqueja la immunitat humoral i estimula la cel·lular a nivell de limfòcits B, mentre que en cèl·lules Th1 estimula la producció d'interferó gamma i en cèl·lules dendrítiques incrementa la capacitat presentadora d'antigen (Jutel, Watanabe et al. 2001; Jutel, Akdis et al. 2009).

Pel que fa a la seva senyalització, HRH1 és un receptor acoblat a proteïna $G_{q/11}$ (Gutowski, Smrcka et al. 1991; Leopoldt, Harteneck et al. 1997; Moniri, Covington-Strachan et al. 2004), tot i que en alguns sistemes també s'ha observat senyalització per G_i/G_o (Seifert, Hagedluken et al. 1994; Wang i Kotlikoff 2000). Així doncs, produeix els seus efectes principalment mitjançant una activació de la fosfolipasa C, que activa al seu torn la proteïna cinasa C (PKC) i desencadena en última instància un alliberament d'ions de calci de compartiments d'emmagatzematge intracel·lulars.

HRH2

La identificació d'aquest receptor també va ser inicialment farmacològica, després d'observar que antagonistes de HRH1 no eren capaços bloquejar alguns dels efectes de la histamina (Black, Duncan et al. 1972). Malgrat la seva expressió és molt alta en estómac i cervell, es tracta d'un receptor ubic que també s'expressa en musculatura llisa, condròcits, cèl·lules endotelials i epitelials, neutròfils, eosinòfils, monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i limfòcits T i B (Jutel, Akdis et al. 2009). La seva acció principal és l'estimulació de la secreció d'àcid gàstric, motiu pel qual antagonistes d'aquest receptor tals com cimetidina i ranitidina s'usen àmpliament contra el reflux gastro-esofàgic. La seva acció es produeix principalment a través d'una activació d'adenilat ciclasa mitjançada per subunitats G_s .

HRH3

L'adveniment del receptor HRH3 a la recerca sobre els receptors d'histamina l'any 1983 (Arrang, Garbarg et al. 1983) va posar de relleu la importància de la histamina com a

neurotransmissor, una funció que fins llavors havia estat subestimada. En concordança amb el seu paper en la neurotransmissió, es troba expressat principalment en neurones (neurones histaminèrgiques), i en menor mesura en monòcits, cèl·lules dendrítiques i eosinòfils (Jutel, Akdis et al. 2009). Actua principalment com a receptor presinàptic, i té un paper rellevant en la regulació de l'alliberament de la dopamina, la serotonina, la noradrenalina i l'acetilcolina (Nieto-Alamilla, Marquez-Gomez et al. 2016). Per aquest motiu, les darreres dècades s'ha suscitat interès en el desenvolupament d'antagonistes de HRH3 per al tractament de diverses malalties del sistema nerviós central. Avui en dia, només pitolisant, un agonista invers de HRH3, ha arribat a la pràctica clínica com a tractament per a la narcolèpsia. HRH3 és un GPCR acoblat a proteïna G_i/G_0 que provoca una disminució en els nivells de cAMP (Bongers, Krueger et al. 2007).

HRH4

L'últim receptor en afegir-se a la família dels receptors d'histamina va arribar a principis del 2000 quan sis grups independents en van anunciar el clonatge (Nakamura, Itadani et al. 2000; Oda, Morikawa et al. 2000; Liu, Ma et al. 2001; Morse, Behan et al. 2001; Nguyen, Shapiro et al. 2001; Zhu, Michalovich et al. 2001; O'Reilly, Alpert et al. 2002). HRH4 es troba altament expressat en teixit hematopoètic, sobretot en eosinòfils, neutròfils, basòfils, cèl·lules dendrítiques i mastòcits, amb una expressió residual en altres teixits (Jutel, Akdis et al. 2009). HRH4 és el centre d'una intensa recerca i ja se n'han descrit diverses funcions, la majoria de les quals relacionades amb processos inflamatoris (Zampeli i Tiligada 2009). Encara queda molta recerca per endavant, però, per tenir una imatge clara de la seva funció fisiològica i cercar-ne aplicacions, si bé alguns antagonistes del receptor ja han demostrat efectes antipruriginosos en assaigs clínics (Panula, Chazot et al. 2015; Thurmond, Venable et al. 2017). HRH4, com HRH3, pertany a la classe de GPCRs acoblats a G_i/G_0 , tot i que encara resten molts aspectes de la seva senyalització per elucidar (Nijmeijer, de Graaf et al. 2012).

1.4.2.3. Histamina, receptors d'histamina i càncer

Al llarg dels anys 50 i 60, un seguit d'estudis liderats per Kahlson i Rosengren van constatar que la síntesi d'histamina es trobava elevada en contextos cel·lulars de proliferació ràpida, com ara en l'embaràs, la germinació de llavors o la implantació de tumors en rates (Kahlson, Rosengren et al. 1958; Kahlson i Rosengren 1959; Kahlson i Rosengren 1963; Kahlson, Rosengren et al. 1963; Ahlstrom, Johnston et al. 1966; von Haartmann, Kahlson et al. 1966). Totes aquestes observacions van dur a la formulació del

que s'anomenà hipòtesi de Kahlson, segons la qual la histamina seria un mediador important del creixement cel·lular.

Malgrat la hipòtesi ha arribat ja al mig segle de vida, encara avui suscita polèmica. Estudis realitzats les últimes dècades han observat un augment de la síntesi d'histamina en tot tipus de tumor incloent melanoma (Hegyesei, Somlai et al. 2001), carcinoma de pulmó de cèl·lules petites (Graff, Frungieri et al. 2002), carcinoma mamari (Garcia-Caballero, Neugebauer et al. 1994), càncer d'endometri (Chanda i Ganguly 1995), carcinoma colorectal (Garcia-Caballero, Neugebauer et al. 1988) o leucèmia limfoblàstica aguda (Malaviya i Uckun 2000). Nogensmenys, la implicació directa de la histamina sobre el creixement tumoral encara no compta amb cap evidència (Rivera, Cricco et al. 2000; Cianchi, Vinci et al. 2008).

De fet, paradoxalment, també s'han descrit efectes antitumorals d'histamina *in vivo*, (Thoren, Aurelius et al. 2011). El cas més paradigmàtic seria precisament la LMA, malaltia en què s'ha aprovat l'ús d'hidroclorur d'histamina en combinació amb interleucina-2 com a teràpia de manteniment, basant-se en el seu potencial per evitar la immunosupressió produïda per cèl·lules mieloides immadures (Brune, Hansson et al. 1996; Thoren, Romero et al. 2009; Yang i Perry 2011; Hallner, Aurelius et al. 2015; Cuapio, Post et al. 2016; Bernson, Hallner et al. 2017).

Tot aquest cos d'evidències dibuixa un escenari confús, sobretot degut als efectes sovint contradictoris que s'ha observat que exerceix la histamina en el creixement tumoral a través dels seus receptors, que comparteixen agonista però no conseqüències fisiològiques.

Diversos estudis han aprofundit, també, en el paper de cadascun dels receptors en diferents tipus de tumor. En teixit mamari s'ha observat expressió dels 4 receptors d'histamina en lesions tant benignes com malignes, tot i que amb regulacions diferents, i s'ha associat HRH3 i HRH4 a la progressió tumoral (Cricco, Davio et al. 1994; Lemos, Davio et al. 1995; Rivera, Cricco et al. 2000; Medina, Croci et al. 2008). En melanoma, també s'ha descrit l'expressió dels quatre receptors d'histamina (Hegyesei, Somlai et al. 2001; Massari, Nicoud et al. 2017), i s'ha destacat la rellevància de HRH2 i HRH4 per a la proliferació mitjançada per histamina (Ucar 1991; Pos, Safrany et al. 2005; Tomita, Nakamura et al. 2005; Massari, Nicoud et al. 2017). Aquests dos receptors, fins i tot, s'han proposat com a diana terapèutica. En carcinomes de còlon s'ha detectat l'expressió dels receptors HRH1,

HRH2 i HRH4, però sent l'expressió de HRH1 i 4 més baixa en tumors que en mucosa colònica normal (Cianchi, Cortesini et al. 2005; Boer, Helinger et al. 2008). En definitiva, tots els receptors d'histamina coneguts han estat estudiats en alguns tumors, i si bé en la majoria de casos s'ha observat una expressió clara, la seva rellevància per a la progressió tumoral dista d'estar aclarida.

1.5. Propietats fisicoquímiques i distribució subcel·lular de fàrmacs

1.5.1. Propietats fisicoquímiques en farmacologia

Durant el desenvolupament de nous fàrmacs resulta fonamental considerar no només la seva potència contra una diana concreta, sinó també les seves propietats farmacològiques referents a l'absorció, distribució, metabolisme i excreció (anomenades propietats ADME), dos requeriments que sovint remen en direccions oposades però que han de ser compaginats (Gleeson, Hersey et al. 2011). Les propietats ADME són sovint sondejades a les primeres fases del desenvolupament en base a les característiques fisicoquímiques dels compostos, amb què estan estretament relacionades. En aquest sentit, un seminal article de Lipinski va establir les bases d'aquesta relació introduint la que es va anomenar Regla del 5 de Lipinski (Lipinski, Lombardo et al. 2001), i que destacava la importància del pes molecular, la hidrofobicitat, i el número de donadors i acceptors d'enllaços d'hidrogen.

Per al desenvolupament de fàrmacs orals cal trobar un difícil equilibri en què la molècula sigui prou polar per ser soluble en el sistema digestiu, però no massa polar, per poder creuar membranes. Un dels paràmetres més rellevants per determinar la idoneïtat de les molècules és el logP, un coeficient de partició que informa de la hidrofobicitat de la molècula, i que es calcula experimentalment a partir de la concentració de molècula resident en un medi altament hidròfob (octanol) i altament hidròfil (aigua) després de barrejar les tres substàncies (Equació 1). En molts casos, els valors que s'empren de logP són càlculs predictius fets a partir de valors experimentals coneguts d'altres molècules, anomenant-se logP calculat o cLogP (Leo, Hansch et al. 1971). Sigui empíric o calculat, valors més alts de logP denoten una major hidrofobicitat, i la Regla del 5 de Lipinski suggereix que per a molècules amb bon ADME s'hauria de complir que $\log P < 5$, ja que valors més alts dificulten la solubilitat dels compostos (Lipinski, Lombardo et al. 2001). Un dels problemes habituals en els logP calculats és que s'assumeix la neutralitat de la molècula. Quan una molècula es troba carregada presenta, però, molts canvis en la polaritat, provocant discrepàncies entre logP calculat i experimental. Per corregir aquesta problemàtica es va desenvolupar un altre coeficient anomenat de distribució (logD, Equació 1), que permet a més expressar la hidrofobicitat en funció del pH (Manners, Payling et al. 1988).

$$P = \frac{[\text{molècula}]_{\text{octanol}}}{[\text{molècula}]_{\text{H}_2\text{O}}} \quad D_{pH} = \frac{[\text{molècula neutra}]_{\text{octanol}}}{[\text{molècula neutra}]_{\text{H}_2\text{O}} + [\text{molècula carregada}]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Equació 1. Coeficients de partició (P) i de distribució (D).

1.5.2. Distribució subcel·lular de fàrmacs

L'eficàcia clínica de les molècules petites és el resultat final de la interacció de diversos processos farmacocinètics i farmacodinàmics, i està influïda per la seva distribució en teixits i a nivell subcel·lular (Vater, Mockl et al. 2017). L'acció farmacològica de molts compostos, de fet, es dona dins la cèl·lula i per tant és important conèixer els paràmetres i mecanismes que en determinen l'entrada i la distribució als diferents orgànuls, que representen espais fisiològics distints (Scott, Ghosh et al. 2017). Els dos mecanismes principals d'entrada i acumulació a la cèl·lula són el transport mitjançat per proteïnes i la difusió lipoïdal passiva, si bé hi ha opinions discordants sobre la importància relativa de cadascun dels mecanismes (Smith, Artursson et al. 2014). En general, es considera que la difusió lipoïdal passiva és més important en aquelles molècules amb $\log D_{7,4}$ positiu i baixa capacitat per formar enllaços d'hidrogen (determinat per una baixa àrea topològica de la superfície polar o TPSA)(Cruciani, Crivori et al. 2000).

Un cop dins la cèl·lula, la distribució subcel·lular es troba sobretot determinada per les característiques elèctriques i de pH dels diferents compartiments (resumits a la Taula 4), així com en alguns casos per la unió a elements moleculars específics. S'ha descrit l'acumulació específica de fàrmacs al citosol, al nucli, als mitocondris, al reticle endoplasmàtic, a l'aparell de Golgi i al compartiment endolisosomal, i aquesta acumulació s'ha relacionat amb les característiques fisicoquímiques dels fàrmacs. Especialment estudiada ha estat la relació d'aquestes característiques amb l'acumulació endolisosomal, basada principalment en el diferencial de pH, i mitocondrial, basada principalment en el seu potencial de membrana (Scott, Ghosh et al. 2017).

Compartiment	pH	$\Delta\Psi$ (mV)
Citosol	7,2	-40
Nucli	4-5	-15
Matriu mitocondrial	8	-170
Espai intermembranós mitocondrial	6,8	0
Lisosomes	4-5	+19

Taula 4. Potencials de membrana i valors de pH típics dels diferents compartiments subcel·lulars en cèl·lules de mamífer. $\Delta\Psi$: potencial de membrana. Dades extretes de diverses fonts (Mazzanti, Bustamante et al. 2001; Casey, Grinstein et al. 2010; Scott, Ghosh et al. 2017).

D'una banda el mecanisme més comú d'acumulació endolisosomal és l'anomenat "atrapament iònic" (esquematzat a la Figura 6), fonamentat en la ionització al pH àcid d'aquest compartiment de bases febles i la negligible permeabilitat dels compostos un cop carregats que fa que entrin a l'òrganul però no puguin sortir-ne (Scott, Ghosh et al. 2017). D'altra banda també s'ha documentat l'acumulació en mitocondris de compostos catiònics donada pel potencial de membrana negatiu de l'òrganul, coneixement que s'ha explotat per al disseny de fàrmacs amb dianes mitocondrials (Chernyak, Antonenko et al. 2013). Per conjuminar totes aquestes observacions en un sol model, s'ha proposat que els efectes del diferencial subcel·lular de pH predominarien en la distribució de fàrmacs amb pK_a s intermedis, mentre que els efectes del potencial de membrana serien determinants en bases amb pK_a més gran de 9-10 i àcids amb pK_a més baix de 4-5 (Chernyak, Antonenko et al. 2013).

Pel que fa a paràmetres fisicoquímics generals, s'ha observat que els fàrmacs que s'acumulen tant a mitocondris com a lisosomes tenen més tendència a incomplir la regla del 5 de Lipinski, sobretot pel que fa al logP; concretament, un 85% dels fàrmacs aprovats per la FDA segueixen la regla, mentre que dels fàrmacs que s'ha descrit que s'acumulen a lisosomes i mitocondris només serien el 66% (Zheng, Tsai et al. 2011). Encara un altre estudi, realitzat amb la línia cel·lular de LMA HL-60 i un reduït grup fàrmacs d'acumulació lisosomal o mitocondrial ha proposat que el factor més determinant no seria el logP en sí sinó la seva variació en funció del pH, en observar-se logPs més independents de pH en els fàrmacs d'acumulació mitocondrial i el contrari en els d'acumulació lisosomal (Duvvuri, Gong et al. 2004).

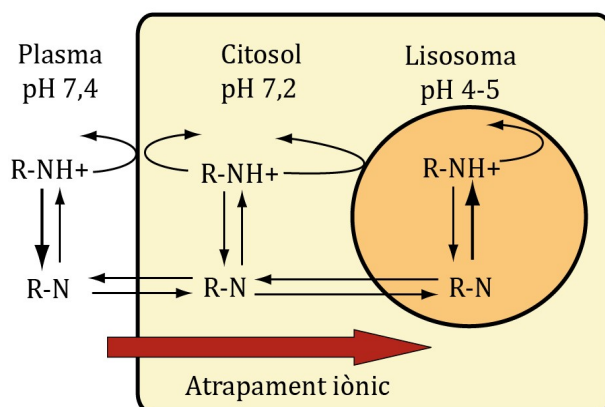


Figura 6. Mecanisme d'atrapament iònic. Les fletxes horitzontals representen difusió passiva i les verticals equilibris àcid-base

Aquesta distribució subcel·lular pot afavorir l'acció dels fàrmacs que es trobin concentrats als orgànuls on tenen la diana, però en moltes ocasions s'associa a una disminució de la seva efectivitat, com és el cas de diversos agents antitumorals que són bases febles i tendeixen a acumular-se en lisosomes (per exemple doxorubicina i daunorubicina) (Duvvuri, Gong et al. 2004). D'altra banda, s'ha plantejat l'ús en càncer de fàrmacs d'acumulació mitocondrial, en base a l'observació que quan es produeix aquesta acumulació desencadena una davallada de nivells d'ATP, sovint seguida de mort cel·lular. A més, les cèl·lules transformades tindrien un potencial de membrana negatiu més potent, afavorint els efectes diferencials (Modica-Napolitano i Weissig 2015).

1.5.3. Lisosomotropisme, mitocondriotropisme i compostos catiónics amfífils

El concepte de **lisosomotropisme** va ser encunyat per l'equip del mateix De Duve els anys 70 per descriure els compostos que eren 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, de Barsey et al. 1974). Concretament, des dels anys 40 s'havia descrit que alguns fàrmacs induïen una acumulació de fosfolípids en teixits (fosfolipidosi) que a nivell cel·lular es manifestava en una extensiva vacuolització del citoplasma i l'aparició de múltiples cossos lamel·lars. Gràcies al coneixement adquirit les dècades següents sobre els lisosomes es van poder reinterpretar les observacions com a manifestacions del lisosomotropisme, que d'una banda generava una resposta adaptativa de la cèl·lula i de l'altra impedia el catabolisme de fosfolípids (de Duve, de Barsey et al. 1974; Kazmi, Hensley et al. 2013). Avui sabem, a més, que els vacúols observats als estudis morfològics sorgeixen de la coalescència d'orgànuls i vesícules principalment del compartiment endolisosomal (Goldman, Funk et al. 2009).

D'entre els compostos lisosomòtrops avui reconeguts, es distingeixen els de classe I, compostos hidròfils com l'amoni o l'etilamina, en general ben tolerats per les cèl·lules, i els de classe II, hidròfobs, que en general indueixen la mort cel·lular a concentracions micromolars (Kuzu, Toprak et al. 2017). En endavant, ens referirem sols als compostos lisosomòtrops de classe II, molt més estudiats i rellevants per al present treball. Pel que fa als mecanismes d'entrada al lisosoma, si bé se n'han descrit diversos, el que es considera més rellevant i l'únic capaç d'explicar graus elevats d'acumulació és l'entrada per difusió passiva, que a més encaixa en el model de l'atrapament iònic (Goldman, Funk et al. 2009).

La majoria de compostos lisosomòtrops posseeixen una estructura amfifílica, formada per un cap hidròfob i una estructura lateral amb una amina protonable que actua de base feble

($pK_a > 6-7$) (Kazmi, Hensley et al. 2013; Seo, Jha et al. 2014). Per aquest motiu, aquests fàrmacs s'han anomenat fàrmacs catiónics amfifílics (CAD per les sigles angleses), i constitueixen un grup heterogeni format sobretot per antimalàrics, antiarrítmics, antidepressius, antipsicòtics i antihistamínics (Kazmi, Hensley et al. 2013). L'estructura fisicoquímica és per tant un element fonamental, i estudis d'estructura-activitat han determinat que el lisosomotropisme augmenta amb el volum del cap hidròfob i amb l'amfifilicitat (Logan, Kong et al. 2014). L'estructura dels CADs determina que puguin creuar membranes amb facilitat i protonar-se en medi àcid, com exigeix l'atrapament iònic; en definitiva, ser més permeables a pH fisiològic i menys a pH àcid i acumular-se primer al citosol en tenir un pH lleugerament més àcid del fisiològic i posteriorment en orgànuls àcids (Seo, Jha et al. 2014). A més, aquesta estructura els permet intercalar-se a la membrana lisosomal, afectant enzims fonamentals per al metabolisme d'esfingolípid com l'esfingomielinasa àcida, facilitant la permeabilització de la membrana i provocant d'altres conseqüències cel·lulars (Kornhuber, Tripal et al. 2010).

L'acumulació de CADs repercuteix, com s'ha exposat amb anterioritat, en un increment temporal del pH, si bé no sempre, i amb una entrada d'aigua per pressió osmòtica, que juntament amb la intercalació a la membrana contribueixen en gran mesura a l'aparença vacuolar (Logan, Kong et al. 2014; Seo, Jha et al. 2014). Tot plegat, dificulta, a més, l'acció normal de l'orgànul i la seva fusió amb autofagosomes (Logan, Kong et al. 2014).

Una ingent quantitat de treballs han estudiat el paper i acumulació dels CADs als lisosomes, però molts menys esforços s'han dedicat al seu patró global de distribució subcel·lular, en part per culpa de la manca de tècniques adients. Recentment, però, l'obtenció gràcies a eines de la química click d'un CAD fluorescent derivat d'antidepressius (azidobupramina), ha permès conèixer-ne molt més. Concretament s'ha observat que la dinàmica de distribució subcel·lular és dependent del temps i de la concentració de CAD. Temporalment, el primer punt d'acumulació és el compartiment mitocondrial, que els autors expliquen principalment per la protonació dependent de voltatge a l'espai intermembranós. Aquesta acumulació es produeix en menys de 40 minuts però es perd en el temps a baixes concentracions ($1 \mu\text{M}$) o es manté estable a concentracions més altes ($5 \mu\text{M}$). En canvi, l'acumulació al compartiment endolisosomal es produeix entre els 40 minuts i les 24 h i segueix creixent fins a assolir un pic a les 48h, superant en molt l'acumulació inicial a mitocondris, tant a baixes com a altes concentracions. El compartiment autofagosomal, per la seva banda, només presenta acumulacions modestes a altes concentracions i temps llargs (Vater, Mockl et al. 2017). Si bé l'extrapolació

d'aquestes observacions a d'altres CADs i diferents tipus de cèl·lules no té per què ser directa, sí que suposen un precedent d'interès quant a la dinàmica dels CADs.

Un altre fet que aquests descobriments palesen és la poca atenció que en general ha rebut el mitocondriotropisme en comparació al lisosomotropisme; aquest segon més espectacular i fàcil de detectar, i la compatibilitat de l'acumulació simultània de compostos a diferents orgànuls.

El **mitocondriotropisme**, contràriament al concepte de lisosomotropisme, no implica una acumulació exacerbada de compostos al mitocondri, sinó més aviat un accés a aquest (Horobin, Trapp et al. 2007; Grancara, Zonta et al. 2015). Diversos estudis han mostrat la tendència mitocondriòtrofa de compostos hidrofòbics amb càrregues positives deslocalitzades o de CADs (Horobin, Trapp et al. 2007), en línia amb les troballes recentment descrites per a l'azidobupramina. La presència d'aquests agents mitocondriòtrofs a l'orgànul duu en general a un augment de ROS, que pot succeir per diversos mecanismes (Grancara, Zonta et al. 2015) i que té profundes implicacions per a l'homeòstasi mitocondrial.

1.5.4. Propietats fisicoquímiques dels antihistamínics

Com s'ha tractat en anteriors apartats, els antihistamínics són un grup divers de fàrmacs amb propietats fisicoquímiques també diverses. Fins i tot entre antihistamínics de segona generació estructuralment similars s'observen notables diferències, sobretot a nivell d'hidrofobicitat, que en determinen en bona part les diferències en les propietats ADME. Així, per exemple, cetirizina, fexofenadina i acrivastina mostren majoritàriament una excreció renal o biliar directa, mentre que la majoria dels altres mostren un metabolisme hepàtic que n'augmenta la polaritat facilitant-ne l'excreció (Simons i Simons 2002). Aquestes diferències són també rellevants quant al volum de distribució (V_D), el paràmetre que mesura la distribució relativa dels fàrmacs entre el plasma i els teixits, amb valors més alts indicant un major accés als teixits i valors més baixos indicant un major contenció al plasma. Els antihistamínics més hidròfils presenten valors més baixos de V_D , mentre que d'altres com loratadina mostren valors excepcionalment alts, que n'expliquen les concentracions també excepcionalment baixes observades en plasma (Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016).

Alguns autors han advocat per afavorir l'ús dels antihistamínics de baix volum de distribució com la cetirizina, ja que a banda d'estalviar el metabolisme hepàtic mostra una baixa penetració al cor o el cervell, disminuint la possibilitat d'efectes secundaris en aquests òrgans (Tillement 2000). Els paràmetres més rellevants es troben recollits a la Taula 5.

	MW	cLogP	logD _{7,4}	pK _a (àcid)	pK _a (bàsic)	HBA	HBD	TPSA	R5	V _D
Acrivastina*	348	1,7	-0,11	3,68	8,63	4	1	53,43	Sí	0,64
Carebastina*	500	3,6	2,38	N/D	N/D	1	5	66,8	Sí	2,3
Cetirizina*	389	0,9	-1,45	3,6	7,79	5	1	53,01	Sí	0,4
Clemastina	344	4,9	2,66	N/D	9,55	2	0	12,47	Sí	3,8
Ciproheptadina	287	4,3	4,27	N/D	8,05	1	0	3,24	Sí	N/D
Desloratadina	311	4,0	0,84	N/D	9,73	2	1	24,9	Sí	49
Ebastina	470	7,0	5,95	16,45	8,43	3	0	29,54	No	>100
<i>Fexofenadina*</i>	502	2,9	1,23	4,04	9,01	5	3	81	No	5,6
Ketotifèn	309	3,4	0,44	12,3	7,15	2	0	20,31	Sí	56
Loratadina	383	4,6	3,9	N/D	4,33	2	0	42,43	Sí	120
Rupatadina	416	5,4	4,19	N/D	7,19	3	0	29,02	No	143
Terfenadina	472	6,5	3,6	13,2	9,02	3	2	43,7	No	2,5

Taula 5. Propietats fisicoquímiques i farmacològiques dels antihistamínics més rellevants per a aquest treball. En cursiva, metabòlits d'altres antihistamínics.*compostos zwitteriònics; en negreta, CADs; MW: pes molecular en Da; logD_{7,4}: logD a pH 7,4; HBA: número d'acceptors d'enllaços d'hidrogen; HBD: número de donadors d'enllaços d'hidrogen; TPSA: àrea topològica de la superfície polar en Å²; R5: compliment de la regla del 5 de Lipinski; V_D: volum de distribució en L/kg. Totes les dades excepte el logD i V_D s'han extret de la base de dades Drugbank (www.drugbank.ca), i s'han considerat els valors de logP calculats per Chemaxon, ateses les poques dades experimentals disponibles. Els valors de logD_{7,4} s'han obtingut de la base de dades ChEMBL, i els de V_D de diverses revisions (Tillement 2000; Torneke, Ingvast-Larsson et al. 2003; del Cuvillo, Mullol et al. 2006).

2. Objectius

La LMA és, malgrat els avenços, una malaltia de mal pronòstic, i existeix la necessitat clínica de noves teràpies capaces de millorar els tractaments actuals. Per abordar el problema amb noves solucions, abans de l'inici d'aquesta tesi doctoral es va realitzar un cribratge *in silico* cercant fàrmacs que revertissin una signatura gènica relacionada amb la transformació, com a estratègia per afectar mecanismes generals de supervivència de les cèl·lules tumorals. A través d'aquest cribratge es va identificar un antihistamínic i es va validar el seu efecte en línies cel·lulars de LMA. En base a aquestes observacions es va construir la hipòtesi que els antihistamínics podrien esdevenir tractaments potencials per a la LMA i que el receptor HRH1, associat a la seva acció antihistamínica, podria ser rellevant per a les cèl·lules leucèmiques.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat determinar la rellevància per a la LMA del receptor HRH1 i l'acció dels seus antagonistes. Per a la consecució de l'objectiu principal es van proposar els següents objectius específics:

1. Estudi de l'expressió del receptor HRH1 en LMA i de la seva rellevància patofisiològica.
2. Estudi preclínic del potencial dels antihistamínics per a la LMA
3. Estudi dels mecanismes d'acció dels antihistamínics associats a la seva acció antileucèmica.

3. Metodologia

3.1. Materials

3.1.1 Línies i cultius cel·lulars

Totes les cèl·lules humanes emprades en el present treball van ser cultivades a 37°C i al 5% de CO₂ en medi suplementat amb 5-10% de sèrum fetal boví (FBS) (Biowest), 2 mM de L-glutamina (Gibco) i 1mM d'aminoàcids no essencials de MEM (Biowest). Les línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques (HL-60, KG-1, MonoMac-1, THP-1, Jurkat, RPMI-8402, CEM-CCRF, K562, Ramos, HBL-2, GRANTA-519, L-363, MDS-L, U-266, JN-3 i RPMI8226), es van cultivar en medi RPMI1641 (Biowest). Les línies cel·lulars HEK-293 i HS-5 es van cultivar en medi DMEM (Biowest). La informació principal d'aquestes línies es troba recollida a la Taula 6.

Línia cel·lular	Patologia	Procedència	Referència
HL-60	LMA	DSMZ	Gallagher, Collins et al. 1979; Dalton, Ahearn et al. 1988
KG-1		DSMZ	Koeffler i Golde 1978
MonoMac-1		DSMZ	Steube, Teepe et al. 1997
THP-1		DSMZ	Tsuchiya, Kobayashi et al. 1982
HL-60 Ara-C R		Producció pròpia	Cornet-Masana, Moreno-Martinez et al. 2016
MDSL	SMD	CCHMC (Dr Starczynowski)	Rhyasen, Wunderlich et al. 2014
K562	LMC	IDIBAPS (Dra. Colomer)	Lozzio i Lozzio 1975
Ramos (RA1)	Limfoma de Burkitt		Benjamin, Magrath et al. 1982
HBL-2	LCM		Abe, Nozawa et al. 1988
GRANTA-519		IDIBAPS (Dr. Subero)	Jadayel, Lukas et al. 1997
Jurkat RPMI-8402 CCRF-CEM	LLA-T	IMIM (Dra. Bigas)	Weiss, Wiskocil et al. 1984 Huang CC 1974 Foley, Lazarus et al. 1965
L-363 JN-3	LCP	Hospital 12 de Octubre (Dr. Martínez-López)	Diehl 1978 Jackson, Lowe et al. 1989
RPMI8226	Mieloma M		Matsuoka Y 1967
U266			Nilsson, Bennich et al. 1970
HEK293T	Epiteli de ronyó embrionari	ATCC	DuBridge, Tang et al. 1987
HS-5	Estroma de MO	ATCC	Roecklein i Torok-Storb 1995

Taula 6. Informació de les línies cel·lulars. LMA, leucèmia mieloide aguda; LMC, leucèmia mieloide crònica; LCM, limfoma de cèl·lules del mantell; LLA-T, leucèmia limfoblàstica aguda T; LCP, leucèmia de cèl·lules plasmàtiques; Mieloma M, mieloma múltiple; MO, medul·la òssia. IDIBAPS: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer; IMIM: Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques; CCHMC: Cincinnati Children's Hospital Medical Center; DSMZ, col·lecció alemanya de microorganismes i cultius cel·lulars.

3.1.2 Mostres primàries

Les mostres de pacients de LMA, SMD, LMMC, LMC i LLA-B 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-GTiP (C.0002922). El diagnòstic i classificació es va realitzar seguint els criteris de l'OMS (Arber, Orazi et al. 2016). 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. Les característiques dels pacients es troben resumides als annexos I i II. La mostra de LLA-T va ser generosament cedida pel grup del Dr. Felipe Prósper (CIMA, Universidad de Navarra), i es tracta d'una mostra de pacient amplificada *in vivo* en trasplantaments seqüencials en ratolins, que constitueix un model propi (Vilas-Zornoza, Agirre 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 Teixits, amb l'aprovació del comitè ètic de l'Hospital universitari Vall d'Hebron.

La sang perifèrica, sang de cordó umbilical, sang de medul·la òssia, o concentrats leucocitaris provinents de leucafèresis terapèutiques 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 mitjançada per anticossos emprant el *Lineage cell Depletion kit* (Miltenyi 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 i LMMC es va emprar el medi IMDM (Biowest) suplementat amb el 3% de FBS, 2mM L-glutamina (Gibco), 1mM aminoàcids no essencials de MEM (Biowest), 100 U/mL penicil·lina (Biowest), 100µg/mL estreptomina (Biowest), 1mM piruvat sòdic (Gibco), 20% de BIT9500 (Stem Cell Technologies), 5ng/ml IL-3 (PeproTech) i 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol (BME, Sigma-Aldrich). Per al cultiu de cèl·lules de mostres primàries de LLA-T i LLA-B es va emprar el medi IMDM suplementat amb 2 mM L-glutamina, 1mM aminoàcids no essencials de MEM, 100 U/mL penicil·lina (Biowest), 100µg/mL estreptomina (Biowest), 50 ng/ml IL-2 (PeproTech), 20 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-7 (PeproTech), 50 ng/ml SCF (PeproTech), 20 ng/ml FLT3L (PeproTech) i 5×10^{-5} M BME. Per al cultiu de 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 (Gibco), 100 U/mL penicil·lina

(Biowest), 100µg/mL estreptomina (Biowest), 20 ng/ml TPO (PeproTech), 100ng/ml FLT3L (PeproTech), 100ng/ml SCF (PeproTech) i 5×10^{-5} M BME (Sigma-Aldrich).

3.1.3 Compostos

Tots els compostos emprats al present estudi es van resuspendre en H₂O (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 100 mM segons les característiques de solubilitat de cada compost (Taula 7).

Nom	Abr.	Proc.	Acció	Referència	Núm. CAS	Solv.
Histamina (dihidroclorur)	H, Ha	Toc	Ag. HRH1-4	Mitsubishi i Payan 1992	56-92-8	H ₂ O
Acrivastina	Ac, Acri	SCBT	Ant. HRH1	Cohen, Hamilton et al. 1985; Bakker, Wieland et al. 2000	87848-99-5	DMSO
Clemastina (fumarat)	Cl, Clema	SCBT	Ant. HRH1	Hartmann, Magnussen et al. 1981; Dorsch, Reimann et al. 1982; Nair i Schwartz 1983	14976-57-9	H ₂ O
Cetirizina (dihidroclorur)	Ce, Ceti	Toc	Ant. HRH1	Snowman i Snyder 1990; Bakker, Wieland et al. 2000	83881-52-1	H ₂ O
Ciproheptadina (hidroclorur)	Cy, Cypro	SCBT	Ant. HRH1	Tokunaga, Takeda et al. 2007	969-33-5	H ₂ O
Ketotifèn (fumarat)	Ke, Keto	SCBT	Ant. HRH1	Martin i Romer 1978	34580-14-8	H ₂ O
Fexofenadina (hidroclorur)	Fe, Fexo	SCBT	Ant. HRH1	Bernstein, Schoenwetter et al. 1997; Simons i Simons 1997; Bakker, Wieland et al. 2000	153439-40-8	DMSO

Loratadina	Lo, Lora	Toc	Ant. HRH1	Ahn i Barnett 1986; Kreutner, Chapman et al. 1987; Bakker, Wieland et al. 2000	79794-75-5	DMSO
Rupatadina (fumarat)	Ru, Rupa	SCBT	Ant. HRH1	Merlos, Giral et al. 1997	182349-12-8	DMSO
Terfenadina	Te, Terfe	Toc	Ant. HRH1	Huther, Renftle et al. 1977; Woodward i Munro 1982; Bakker, Wieland et al. 2000	50679-08-8	DMSO
Ebastina	Eb, Ebas	SCBT	Ant. HRH1	Roberts 1996; Bakker, Wieland et al. 2000	90729-43-4	DMSO
Ranitidina (hydroclorur)	Ra	Toc	Ant. HRH2	Bradshaw, Brittain et al. 1979; Peden, Saunders et al. 1979; Smit, Leurs et al. 1996	66357-59-3	H ₂ O
Cimetidina	Ci	SCBT	Ant. HRH2	Brimblecomb e, Duncan et al. 1975; Smit, Leurs et al. 1996	51481-61-9	DMSO
Famotidina	Fa	SCBT	Ant. HRH2	Takagi, Takeda et al. 1982	76824-35-6	DMSO
JNJ-5207852 (dihydroclorur)	J2	Toc	Ant. HRH3	Barbier, Berridge et al. 2004; Le, Gruner et al. 2008	398473-34-2	H ₂ O
JNJ-7777120	J0	Sell	Ant. HRH4	Jablonowski, Grice et al. 2003; Thurmond, Desai et al. 2004	459168-41-3	DMSO
JNJ-10191584 (maleat)	J4	SA	Ant. HRH4	Terzioglu, van Rijn et al. 2004)	869497-75-6	DMSO

Citosina β -D-arabinofurana-nòsid	Ara-C	SA	Antileucèmic	Matsuoka Y 1967	147-94-4	H ₂ O
Acetilcolina (clorur)	ACh	SCBT	Ag. pan-CHRM	Wessler, Kirkpatrick et al. 1999	60-31-1	H ₂ O
Dofetilida	Dofe	SA	Bloq. hERG	Gwilt, Arrowsmith et al. 1991; Carmeliet 1992; Finlayson, Pennington et al. 2001	115256-11-6	DMSO
Lumefantrina	Lume	SA	Bloq. hERG	Traebert, Dumotier et al. 2004)	82186-77-4	DMSO
Metoctramina (hidrat)	Meth	SCBT	Ant. CHRM2	Buckley, Bonner et al. 1989; Dorje, Wess et al. 1991	104807-46-7	H ₂ O
Pirenzepina (dihidroclorur)	Pire	SCBT	Ant. CHRM1	Hammer, Berrie et al. 1980; Daeffler, Schmidlin et al. 1999	29868-97-1	H ₂ O
Biperidèn (clorur)	Bipe	SCBT	Ant. pan-CHRM	Bolden, Cusack et al. 1992	1235-82-1	H ₂ O
Ipratropi (bromur)	Ipra	Toc	Ant. pan-CHRM	Hirose, Aoki et al. 2001	22254-24-6	H ₂ O
Serotonina (hidroclorur)	5HT	SA	Ag. HTR	Feniuk, Humphrey et al. 1985	153-98-0	H ₂ O
5- carboxamido triptamina (maleat)	5CT	Toc	Ag. HTR1	Feniuk, Humphrey et al. 1985	74885-09-9	H ₂ O
NAN-190 (hidrobromur)	NAN-190	SA	Ant. HTR1A	Glennon, Naiman et al. 1988	115338-32-4	H ₂ O
S(-)-UH-301 (hidroclorur)	UH-301	SCBT	Ant. HTR1A	Arborelius, Hook et al. 1994	127126-22-1	H ₂ O
Àcid 2-hidroioleic	OHOA	SA	Act. SMS	Martin, Liebisch et al. 2013	56472-29-8	DMSO
α -tocoferol	Toco	SA	Captador ROS lipídic	Agoston, Orsi et al. 2003; Marenchino, Alpstag et al. 2004	10191-41-0	EtOH

Etopòsid	VP-16	SCBT	Inh. TopoII	Minocha i Long 1984	33419-42-0	DMSO
Bafilomicina	Baf	Toc	Inh. V-ATPasa	Bowman, Siebers et al. 1988	88899-55-2	DMSO
LY294002 (hidroclorur)	LY	SA	Inh. PI3K	Soule HD 1973	934389-88-5	DMSO
Rapamicina	Rapa	SA	Inh. mTOR	Brown, Albers et al. 1994	53123-88-9	DMSO
Cloroquina	Chl	Enzo	Lisosomòtrop	de Duve, de Barsey et al. 1974; Djehiche, Segalen et al. 1996; Suzuki, Nakagawa et al. 2002	54-05-7	H ₂ O
Rotenona	Rote	Toc	Inh. CTEM	Cherednichenko, Zima et al. 2004	83-79-4	DMSO
Pimetixè (maleat)	Pime	SCBT	Ant. HRH1, Ant. HTR	Engelhardt 1975	13187-06-9	DMSO
Nordoxepina (hidroclorur)	Nor	SCBT	TCA	Hameroff, Cork et al. 1982	2887-91-4	DMSO
Pizotifèn (malat)	Pizo	SCBT	Ant. 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C}	Speight i Avery 1972	5189-11-7	DMSO
3-CPMT	CPMT	Toc	Inh. DRI	Newman, Allen et al. 1994	14008-79-8	DMSO
Compostos cribratge	-	Chem	-	-	-	DMSO

Taula 7. Relació de compostos emprats. Solv., solvent; SCBT, Santa Cruz Biotechnology; SA, Sigma-Aldrich; Toc, Tocris; Enzo, Enzo Life Sciences; Chem, Chembridge; Sell, Selleckchem. Ag, agonista; Ant, antagonista o agonista invers; Inh, inhibidor; Bloq., bloquejador, Act, activador. CHRM, receptor muscarínic d'acetilcolina; SMS, esfingomielina sintasa; CTEM, cadena transportadora d'electrons mitocondrial; TCA, antidepressiu tricíclic; DRI, inhibidor de la recaptació de dopamina.

3.1.4. Anticossos acoblats a fluoròfor

Els anticossos acoblats a fluoròfor emprats per a citometria de flux es troben recollits a la Taula 8.

Anticòs	Clon	Proveïdor	Fluorocrom
CD2	RPA-2.10	BD	FITC
CD3	HIT3a	BD	APC
CD4	RPA-T4	BD	FITC
CD8	HIT8a	BD	PE
CD11b/Mac-1	ICRF44	BD	PE
CD11c	B-ly6	BD	APC
CD13	WM15	BD	PE
CD13	WM15	AB D serotec	Alexa647
CD14	M5E2	BD	FITC
CD15	HI98	BD	APC
CD19	SJ25C1	BD	FITC
CD33	WM53	AB D serotec	Alexa 488
CD33	HIM3-4	BD	FITC, PE
CD34	581	BD	APC,PE
CD38	HIT2	BD	FITC, PE
CD41a	HIP8	BD	FITC
CD45	HI30	BD	FITC, PE, APC, V450
CD56	B159	BD	PE

Taula 8. Informació dels anticossos de marcadors humans

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 citòmetre FACSCantoII (Becton Dickinson) i els resultats han estat analitzats en tots els casos amb el software FlowJo (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 tests estadístics s'han realitzat amb el

programa GraphPad Prism® 6.01 (GraphPad software). Per als experiments en línies cel·lulars s'ha assumit distribució gaussiana i s'han realitzat proves t de Student no aparellades bilaterals amb un nivell de confiança del 95%. En algun cas (experiments de proliferació) s'han realitzat tests ANOVA de mesures repetides de dos factors. Per a la comparació de grups en mostres primàries no es va assumir distribució gaussiana i es van realitzar tests no paramètrics de Mann-Whitney no aparellats bilaterals amb un nivell de confiança del 95%. 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, representant 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. Comptatge cel·lular i viabilitat

El comptatge de cèl·lules vives per a la preparació d'experiments es va efectuar en un hemocitòmetre (cambra de Neubauer, VWR) amb 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 com a negatives per a 7-AAD (eBioscience) i amb un patró correcte de tinció positiva per Hoechst33342 (Sigma-Aldrich), per detectar partícules amb nucli i descartar les cèl·lules fusionades. Així mateix, es va comprovar el perfil de FSC-SSC. En alguns casos i per motius de solapament amb altres tincions es va emprar només una de les dues mesures de viabilitat.

3.2.3. Anàlisi d'expressió de proteïnes en superfície

3.2.3.1 Anàlisi d'expressió de HRH1 en superfície

Per a l'anàlisi de l'expressió del receptor HRH1 a la membrana per citometria de flux es varen realitzar sobre les cèl·lules tres tincions seqüencials: 1. Anticòs de conill anti-HRH1 humà (ABIN1530769, Antibodies Online) 2. Anticòs secundari *P-phycoerythrin goat anti-rabbit IgG (H+L)* (Life technologies) i 3. Marcadors específics de poblacions i marcadors de viabilitat, amb rentats després de cada tinció amb el tampó PEF (PBS 1x + 0,5mM EDTA + 3 % FBS). Després de l'adquisició citomètrica de les cèl·lules, es va analitzar dins les cèl·lules vives segons el cas el percentatge de cèl·lules que expressaven HRH1 i segons el cas la mitjana d'intensitat de la fluorescència (MFI). En les mostres primàries es va realitzar l'anàlisi dins de diverses poblacions, discriminades en base a tinció per CD3, CD13, CD19, CD34 o CD45 entre d'altres. Per a la selecció de blasts en mostres primàries

de neoplàsies hematològiques es van realitzar *blast gates*, que permeten la identificació en base a CD45^{dim} i SSC^{int} (Lacombe, Durrieu et al. 1997).

3.2.3.2. Anàlisi de diferenciació mieloide

Per analitzar els efectes sobre la diferenciació de cèl·lules leucèmiques, es va analitzar l'expressió en superfície dels marcadors de diferenciació terminal mieloide CD11b, CD11c i CD14. Es van cultivar 2×10^5 cèl·lules/mL i es van tractar amb els compostos a la concentració indicada durant 72h. Les cèl·lules es van tenyir amb anticossos específics per als suara mencionats marcadors i amb marcadors de viabilitat, i es van adquirir per citometria de flux. Es va analitzar el percentatge de cèl·lules amb expressió dels marcadors dins la població de cèl·lules vives.

3.2.4. Microscòpia de fluorescència

3.2.4.1. Anàlisi de l'expressió de HRH1 per microscòpia de fluorescència

Per analitzar el patró d'expressió en membrana de HRH1 es va realitzar un assaig d'immunofluorescència. Amb aquest objectiu, un total de 3×10^5 cèl·lules van ser adherides a cobreobjectes prèviament tractats 2 hores a 37°C amb 50 µg/ml poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Les cèl·lules van ser aleshores fixades amb formaldehid (FA) al 2% (Sigma-Aldrich) i rentades amb sèrum salí tamponat amb Tris (TBS), i es van bloquejar amb 10µg/ml γ -globulina (Sigma-Aldrich) diluït en tampó TNB (1 M Tris- HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 2% BSA). Posteriorment, es van tenyir amb l'anticòs del receptor HRH1 (ABIN1530769, Antibodies Online), que es va incubar 30 minuts a temperatura ambient. Es va emprar un anticòs secundari *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)* (Life Technologies) i es va realitzar la tinció de nuclis amb Hoechst33342. Per al muntatge es va usar Mowiol 4-88 (VWR) amb el *quencher* Dabco (1,4-diazabicyclo-2.2.2-octane) (Sigma-Aldrich). Les imatges es van adquirir amb un microscopi de fluorescència Olympus IX51 amb un objectiu Plan 60x amb obertura numèrica 1,3 i es van analitzar amb el software Fiji (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012).

3.2.4.2. Anàlisi del compartiment lisosomal mitjançant *LysoTracker*

Per a l'estudi microscòpic 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 microscòpic, es van tractar 200.000 cèl·lules de línies cel·lulars de LMA per condició amb els compostos indicats a 18h o 48h, es van rentar amb

medi complet i es van incubar 1h amb 100 nM *LysoTracker Deep Red* i Hoechst33342 a 37°C. Es va realitzar un segon rentat amb medi i es van adherir a cobreobjectes compartimentats de 8 pous μ -Slide (Ibidi) prèviament tractats amb 50 μ g/ml poli-L-lisina abans de l'observació microscòpica. Les cèl·lules es van observar en viu, i al llarg de tots els passos es van mantenir les condicions òptimes per a la viabilitat de les cèl·lules, incloent el manteniment a la cambra microscòpica de 37°C i CO₂ 5%. Es va emprar un microscopi confocal Zeiss LSM880 amb un objectiu plan apocromàtic 63x amb obertura numèrica 1,4.

3.2.4.3. Anàlisi de la fragmentació nuclear

Per estudiar els canvis morfològics als nucli relacionats amb la mort cel·lular, es va estudiar la tinció amb Hoechst44432 als mateixos experiments que a l'apartat 3.2.4.2.

3.2.4.4. Anàlisi de la permeabilització de la membrana lisosomal mitjançant la detecció de galectina-1

Per analitzar si es produïa en certes condicions una permeabilització de la membrana lisosomal, es van tractar 100.000 cèl·lules per condició amb els compostos indicats als temps indicats i es van adherir a cobreobjectes prèviament tractats amb poli-L-lisina, com s'ha descrit a l'apartat 3.2.4.1. Es van fixar les cèl·lules amb 100% metanol fred (5'), es van rentar amb PBS i es van permeabilitzar amb el detergent Triton-X100 al 0,2% (10'). Es va realitzar un bloqueig amb 10 μ g/ml γ -globulina diluït en tampó TNB i es va incubar la preparació amb un anticòs per a la galectina-1 (ab25138, Abcam) 18h a 4°C. Es va emprar un anticòs secundari *Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)* (Life Technologies) i es va realitzar la tinció de nuclis amb Hoechst33342. Per al muntatge es va usar Mowiol 4-88 (VWR) amb el *quencher* Dabco (1,4-diazabicyclo-2.2.2-octà) (Sigma-Aldrich). Les imatges es van adquirir amb un microscopi confocal Zeiss LSM880 amb un objectiu plan apocromàtic 63x amb obertura numèrica 1,4 i es van analitzar amb el software Fiji (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012). Es va analitzar el percentatge de cèl·lules amb punts de galectina, comptant-ne un mínim de 20 per condició.

3.2.5. Anàlisi de l'expressió de gens per PCR semi-quantitativa

Per analitzar l'expressió de gens a nivell de RNA, l'RNA total de cèl·lules en les condicions d'interès es va aïllar fent ús del *Total RNA Purification Kit* (Norgen Biotek) seguint les indicacions del proveïdor i es va retrotranscriure a cDNA mitjançant el *qScript cDNA Synthesis Kit* (Quanta Biosciences), que usa encebadors hexàmers a l'atzar.

A partir d'aquest cDNA, es van realitzar PCRs semi-quantitatives amb *Power SYBR Green PCR mastermix* (Applied Biosystems) i encebadors dissenyats per a la detecció dels gens corresponents, seguint les indicacions del proveïdor. La reacció es va dur a terme al termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) i es va valorar l'expressió de gens només quan s'observaven perfils de *melting curve* correctes i Cts<35. Els encebadors emprats es troben recollits a la Taula 9

Per a l'anàlisi dels resultats, realitzat amb el software propi de *Step One Plus Real-Time PCR System*, es van extreure els cicles llindar (threshold cycle, Ct) i es van sostreure els valors del gen de referència GUSB (β -glucoronidasa) als obtinguts amb la resta d'encebadors (Δ Ct). A continuació, es van sostreure els Cts de la condició control als de les altres condicions ($\Delta\Delta$ Ct) i es va calcular el *fold change* com a $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gen amplificat	Seqüència	Sentit
GUSB (β -glucoronidasa)	AAACGATTGCAGGGTTTCAC	<i>Forward</i>
	CAGTCATGAAATCGGCAAAA	<i>Reverse</i>
HDC	ATGCACGCCTACTACCCAG	<i>Forward</i>
	CAGTCCATGACGTTTCATCTCC	<i>Reverse</i>
HRH1	ATTTTGTGCATCCCCTCAG	<i>Forward</i>
	CACACTGAACCCCTCATCT	<i>Reverse</i>
HRH2	CCATCCTGCATGACACCAAA	<i>Forward</i>
	TCTCCGCTTCCCAGGTTTT	<i>Reverse</i>
HRH3	TCGTGTCATCAGCTACGAC	<i>Forward</i>
	AAGCCGTGATGAGGAAGTAC	<i>Reverse</i>
HRH4	GGCTCACTACTGACTATCTG	<i>Forward</i>
	CCTTCATCCTTCCAAGACTC	<i>Reverse</i>
BIRC5 (survivina)	CACCGCATCTCTACATTCAAGA	<i>Forward</i>
	AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	<i>Reverse</i>

Taula 9. Llistat d'encebadors emprats per a PCR semi-quantitativa

3.2.6. Clonatge i transducció de construccions

3.2.6.1. Clonatge al plàsmid intermediari pJET1.2

Per al posterior clonatge en altres plàsmids, es va introduir al vector pJET1.2 (Fermentas) HRH1 silvestre amplificat per PCR a partir de DNA genòmic de la línia cel·lular HL-60. Els encebadors emprats per a l'amplificació (Taula 10) contenen *overhangs* que van permetre flanquejar el gen HRH1 amb dianes de reconeixement de XbaI i la introducció del *tag* V5 a l'extrem C-terminal. El resultat es va seqüenciar per Sanger.

5' XbaI - HRH1	GGGTCTAGAATGAGCCTCCCAATTCC
3' XbaI-V5- HRH1	GGGTCTAGATTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGGGTTAGGGA- -TAGGCTTACCGGAGCGAATATGCAG

Taula 10. Encebadors emprats per a l'amplificació de HRH1, introducció de V5 i flanqueig amb dianes de XbaI

3.2.6.2. Mutagènesi dirigida

Per obtenir isoformes constitutivament actives de HRH1 es van introduir mutacions puntuals mitjançant mutagènesi dirigida amb oligonucleòtids solapants amb els encebadors mostrats a la Taula 11 partint de la construcció pJET1.2-HRH1-V5. L'èxit de la mutagènesi es va comprovar per seqüenciació Sanger.

5' HRH1 I420K	GCCAAACAGTTGGGTTTT AAA ATGGCAGCCTTCATC
3' HRH1 I420K	CGGTTTGTCAACCCAAAAT TTT TACCGTCGGAAGTAG
5' HRH1 I420S	GCCAAACAGTTGGGTTTT AGT ATGGCAGCCTTCATC
3' HRH1 I420S	CGGTTTGTCAACCCAAAAT TCAT ACCGTCGGAAGTAG

Taula 11. Relació d'encebadors emprats per a la mutagènesi dirigida amb oligonucleòtids solapants. En negreta es mostra el codó on s'introdueix la mutació.

3.2.6.3. Clonatge al vector lentiviral pULTRA

Amb l'objectiu d'expressar les formes de HRH1 clonades en cèl·lules mieloides es va fer ús del vector lentiviral de tercera generació pULTRA (Figura 7), que permet l'expressió bicistrònica del gen d'interès i eGFP. El clonatge es va realitzar a partir de les construccions prèvies en pJET1.2 de les formes tant mutants com silvestre de HRH1 amb el *tag* V5, que es van transferir al plàsmid pULTRA mitjançant la digestió amb XbaI. En trobar-se l'insert flanquejat per la mateixa diana de restricció, va ser necessari comprovar que s'havia introduït a pULTRA en el sentit adequat, comprovació que es va efectuar per seqüenciació Sanger.

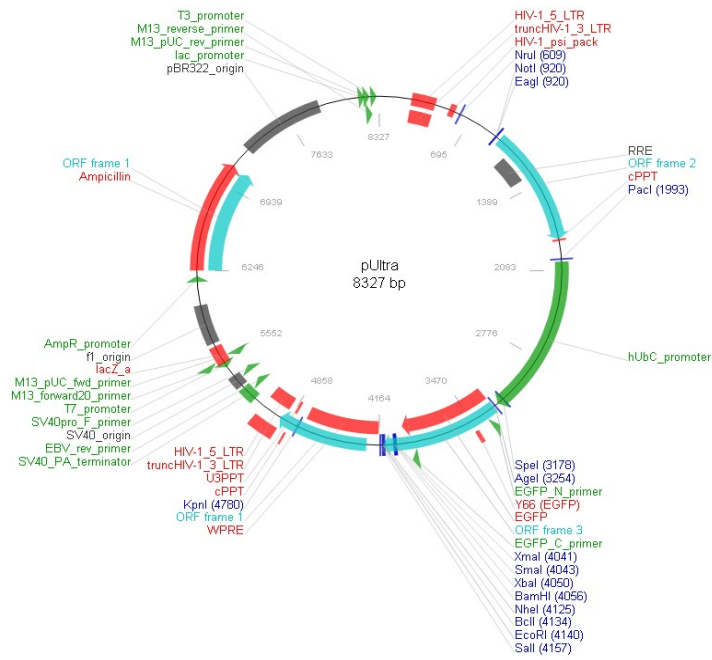


Figura 7. Mapa del plàsmid lentiviral pULTRA. Plàsmid obtingut pel laboratori de Malcolm Moore (Addgene; no. 24129).

3.2.6.4. Clonatge al plàsmid d'expressió transitòria pEF1

Per a experiments de cotransfecció amb vectors reporters es va clonar HRH1 i les seves dues formes mutants a pEF1/V5-HisA (ThermoFisher), un plàsmid per a l'expressió transitòria en cèl·lules de mamífer. Aquest clonatge es va efectuar de la mateixa manera que s'ha exposat per a pULTRA.

3.2.6.5. Clonatge de shRNAs al plàsmid pLKO.1

En aquest estudi s'ha intentat el silenciament del gen HRH1 mitjançant *short hairpin* RNA. A més, com a control es va emprar un shRNA contra el gen eGFP (prèviament clonat per la Dra. Amaia Etxabe). Els encebadors específics es van adquirir al *RNA interference consortium* (<https://www.broadinstitute.org/rnai/trc>, Taula 12)

HRH1 shRNA 1	5' pLKO-TCR HRH1 clon TCRN0000009062
HRH1 shRNA 2	5' pLKO-TCR HRH1 clon TCRN0000009065
eGFP shRNA	5' pLKO-TCR eGFP clon TCRN0000072193

Taula 12. Encebadors específics dels shRNA.

Aquestes seqüències degudament anellades es van insertar al vector pLKO.1-TCR (Addgene, Figura 8) seguint les instruccions del proveïdor i el resultat es va seqüenciar per Sanger per comprovar-ne la identitat.

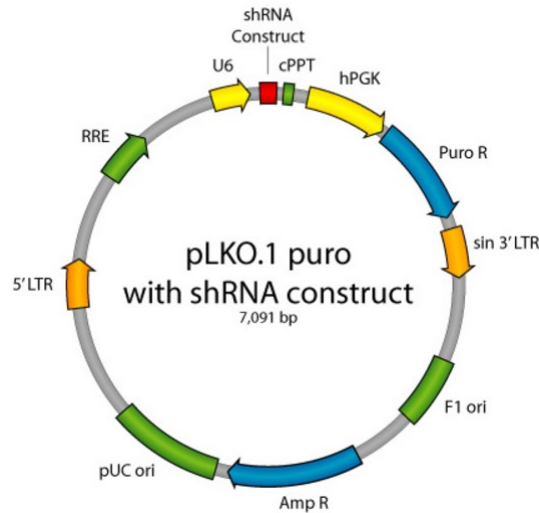


Figura 8. Mapa del plàsmid pLKO.1. Plàsmid obtingut pel laboratori de David Root (Addgene; núm de plàsmid 10878). El plàsmid original té una seqüència de 1,9 kb que s'allibera després de tallar amb els enzims de restricció AgeI i EcoRI. Els encebadors de shRNA reemplacen la seqüència sobrera.

3.2.6.6. Construccions en pLentiCRISPR.v2

Per aconseguir una disminució més dràstica en l'expressió de HRH1 es van adquirir construccions basades en el plàsmid pLentiCRISPR.v2 amb guies de RNA per al tall mitjançant el sistema CRISPR (sgRNA) específiques per al gen HRH1. Concretament es van adquirir a GenScript dues construccions amb guies diferents (ATCTGAGTCCGTTTCGAGAGA i GTACGGCATAACAGCACCAGC).

3.2.6.7. Transducció de vectors lentivirals en cèl·lules leucèmiques

7×10^4 cèl·lules HEK293T/mL es van transfectar amb els plàsmids d'interès i amb els plàsmids complementaris necessaris per a la generació de virus lentivirals de tercera generació (Dull, Zufferey et al. 1998)(Taula 13). La transfecció es va realitzar per liposomes amb el kit *JetPei DNA transfection reagent* (Polyplus transfection) seguint les instruccions del proveïdor i emprant la proporció recomanada de plàsmids (6:4:4:3 plàsmid d'interès : pMDLg/pRRE : pRSV-Rev : pMD2.G).

Nom	Procedència		Element codificat
pMDLg/pRRE	Addgene; núm 12251	Lab. Trono	<i>gag, pol</i>
pRSV-Rev	Addgene; núm 12253	Lab. Trono	<i>Rev</i>
pMD2.G	Addgene; núm 12259	Lab. Trono	VSV-g (<i>env</i>)

Taula 13. Relació de plàsmids complementaris necessaris per a la generació de lentivirus de tercera generació.

Es van infectar 5×10^5 cèl·lules mieloides/mL amb el sobrenedant lentiviral filtrat a les 48h i 72h post-transfecció. La infecció es va ajudar amb una centrifugació en presència de 4 $\mu\text{g/ml}$ de bromur d'hexadimetrina (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 1,5h. La detecció de cèl·lules transduïdes es va realitzar en el cas de pULTRA per la presència de cèl·lules GFP+ per citometria de flux, i en el cas de pLKO.1 i pLentiCRISPR.v2 mitjançant la selecció amb puromicina (Sigma-Aldrich).

3.2.6.8. Anàlisi de la senyalització de HRH1 amb vectors reporters

Per analitzar l'activitat senyalitzadora de les formes silvestre i mutants clonades, es van emprar vectors reporters basats en luciferasa dependents d'elements de resposta a sèrum (SRE) i factor nuclear de cèl·lules T activades (NFAT-RE), els dos elements de resposta majoritaris dels GPCRs acoblats a $G\alpha_q$ com HRH1 (Cheng, Garvin et al. 2010). Aquests vectors reporters (pGL4.33[uc2P/SRE/Hygro] i pGL4.30[uc2P/NFAT-RE/Hygro], Promega) expressen el gen de luciferasa *luc2* (*Firefly*) de manera condicional a l'estimulació dels elements de resposta. Es van transfectar 7×10^4 cèl·lules HEK293T/mL pel sistema jetPei amb vector pGL4 amb element de resposta, les diferents construccions pEF.1-HRH1 i un plàsmid control amb expressió constitutiva del gen de luciferasa *Rluc* (*Renilla*) (pRL-SV40, Addgene) a una proporció 2:2:1. 48h post-transfecció es van lisar les cèl·lules i es va analitzar la luminiscència generada per les dues luciferases seguint les recomanacions del proveïdor, i es va normalitzar la luminiscència de *Firefly* respecte la de *Renilla*.

3.2.7. Estudis de supervivència i proliferació

3.2.7.1. Citotoxicitat

Per a l'estudi de l'efecte citotòxic dels compostos en línies cel·lulars, es van sembrar en plaques de 96 pous 2×10^5 cèl·lules/mL (experiments de 72h), $3,5 \times 10^5$ cèl·lules/mL (experiments de 48h) o 5×10^5 cèl·lules/mL (experiments de 24h) i es van tractar a la concentració indicada de compostos. Al cap del temps adient, es va analitzar la viabilitat

per comptatge volumètric tal i com es descriu a l'apartat 3.2.2. En el cas de les mostres primàries, el procediment va ser similar, semblant-se però entre $5 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL i distingint les diferents poblacions mitjançant anticossos per a marcadors de diferents llinatges. Per a la selecció de blasts en mostres primàries de neoplàsies hematològiques es van realitzar *blast gates*, que permeten la identificació en base a CD45^{dim} i SSC^{int} (Lacombe, Durrieu et al. 1997). Es van emprar sempre controls de vehicle afegint volums equivalents de solvent (generalment 1:500).

3.2.7.2. Càlcul de concentracions efectives mitjanes (EC₅₀)

El càlcul de les EC₅₀ (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 3.2.7.1. Els valors d'EC₅₀ es van obtenir mitjançant el software GraphPad Prism (*Variable slope-four parameters*).

3.2.7.3. Sinergisme

Per analitzar l'efecte citotòxic de la combinació de compostos (contractament) es va mesurar l'efecte citotòxic de les diferents condicions (veure l'apartat 3.2.7.1) i es va estudiar la naturalesa de la combinació mitjançant el càlcul dels EOBA (*Excess over Bliss Additivism*) (Berenbaum 1981; Roecklein i Torok-Storb 1995) i l'Índex de Combinació (CI, *Combination Index*) (Chou i Talalay 1984) obtingut mitjançant el software *CompuSyn* (ComboSyn Incorporated).

3.2.7.4. Co-cultiu amb cèl·lules d'estroma

Cèl·lules de la línia cel·lular estromal HS-5, ($2 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL), es van tenyir 30 minuts amb 2,5 µM de la sonda CFSE (Thermo Fischer Scientific) per a la posterior separació de poblacions i es van cultivar 24h. Passat aquest temps d'adhesió a la placa, es van afegir cèl·lules de línies cel·lulars mieloides en contacte directe ($2 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL), es van aplicar els tractaments corresponents i es va analitzar per citometria de flux la viabilitat cel·lular a les 48h de les cèl·lules de LMA (identificades com a CFSE negatives).

3.2.7.5. Assaig de 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 Cell Proliferation kit, Thermo Fisher), que tenyeix la membrana cel·lular i la intensitat mitjana del qual baixa a mida que les cèl·lules es divideixen i la

tinció es reparteix en la progènie. Un total de 3×10^5 cèl·lules/mL per condició es van tenyir amb CFSE 2,5 μ M 30' a 37°C i posteriorment es van rentar, resuspendre en medi complet i sembrar en plaques de 24 pous. Es van afegir els compostos indicats a les concentracions corresponents i als dies 1, 3, 5 i 7 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.

3.2.7.6. Anàlisi 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 24 h amb els diferents estímuls. Posteriorment, van ser rentades amb tampó fosfat salí (PBS) + 0,5 mM EDTA i fixades amb etanol al 70% fred durant 18h. Transcorregut aquest temps, es van rentar i tenyir amb Hoechst33342 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 i Jett 1974) després de descartar dobles. Les cèl·lules en fase subG0 i superG2/M es van descartar de l'anàlisi, i es va recalculer el 100% com la suma de G0/G1, S i G2/M.

3.2.7.7. 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 antihistamínics. Aquests experiments s'han realitzat seguint el procediment descrit a l'apartat 3.2.7.1., tractant amb combinacions de compostos simultània (histamina, acetilcolina, UH301, NAN190, 3MA, Z-VAD-FMK) o pretractant les cèl·lules durant 1h (α -tocoferol, ASM recombinant de *Bacillus Cereus*). En el cas de l'ASM recombinant, a més, el pretractament es va realitzar en medi complet amb HEPES 20mM a pH 5,2 per aconseguir les condicions àcides a les quals l'enzim té funció lisosomal.

3.2.8. Estudis de mort cel·lular i apoptosi

3.2.8.1. 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 (Annexin V-PE apoptosis detection kit, BD), que es conjuga amb la fosfatidilserina. Es van tractar $3,5 \times 10^5$ cèl·lules de línies cel·lulars de LMA/mL amb els compostos a les concentracions indicades i es van tenyir amb

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

3.2.8.2. Anàlisi de l'activació de caspases efectores

Per analitzar l'activació de caspases efectores es va emprar el kit basat en luminiscència CaspaseGlo® 3/7 Assay (Promega). Es van sembrar 4×10^5 cèl·lules/mL en plaques de 96 pous adients per a assaigs de luminiscència (Thermo Fisher) i es van tractar 6, 12 o 24h amb els compostos indicats (50 µL volum final). Es van afegir 50 µL de *CaspaseGlo® 3/7 Assay Substrate* reconstituït i es va incubar la barreja 30' a temperatura ambient. Es va analitzar la luminiscència mitjançant un aparell *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek) seguint les indicacions del fabricant.

3.2.9. Estudis d'afectació mitocondrial i lisosomal

3.2.9.1. Anàlisi del compartiment lisosomal mitjançant LysoTracker

Per a l'anàlisi del compartiment lisosomal per citometria de flux, es van tractar cèl·lules de línies cel·lulars de LMA en les condicions indicades als temps indicats, es van rentar amb HBSS, es van incubar amb 50 nM LysoTracker DeepRed (Thermo Fisher) i Hoechst33342 30' a 37°C. Les cèl·lules es van rentar amb HBSS i es van adquirir per citometria de flux. Es va analitzar la fluorescència del canal APC dins la població de cèl·lules vives.

3.2.9.2. Anàlisi del compartiment autofàgic mitjançant CYTO-ID

Per a l'anàlisi del compartiment autofàgic per citometria de flux es van tractar cèl·lules de línies cel·lulars de LMA 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 (CYTO-ID ® Autophagy detection kit, Enzo Life Sciences) a una dilució 1:4000. La sonda CYTO-ID s'acumula a pre-autofagosomes, autofagosomes i autolisosomes, però no als lisosomes, permetent una tinció específica de vacúols autofàgics. 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 la població de cèl·lules vives.

3.2.9.3. 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 LMA 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). Concretament, les cèl·lules es van rentar

en *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS), es van incubar amb HBSS+MitoSOX 5 μM +Hoechst-44432 10' a 37°C i es van rentar de nou amb HBSS abans de ser adquirides per citometria de flux (canal PE).

3.2.9.4. 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 LMA i es van tractar amb els compostos indicats 24 o 48h. Passat aquest temps, es va realitzar un rentat amb PBS i es van tenyir les cèl·lules amb rodamina-123 (10 μM , Thermo Fisher) 20' a 37°C. Es va realitzar un altre rentat amb PBS i se'n va analitzar la fluorescència per citometria de flux (canal FITC).

3.2.10. Assaigs de clonogenicitat

Per a l'estudi de la capacitat d'autorenovació es van realitzar assaigs de clonogenicitat. Un total de 1.000 cèl·lules de línies cel·lulars de LMA, 1.000 cèl·lules lin- de sang de cordó umbilical o 50.000 cèl·lules de mostres primàries de LMA o LMMC 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 colònia (CFU) es van comptar en base a la seva morfologia i cel·lularitat a dia 7 (línies cel·lulars) o dia 14 (mostres primàries de LMA, mostres cordó umbilical).

3.2.11. Estudis *in vivo*

Tota la recerca amb implicació d'animals d'experimentació descrita en aquest estudi s'ha realitzat d'acord amb els procediments aprovats pel corresponent 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 als estudis *in vivo* s'ha treballat amb ratolins immunodeficients NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/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, Martin-Padura et al. 2008; Sarry, Murphy 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-foscor de 12h.

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

3.2.11.1. Xenotrasplantament amb línies cel·lulars

Es van injectar per via intravenosa 10^6 cèl·lules de la línia cel·lular MonoMac-1 o 3×10^6 cèl·lules de la línia cel·lular KG-1 resuspeses en solució fisiològica (0,9% NaCl, Sigma-Aldrich) i es van deixar una setmana sense tractar per permetre l'empelt de les cèl·lules humanes. Passat aquest temps es van administrar dues setmanes en dies alternatius rupatadina o ebastina 8mg/kg pes 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 instants abans de les injeccions. Als ratolins control se'ls va injectar DMSO diluït 1:10 en sèrum salí. El volum total injectat va ser de 10 µl per gram de ratolí. Passades les dues setmanes es van sacrificar els ratolins per dislocació cervical i se'n van extreure tíbies i fèmurs. Les cèl·lules del moll d'aquests ossos es van obtenir per mòlta en tampó PBS + 0,5 mM 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. Per sota del 0,1% de cèl·lules humanes, es va considerar que no s'havia produït empelt i es van descartar els experiments.

3.2.11.2. Xenotrasplantament amb mostres primàries de leucèmia mieloide aguda

Cèl·lules mononucleades provinents de leucoafèresis terapèutiques de pacients de LMA es van deplecionar de cèl·lules CD3+ mitjançant *CD3 MicroBeads* (Miltenyi Biotec), es van tractar 18h amb els compostos indicats i es van injectar intravenosament a ratolins mieloablacionats 24h abans. Es van injectar entre 7 i 19×10^6 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 melsa. Les cèl·lules del moll d'aquests ossos es van obtenir per mòlta i les de melsa per disgregació mecànica en tampó PBS + 0,5 mM 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 . Per sota del 0,1% de cèl·lules humanes, es va considerar que no s'havia produït empelt i es van descartar els experiments. Per als trasplantaments secundaris, es van injectar en ratolins mieloablacionats números equivalents de cèl·lules humanes provinents d'experiments primaris (400.000 cèl·lules humanes) i es va analitzar l'empelt com s'ha descrit prèviament.

3.2.11.3. Xenotrasplantament amb mostres de cordó umbilical de donant sa

Cèl·lules mononucleades de sang de cordó umbilical lin- (com s'ha descrit a l'apartat 3.1.2) es van tractar 18h amb els compostos indicats i es van injectar intravenosament a ratolins mieloablacionats 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 túbies, fèmurs, crestes ilíaqües i melsa. Les cèl·lules del moll d'aquests ossos es van obtenir per mòlta i les de melsa per disgregació mecànica en tampó PBS + 0,5 mM EDTA + 0,5% BSA, i 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. Per als trasplantaments secundaris, es van injectar en ratolins mieloablacionats números equivalents de cèl·lules humanes provinents d'experiments primaris ($0,43$ - $3,2 \times 10^6$ cèl·lules per ratolí) i es va analitzar l'empelt com s'ha descrit prèviament.

3.2.12. Western blot

Es van tractar 10×10^6 cèl·lules de línies cel·lulars de LMA o 25 - 50×10^6 cèl·lules de mostres primàries de LMA (provinents de leucoafèresis terapèutiques, contingut en blasts proper al 100%) per condició durant 18h en medi complet amb els compostos indicats. Subseqüentment, es van lisar amb el tampó RIPA suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases (1mM benzamidina, 1mM DTT, 1 µg/ml leupeptina, 1µg/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 desnaturalitzants i reductors (SDS i β-

mercaptoetanol) i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 µm (BIO-RAD). Per a la immunodetecció, es van emprar els anticossos primaris llistats a la Taula 14, i anticossos secundaris *IRDye®800 CW* i *IRDye® 680 CW* (LI-COR) seguint les indicacions del sistema d'immunodetecció *Odyssey* (LI-COR). Les imatges es van obtenir mitjançant l'*Odyssey Infrared Imaging System®* (LI-COR). Es va fer servir GAPDH com a referència, i les bandes es van quantificar mitjançant el software Fiji.

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

Taula 14. Llistat d'anticossos emprats per a *Western Blot*.

3.2.13. Anàlisis bioinformàtics

3.2.13.1. *Connectivity Maps*

Per al cribratge *in silico* mitjançant *Connectivity Maps* (Lamb, Crawford et al. 2006) es va emprar la sèrie GSE57194 (GSM1376945, GSM1376946, GSM1376951 i GSM1376952) dipositada al repositori GEO per obtenir una firma gènica associada a esdeveniments primerencs de transformació mitjançada per MLL-AF9 en cèl·lules primàries sanes CD34+. Es van utilitzar els algorismes del programa DChip (Harvard School of Public Health, Boston, EEUU) per a la normalització dels arxius originals (.cel) (Schuurkes, Van Nueten et al. 1985; Ireland i Tyers 1987). Després de l'anàlisi de les mostres normalitzades al programa GenePattern (Broad Institute Cancer Program), es van seleccionar les sondes amb una expressió diferencial d'almenys 2 magnituds i un valor estadístic de $p < 0.005$. Aquestes sondes es van sotmetre posteriorment a un cribratge *in silico* a través de la plataforma *Connectivity Maps* (Broad Institute Cancer Program; Monachon, Burkard et al. 1972; Millan, Maiofiss et al. 2002).

3.2.13.2. Heatmaps

Per a l'elaboració del *heatmap* representant la citotoxicitat dels antihistamínics en línies cel·lulars es va emprar el software R (versió 3.4.4), representant valors de viabilitat (colors més foscos indicant menor percentatge de cèl·lules vives i per tant major efectes citotòxics).

3.2.13.3. Clustering i anàlisi de components principals

Per a l'anàlisi estadístic de l'agrupació de fàrmacs segons les seves propietats fisicoquímiques, es van seleccionar 9 propietats (cLogP ALOGPS, TPSA, logD, logS, càrrega fisiològica, número de donadors d'enllaços d'hidrogen, número d'acceptors d'enllaços d'hidrogen, cLogP Chemaxon, número d'àtoms de nitrogen i d'oxigen). Amb aquests paràmetres i mitjançant el software R (versió 3.4.4) es va realitzar un *clustering* jeràrquic usant el mètode d'aglomeració completa a la matriu de distància calculada amb la distància *manhattan*. Les mateixes variables es van aplicar a un anàlisi de components principals (PCA).

4. Resultats

4.1. Resultats preliminars

Com a primer pas per a cercar compostos candidats per a la LMA es va realitzar un cribratge *in silico* amb l'objectiu d'identificar molècules amb capacitat de revertir una signatura gènica associada a la transformació leucèmica. Atès que les úniques alteracions descrites a dia d'avui amb capacitat d'iniciar la LMA *in vivo* per si mateixes són els gens de fusió en MLL, es va obtenir una signatura gènica associada a la transformació per MLL-AF9, a partir de perfils públics d'expressió gènica tres dies després de transduir cèl·lules de cordó umbilical CD34⁺ (Abdul-Nabi, Yassin et al. 2010). Un cop obtinguda aquesta signatura, es van cercar candidats que la revertissin a *Connectivity Maps* (Lamb, Crawford et al. 2006) un repositori que recull canvis d'expressió gènica induïts per compostos bioactius aprovats per a l'ús en humans per la FDA, possibilitant una estratègia de reposicionament de fàrmacs. Es van atorgar puntuacions als fàrmacs (de -1 a 1) segons induïssin canvis més semblants a MLL-AF9 (baixes puntuacions) o més antagònics (altes puntuacions). Dels 1309 compostos inicials disponibles al repositori, 121 van obtenir una puntuació >0,5 en la línia de LMA HL-60, 45 dels quals a concentració igual o menor de 10 µM. Els compostos resultants formaven part de grups farmacològics diversos, que es van agrupar segons els codis de *l'anatomical therapeutic chemical classification system* (codis ATC), observant-se un enriquiment en fàrmacs per al sistema nerviós, cardiovascular i respiratori, i també antiparasitaris i antiinfectius (Figura 9A). Alguns dels *hits* obtinguts, pertanyents a grups especialment enriquits, havien estat prèviament identificats com a antileucèmics en base a altres mètodes de cribratge, com ara l'antiparasitari emetine (Cornet-Masana, Moreno-Martinez et al. 2016) o l'antagonista de receptors de dopamina tioridazina (Sachlos, Risueno et al. 2012). La present tesi doctoral arrenca amb l'estudi d'un dels grups enriquits, el de fàrmacs del sistema respiratori, que no s'havia observat en altres cribratges previs al grup de recerca i que estava compost principalment d'antihistamínics; d'entre els 45 fàrmacs identificats, 4 tenien activitat antihistamínica, ja sigui com a acció principal o secundària (terfenadina, ketotifèn, dimenhidrinat i pimozida). Per validar aquests resultats, es van tractar cèl·lules de la línia cel·lular HL-60 amb terfenadina i ketotifèn a 10 µM durant 72h, i se'n va analitzar la viabilitat per citometria de flux, observant-se una mort del 100% amb el tractament amb terfenadina i cap efecte significatiu amb ketotifèn (Figura 9B). Els espectaculars efectes de terfenadina van permetre validar-lo com a candidat i prosseguir amb l'estudi dels antihistamínics com a potencials fàrmacs per al tractament de la LMA

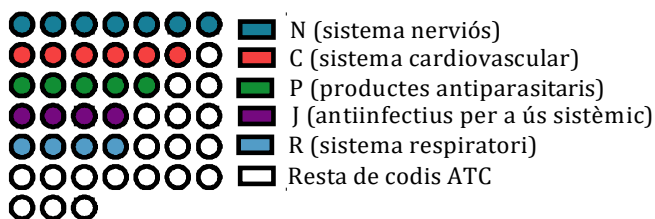
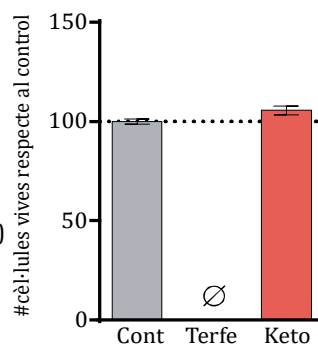
A**B**

Figura 9. Agrupació dels compostos seleccionats al cribratge en funció dels codis ATC i validació primària. **A.** Representació dels *hits* segons família farmacològica. Cada rodona representa un dels 45 *hits* i diferents colors corresponen a diferents grups de primer nivell ATC. **B.** Viabilitat cel·lular de cèl·lules HL-60 després del tractament durant 72h amb vehicle (Cont), terfenadina 10 µM (terfe) o ketotifèn 10 µM (keto). Les barres representen la mitjana del número de cèl·lules viues d'un triplicat respecte al control. Les barres d'error representen el SEM.

4.2. Estudi del receptor HRH1 en neoplàsies hematològiques

Un cop validat l'efecte citotòxic en LMA d'un antihistamínic, la terfenadina, i en paral·lel a l'estudi dels seus efectes, va resultar d'interès l'estudi de la diana principal descrita per a aquests fàrmacs: el receptor d'histamina 1 o HRH1. Atès que es disposava de les eines per a l'estudi d'altres neoplàsies hematològiques i tenint en compte les similituds entre les diferents malalties que componen aquest grup de neoplàsies, es va ampliar l'estudi de la LMA a d'altres patologies.

4.2.1. Expressió de HRH1 en línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques

Com a primer pas, es va realitzar un estudi de l'expressió en superfície de HRH1, en tractar-se d'un receptor de membrana. Per citometria de flux es va determinar el percentatge de cèl·lules que expressaven HRH1 en línies de LMA, LMC, SMD, LLA-T, LCM, limfoma de Burkitt, mieloma múltiple i LCP. Els percentatges d'expressió variaven molt en funció de la línia, amb totes les línies mieloides exceptuant la de SMD expressant percentatges importants de HRH1 i les línies de neoplàsies limfoides a excepció de la línia de LCM mostrant nivells molt baixos.

A

Línea	% HRH1+	Neoplàsia	Llinatge
Jurkat	0	LLA-T	T
RPMI-8402	0	LLA-T	T
MDS -L	0	SMD	Mieloide
RPMI-8226	0	Mieloma múltiple	B
L-363	0	LCP	B
CCRF-CEM	1	LLA-T	T
JJN3	2	LCP	B
RAMOS	14	Limfoma de Burkitt	B
HL-60	35	LMA	Mieloide
K562	83	LMC	Mieloide
HBL-2	84	LCM	B
KG -1	98	LMA	Mieloide
MonoMac-1	99	LMA	Mieloide
THP -1	99	LMA	Mieloide

B

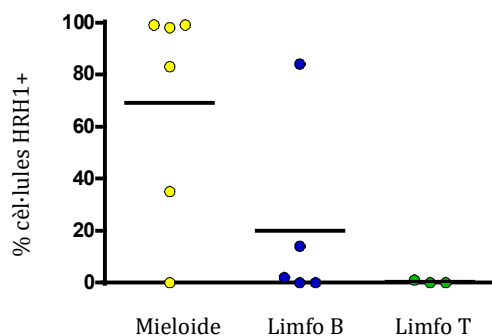


Figura 10. Expressió en superfície de HRH1 en línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques. A. Resum del percentatge de cèl·lules HRH1-positives en cada línia i dades de les línies. B. Expressió de HRH1 en línies de llinatge mieloide (groc), limfoide B (blau) i limfoide T (verd). Cada punt correspon a una línia cel·lular i les barres horitzontals representen la mitjana.

Per sondejar la possible implicació del receptor en la resistència a fàrmacs, es va comparar el percentatge de cèl·lules positives per a HRH1 en la línia cel·lular HL-60 i en una línia derivada resistent al quimioterapèutic citarabina (Cornet-Masana, Moreno-Martinez et al. 2016). Com es pot observar a la Figura 11, les cèl·lules resistents mostren un percentatge significativament més gran de receptor en membrana, si bé es tracta d'una diferència modesta.

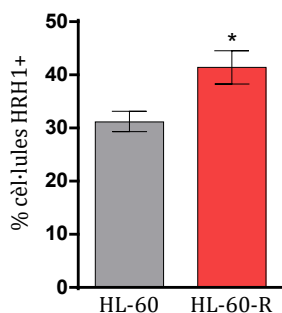


Figura 11. Un línia HL-60 resistent a citarabina mostra una expressió de HRH1 més alta que HL-60 parental. Expressió de HRH1 en superfície determinada per citometria de flux en HL-60 i una línia derivada resistent a citarabina (HL-60-R). Les barres representen la mitjana del percentatge de cèl·lules positives per HRH1 de triplicats i les barres d'error el SEM. *P<0.05.

A banda de l'estudi per citometria de flux, es va realitzar un estudi per immunofluorescència en línies cel·lulars de LMA, per observar la localització i el patró d'expressió del receptor. En ambdues línies analitzades es va observar un patró de distribució de HRH1 en tota la membrana cel·lular, amb la presència de punts discrets amb major concentració de receptor, indicant la possible presència de *clusters* de receptors (Figura 12).

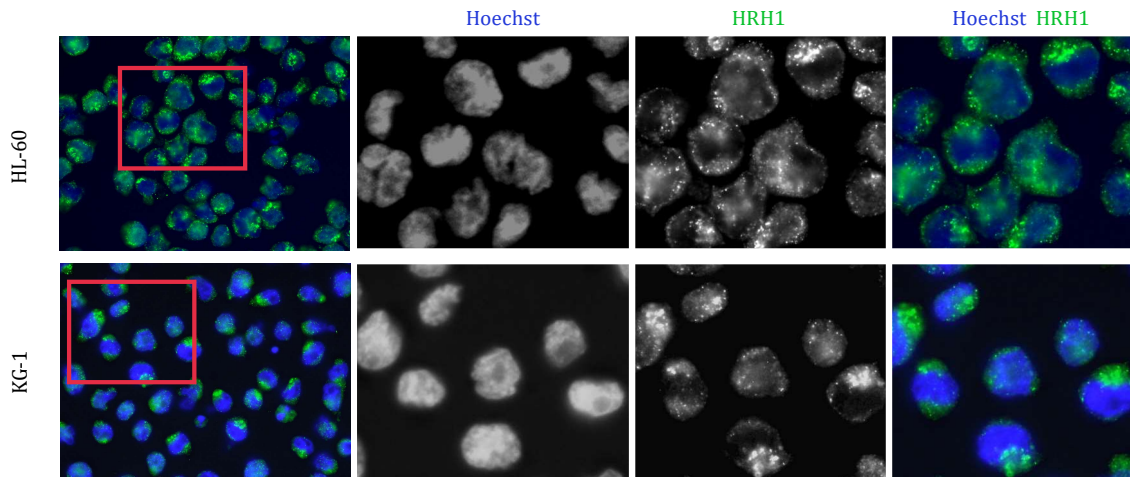
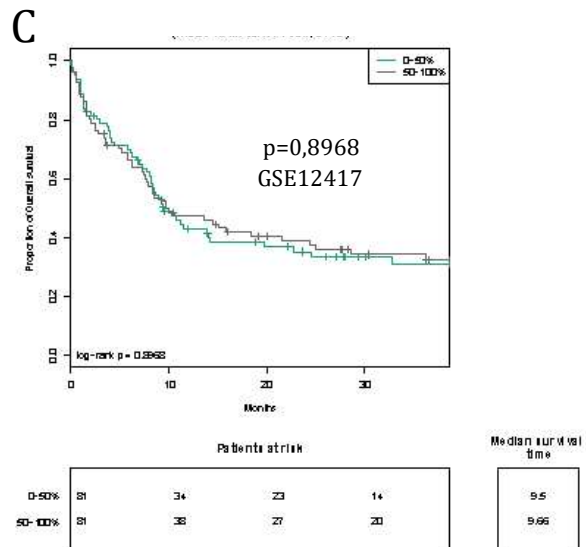
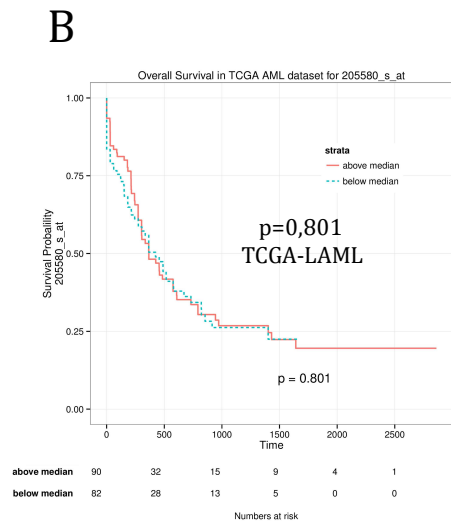
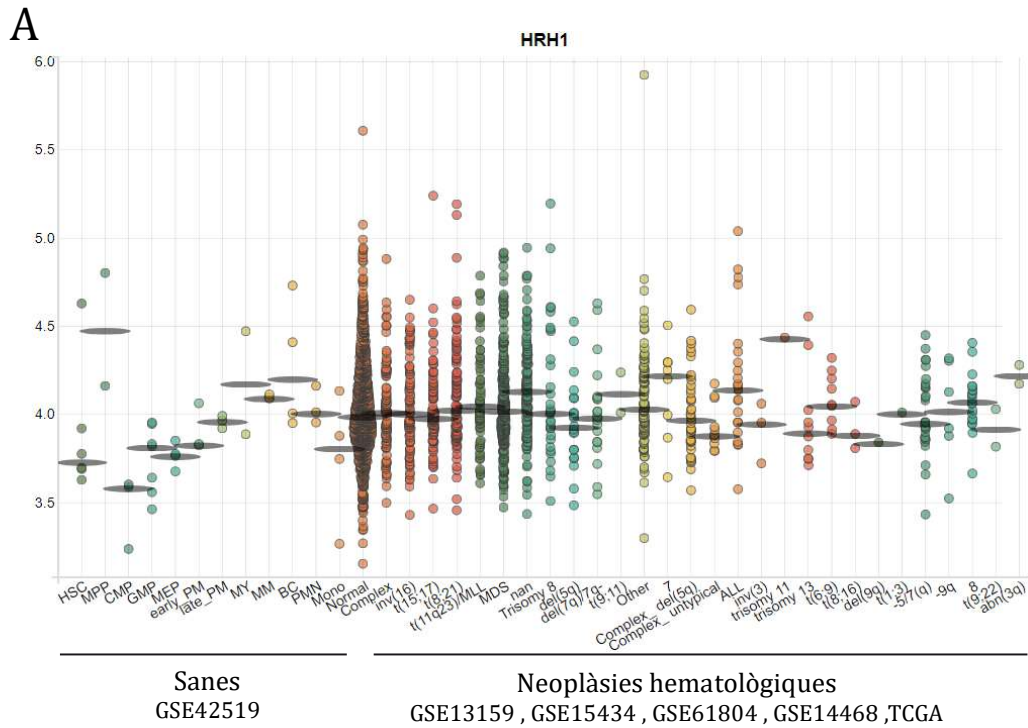


Figura 12. HRH1 s'expressa a la superfície de línies cel·lulars de LMA. Cèl·lules HL-60 i KG-1 es van fixar i tenyir amb Hoechst33342 (blau) i HRH1 (verd), i es van adquirir les imatges amb un microscopi de fluorescència Olympus IX51 a 600 augments. Es mostren imatges representatives de camps amplis (esquerra) i amplificacions de zones marcades amb requadres vermells (tres panells drets).

4.2.2. Expressió de HRH1 en cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques

En vista de l'alta expressió de HRH1 en línies cel·lulars mieloides, es va procedir a analitzar-ne l'expressió en cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques. Com a pas previ es va realitzar una cerca a la base de dades *Bloodspot* (www.servers.bink.ku.dk/bloodspot), que agrupa i permet la visualització de dades públiques d'expressió gènica en cèl·lules hematopoètiques sanes (GSE42519) i de LMA (GSE13159, GSE15434, GSE61804, GSE14468, TCGA). D'una banda, es van analitzar els nivells d'expressió a nivell transcripcional en cèl·lules sanes i neoplàsiques, observant-se un patró de distribució de l'expressió força semblant en pacients amb diferents alteracions i diversitat en les cèl·lules hematopoètiques sanes, sense constatar-se cap tret destacat (Figura 13A). Aquestes dades contrasten amb les obtingudes en línies cel·lulars, on sí que es veien diferències entre llinatges i estat de maduració. D'altra banda, es van extreure dades de supervivència en pacients de LMA amb expressió de HRH1 per sobre i per sota de la mitjana, sense observar-se diferències significatives (Figura 13B). Per validar aquesta observació, es va realitzar el mateix procediment a la plataforma *Leukemia Gene Atlas* (www.leukemia-gene-atlas.org/LGAtlas) amb dades d'una altra sèrie (GSE12417), obtenint resultats similars (Figura 13C). A més, sondejos superficials en altres plataformes i modificant l'agrupació segons expressió van mostrar la mateixa informació. Així, en base a dades de tercers, no sembla que l'expressió a nivell transcripcional de HRH1 tingui relació amb la supervivència en LMA, i no presenta diferències destacables entre subgrups distints de la patologia. Aquests estudis, però, no tenen en compte cap altra variable i tenen un significat relatiu, tot i resultar informatius a tall de resultats preliminars.



D

Dades generals	Valor
n total	335
Edat mitjana (anys)	56,5
%dones	49,9
Mutacions	
%NPMmut+	39,7
%FLT3-ITD+	37,3

FAB	%
M0	6,6
M1	25,0
M2	24,9
M3	5,1
M4	22,9
M5	11,5
M6	3,0
M7	1,0

Figura 13. HRH1 s'expressa similarment en diversos tipus de subconjunts neoplàsics i no està relacionat amb la supervivència. **A.** Es van obtenir a *Bloodspot* dades d'expressió a nivell transcripcional de HRH1 en cèl·lules sanes hematopoètiques en diferents estadis de desenvolupament i de diversos subtipus de neoplàsies hematològiques, majoritàriament LMA. Es van extreure dades de supervivència de pacients amb expressió per sobre i per sota de la mitjana de HRH1, i es van construir gràfics de Kaplan-Meier a **B.** *Bloodspot* i **C.** *Leukemia Gene Atlas*. **D.** Taula amb les dades dels pacients inclosos als anàlisis. FAB: classificació French-American-English.

Quant a l'expressió a nivell de proteïna en superfície, es va estudiar la presència de HRH1 en un ampli ventall de tipus cel·lulars per citometria de flux. Per a l'estudi en cèl·lules sanes, es van aïllar MNCs de capes leucocitàries de donants sans i es va analitzar l'expressió de HRH1 en cèl·lules hematopoètiques nucleades (CD45+) i plaquetes (CD45-/CD41a+). De la mateixa manera, es va determinar l'expressió del receptor en les subpoblacions hematopoètiques CD11c+, CD14+, CD15+ i CD33+ (diversos tipus mieloides), CD19+ (limfòcits B), CD3+ (limfòcits T) i CD2+/CD56+ (cèl·lules NK). Els resultats van variar dràsticament segons els tipus cel·lulars estudiats, amb una expressió nul·la en limfòcits T, baixa en plaquetes, limfòcits B i cèl·lules NK, i en general alta en cèl·lules de llinatge mieloides (Figura 14A). A banda de l'expressió en cèl·lules de capes leucocitàries representades, l'anàlisi de cèl·lules lin- CD34+ de sang de dos cordons umbilicals va constatar expressió en superfície en <1% de cèl·lules. Aquests resultats mostren similituds amb els obtinguts en línies cel·lulars neoplàsiques; en ambdós casos l'expressió de HRH1 era majoritària en llinatge mieloides, minoritària en llinatge B i inexistent en llinatge T.

Per a l'estudi de cèl·lules de mostres primàries de neoplàsies mieloides es va analitzar el percentatge de cèl·lules que expressaven HRH1 en poblacions blàstiques seleccionades en base a l'expressió de CD45 i el perfil de SSC per citometria de flux (Lacombe, Durrieu et al. 1997)(dades obtingudes en col·laboració amb tots els membres del laboratori, en especial Antònia Banús). Tant les mostres de LMC com de LMMC presenten un percentatge d'expressió alt i homogeni, mentre que en el cas de les SMD i les LMA l'expressió és molt heterogènia, amb un rang del 0 al 100% d'expressió (Figura 14A). Per intentar dissecar aquesta heterogeneïtat, es van agrupar les mostres de LMA i SMD segons diferents paràmetres. Atès el baix nombre de mostres i la manca de dades clíniques associades a algunes d'elles es va decidir agrupar les SMDs segons el subtipus de malaltia establert per l'OMS i el risc associat (Greenberg, Tuechler et al. 2012; Arber, Orazi et al. 2016) i les LMAs únicament segons el grup de risc (Döhner, Estey et al. 2017). Pel que fa a les SMDs, i amb la prudència que el nombre baix de mostres exigeix, s'observa heterogeneïtat en l'expressió dins dels subgrups, si bé les SMDs amb displàsia multilínia i

sideroblasts en anell mostren un percentatge més baix que la resta de grups, i les SMDs amb excés de blasts-1 un percentatge més alt de la mitjana (Figura 14D). Quant al risc, no s'observa cap patró concret amb les mostres estudiades. En el cas de les LMA, s'observa un percentatge significativament més alt d'expressió en les mostres dels pacients de risc baix, respecte als de risc intermedi i alt, si bé el baix número de mostres n'impedeix extreure conclusions prou sòlides (Figura 14C). En vista que les cèl·lules mieloides sanes ja expressen HRH1, la seva presència en neoplàsies mieloides podria ser sols una manifestació del seu llinatge d'origen, que tindria tendència a perdre's en cèl·lules amb un bloqueig de la diferenciació més important. Això explicaria els alts i homogenis nivells en CML i CMML, molt semblants als de les cèl·lules CD14+ sanes, i els nivells heterogenis en SMD i LMA, patologies que contenen casos amb diferents estats de diferenciació. La relació entre una diferenciació pobra i el risc alt podrien, a la llum d'aquesta hipòtesi, explicar la disminució de HRH1 amb l'increment del risc que s'ha observat. Es tracta, però de simples conjectures que seran discutides més endavant.

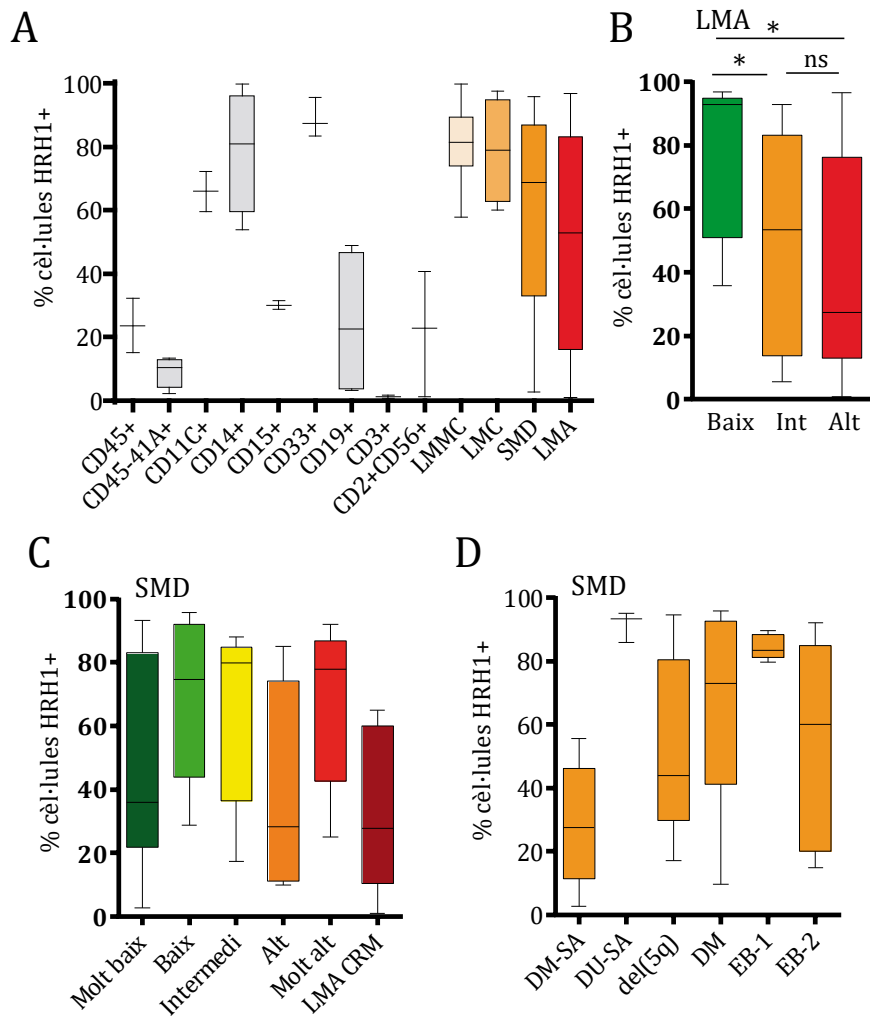


Figura 14. Expressió de HRH1 en superfície en cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques. L'expressió de HRH1 es va analitzar a la superfície cel·lular mitjançant citometria de flux. Es mostra el percentatge de cèl·lules HRH1 positives en cada grup. Les caixes i els bigotis han estat creats seguint el mètode de Tukey, amb la barra central representant la mediana. **A.** L'expressió de HRH1 es va analitzar en subgrups de cèl·lules sanes (gris) per triplicat en cèl·lules d'entre 1 i 4 capes leucocitàries. L'expressió de HRH1 en neoplàsies hematològiques (taronja-vermell) es va obtenir per duplicat o triplicat en mostres de leucèmia mielomonocítica crònica (LMMC, n=18), leucèmia mieloide crònica (LMC, n=4), síndromes mielodisplàsiques (SMD, n=45) i leucèmia mieloide aguda (LMA, n=40). **B.** Dades d'expressió de HRH1 en LMA agrupades segons el risc tal i com l'estableix l'OMS: baix (verd, n=5), intermedi (taronja, n=16) i alt (vermell, n=14). **C.** Dades d'expressió de HRH1 en SMD agrupades segons els grups de risc establerts per l'OMS: molt baix (n=9), baix (n=19), intermedi (n=5), alt (n=4), molt alt (n=5). També s'ha afegit per a la comparativa el grup de LMA amb canvis en relació amb mielodisplàsia (LMA CRM, n=5). **D.** Dades d'expressió de HRH1 en SMD agrupades segons els subtipus establerts per l'OMS: SMD amb displàsia multilínia i sideroblasts en anell (DM-SA, n=5), SMD amb displàsia unilínia i sideroblasts en anell (DU-SA, n=3), SMD amb deleció a 5q aïllada (del(5q), n=11), SMD amb displàsia multilínia (DM, n=15), SMD amb excés de blasts-1 (EB-1, n=6), SMD amb excés de blasts-2 (EB-2, n=5). *p<0,05 en tests de Mann Whitney.

4.2.3. Implicació de HRH1 en LMA

Un cop constatat que, malgrat l'heterogeneïtat, les cèl·lules de LMA de molts pacients expressen percentatges importants de HRH1, es va proposar determinar la importància d'aquest receptor per a la malaltia mitjançant experiments de pèrdua i guany de funció en línies cel·lulars.

Per a la regulació positiva, les línies de LMA HL-60 i MonoMac-1 es van transduir amb la forma silvestre de HRH1 i amb dues isoformes mutades constitutivament actives (I420K, I420S)(Bakker, Jongejan et al. 2008). Per citometria de flux es va observar un alt percentatge de cèl·lules transduïdes (eGFP+) però aquesta expressió ectòpica no va anar acompanyada d'un augment del receptor a la membrana, en observar-se nivells molt similars en cèl·lules eGFP+ i eGFP- (Figura 15A). En paral·lel, es va comprovar l'activitat senyalitzadora de les formes silvestre i mutants mitjançant la seva cotransfecció en cèl·lules HEK293T (que no expressen HRH1 a la superfície) amb vectors reporters basats en luciferasa dependents d'elements de resposta a sèrum (SRE, senyalització MAPK-ERK) i factor nuclear de cèl·lules T activades (NFAT-RE), els dos elements de resposta majoritaris dels GPCRs acoblats a $G\alpha_q$ com HRH1(Cheng, Garvin et al. 2010). En aquest experiment es va observar expressió de HRH1 en membrana amb les tres construccions, i com la forma silvestre induïa un augment en la senyalització en ambdós elements de resposta. Les formes constitutivament actives, a més, induïen un augment extra, més acusat en el cas de la mutació I420S (Figura 15B). Aquests resultats validen la capacitat de les formes clonades de causar un increment de la senyalització a través de HRH1, malgrat la detecció de la sobreexpressió del receptor no ha estat possible en línies de LMA, per l'acció de

mecanismes de compensació, per problemes de transport o per d'altres motius que escapen de la nostra comprensió. En qualsevol cas, l'estudi del paper de la senyalització per HRH1 seguint aquesta estratègia no ha estat possible, en no haver detectat la proteïna transduïda.

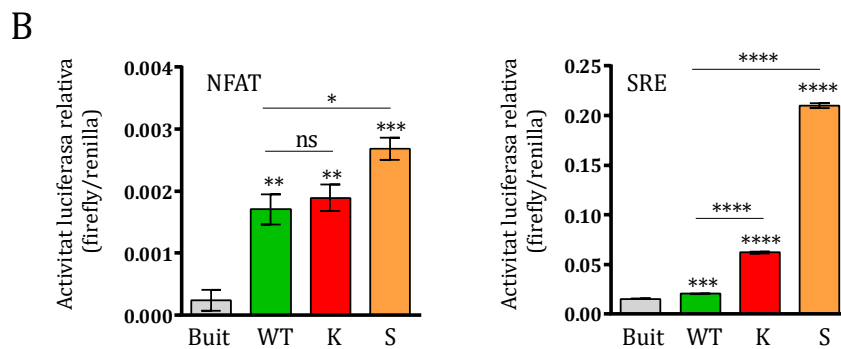
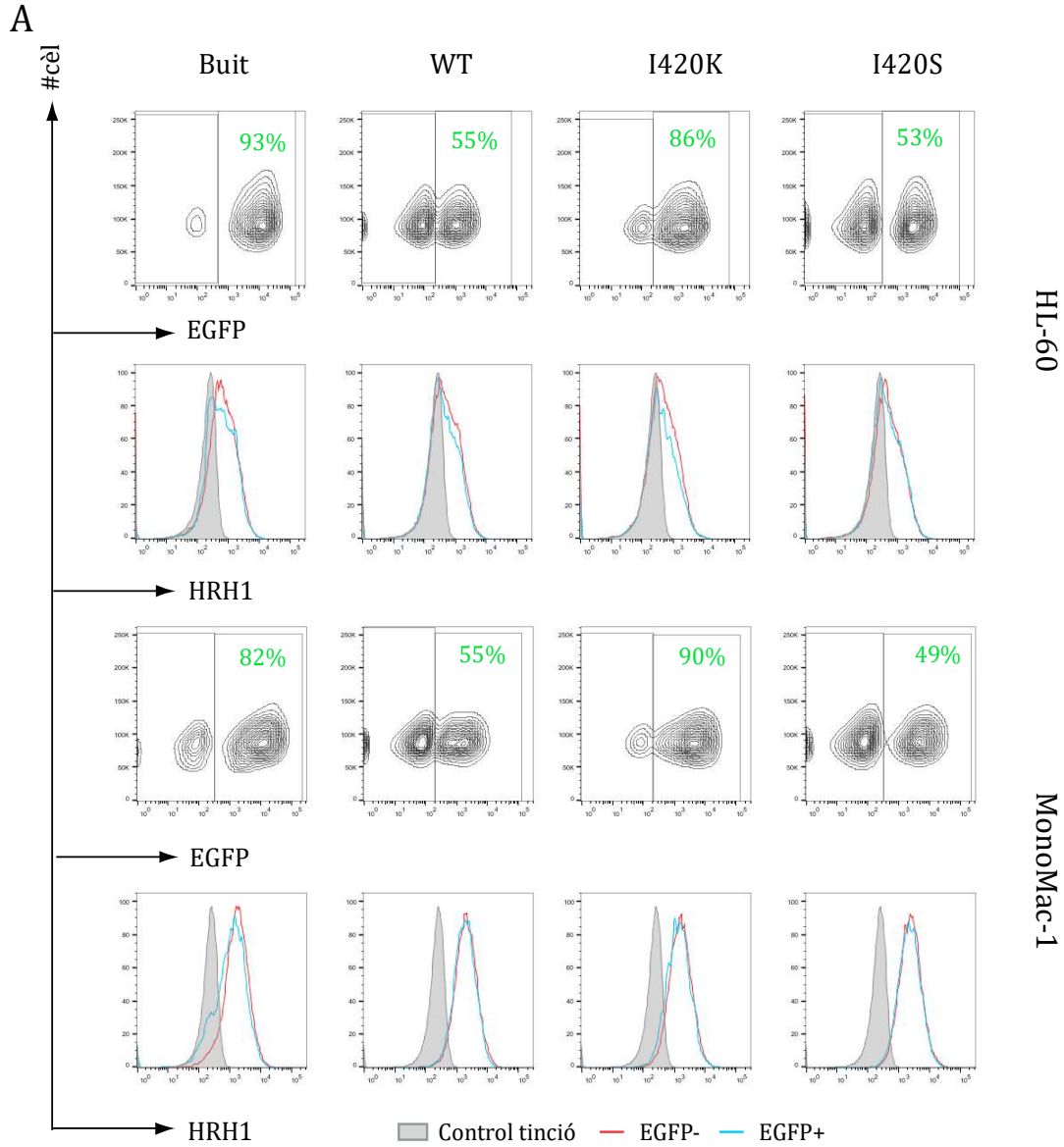


Figura 15. Les formes de HRH1 clonades indueixen senyalització, però no aconseguen una sobreexpressió en línies de LMA. A. Cèl·lules HL-60 i MonoMac-1 es van transduir mitjançant lentivirus amb el vector policistrònic pULTRA buit o amb diverses isoformes de HRH1. El percentatge de transducció (números en verd) es va analitzar per eGFP, i l'expressió de HRH1 es va analitzar dins de les poblacions eGFP+ (transduïdes, blau) i eGFP- (no transduïdes, vermell). En gris es representa en control de tinció amb anticòs secundari. B. Cèl·lules 293T es van cotransfectar amb diferents construccions pEF-HRH1 o vector buit i amb vectors reporters basats en luciferasa dependents de NFAT (esquerra) o element de resposta a sèrum (SRE, dreta). L'activitat luciferasa es representa com a ràtio entre luminiscència de firefly/renilla analitzades per triplicat. WT, HRH1 silvestre; K, HRH1 amb mutació I420K; S, HRH1 amb mutació I420S. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

D'altra banda, es va emprendre una estratègia de regulació negativa mitjançant shRNA o *short hairpin RNA*, RNAs d'interferència que permeten silenciar un gen d'interès formant un llaç complementari a la seva seqüència de mRNA. Així, es van generar dues construccions amb seqüències de shRNA específiques per al silenciament de HRH1 i dues de control, que es van transduir i seleccionar en HL-60 i MonoMac-1. De nou, malgrat l'obtenció de cèl·lules transduïdes amb la construcció, no es va observar una disminució en l'expressió de HRH1 en superfície (Figura 16). Davant la fallida d'aquesta estratègia, es va optar per la regulació negativa mitjançant eines basades en CRISPR, un sistema que permet l'edició genòmica i un nivell de silenciament elevat. En aquest cas, en cap de les múltiples ocasions en què es va realitzar la transducció de dues construccions de CRISPR comercials específiques per al silenciament de HRH1 es va aconseguir la supervivència de les cèl·lules després dels cicles de selecció, sense que s'hagi pogut determinar si aquesta mort s'explica per la letalitat del silenciament del gen o per problemàtiques relacionades amb el procés de transducció.

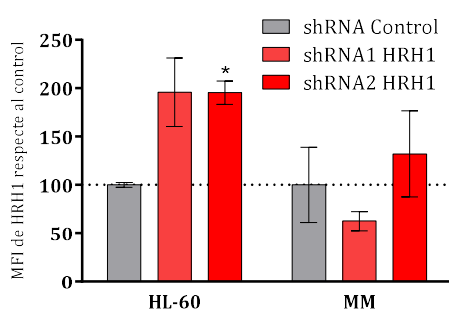


Figura 16. Expressió de HRH1 en línies transduïdes amb shRNAs. L'expressió de HRH1 en superfície es va analitzar en línies cel·lulars transduïdes i seleccionades amb diversos shRNA. Les barres mostren la mitjana de la intensitat de fluorescència (MFI) de HRH1 detectada per citometria de flux i les barres d'error el SEM. * $p < 0,05$ en t-test.

Es constata el fracàs total de totes les estratègies implementades per als estudis de guany i pèrdua de funció, per motius desconeguts. Aquests estudis hauran de ser, doncs, l'objectiu de futura recerca per tal de determinar la rellevància de la senyalització per HRH1 en LMA.

4.2.4. Implicació de la histamina en LMA

Després de l'estudi del receptor HRH1, es va ampliar el focus a la histamina, els seus receptors i el seu metabolisme, per esbrinar si podrien estar implicats en algun aspecte de la patofisiologia de la LMA.

En primer lloc, es va analitzar per PCR semiquantitativa l'expressió dels receptors HRH1-4 i de HDC, l'enzim responsable de la síntesi d'histamina, en quatre línies cel·lulars i una mostra primària de LMA. Com mostra la Figura 17A, el receptor HRH1 s'expressava en totes les línies mieloides, en consonància amb les dades prèviament obtingudes per citometria de flux. El receptor HRH2 mostra una expressió detectable en totes les mostres estudiades excepte en la línia THP-1, mentre que HRH3 i HRH4 no es van poder detectar, suggerint que la seva expressió és pràcticament nul·la en les mostres estudiades. Quant a HDC, només en la mostra primària estudiada i la línia KG-1 es van poder detectar transcrits. En vista de l'heterogeneïtat en les línies de LMA, el producte de la PCR semiquantitativa es va córrer en un gel d'agarosa i es va poder validar que, efectivament, KG-1 és l'única línia que n'expressa nivells detectables (Figura 17B). Per analitzar si els antihistamínics estaven afectant aquest enzim i, en conseqüència, la síntesi d'histamina, es va analitzar l'expressió de HDC després de 24 h de tractament de cèl·lules KG-1. Per a la nostra sorpresa, tres dels antihistamínics estudiats van induir una disminució dramàtica de l'expressió de HDC, mentre que el restant, ebastina, en va induir un increment notable i significatiu (Figura 17C). Aquest aspecte roman, encara, orfe d'explicació per part del grup de recerca.

No sembla, doncs, que la síntesi d'histamina sigui un procés universal en LMA, en no expressar-se l'únic enzim capaç de sintetitzar-la en 3 de les 4 línies cel·lulars analitzades. Així les coses, es va abandonar l'estudi de la síntesi per les mateixes cèl·lules i es va analitzar l'efecte del subministrament d'histamina exògena en línies cel·lulars. Després de 48h de tractament amb altes quantitats d'histamina es va observar un lleuger però significatiu augment de número de cèl·lules en KG-1, i cap canvi rellevant en les altres dues línies. Seria interessant, llavors, analitzar els possibles efectes a més llarg termini i sobre la proliferació, anàlisis que seran efectuats en futurs projectes.

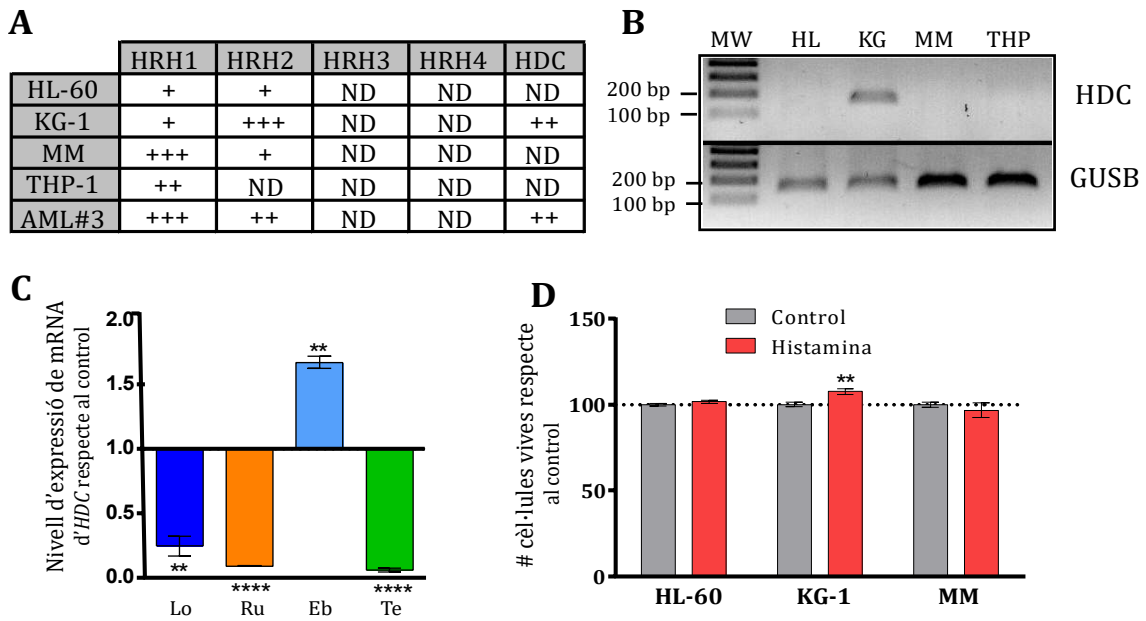


Figura 17. Expressió de gens relacionats amb histamina en LMA. **A.** Es van realitzar PCRs semiquantitatives a partir de cDNA de les línies cel·lulars HL-60, KG-1, MonoMac-1, THP-1 i una mostra primària amb encebadors específics per als gens *HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4* i *HDC*. En base a l'amplificació observada en dos experiments independents es van establir nivells d'expressió de menor (+) a major (+++). ND: no detectat. **B.** El producte de l'amplificació amb el gen *HDC* i el control *GUSB* en línies cel·lulars es va córrer en un gel d'agarosa. MW: marcador de pes molecular. **C.** Es van tractar cèl·lules KG-1 24h amb vehicle, loratadina 10 μ M (Lo), rupatadina 10 μ M (Ru), ebastina 5 μ M (Eb) o terfenadina 5 μ M (Te) i se'n va extreure mRNA i convertir a cDNA. Es va realitzar una PCR semiquantitativa amb encebadors específics per a *HDC* i *GUSB*. Les barres mostren el nivell d'expressió de *HDC* respecte al control després de normalitzar per al gen constitutiu *GUSB* en triplicats de dos experiments independents. **D.** Cèl·lules de les línies HL-60, KG-1 o MonoMac-1 (MM) van ser tractades amb vehicle (control, gris) o amb histamina 200 μ M (vermell) i se'n va analitzar la viabilitat a les 48h. Les barres mostren la mitjana de número de cèl·lules viues respecte al control en triplicats de quatre experiments independents. Totes les barres d'error representen el SEM ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Finalment, per sondejar la possible existència de mutacions en gens importants del sistema de senyalització per histamina en pacients de LMA, es va consultar la base de dades del projecte TCGA-LAML, que forma part del *The Cancer Genome Atlas* (www.cancergenome.nih.org) i que conté dades de mutacions de 144 pacients de LMA. En aquesta cohort, es van detectar mutacions en *HRH1*, *HRH2*, *HDC*, *HNMT* i *DAO* en tan sols 1/144 pacients en cadascun dels gens (Taula 15), suggerint que no es tracta d'un conjunt de gens freqüentment mutats i que, si bé podrien jugar algun paper en la patofisiologia de la LMA, aquest no es produiria a través de mutacions que n'alteressin la funció.

Gen	Funció	Citobanda	#pacients mut	Conseqüència
<i>HRH1</i>	Receptor	3p25.3	1	Error de sentit E282K
<i>HRH2</i>	Receptor	5q35.2	1	5'UTR
<i>HRH3</i>	Receptor	20q13.33	0	-
<i>HRH4</i>	Receptor	18q11.2	0	-
<i>HDC</i>	Síntesi	5q21.2	1	Intró
<i>HNMT</i>	Catabolisme	2q22.1	1	Intró
<i>DAO</i>	Catabolisme	12q24.11	1	Error de sentit W320L

Taula 15. Mutacions en gens del sistema de senyalització per histamina en la cohort de pacients de TCGA-LAML. #pacients mut mostra el número total de pacients amb alguna mutació d'entre els 144 de què es disposa dades.

Al llarg d'aquest conjunt d'experiments hem observat com *HRH1* s'expressa en cèl·lules mieloides tant sanes com neoplàsiques, amb uns alts nivells d'expressió relacionats amb risc favorable en LMA, mentre que les cèl·lules limfoides tant sanes com de línies neoplàsiques no l'expressen. A nivell de mRNA, s'ha detectat també l'expressió de *HRH2* en la majoria de línies i de *HDC* tan sols en una, i s'ha observat com el subministrament exogen d'histamina no produeix efectes destacats a curt termini. L'estudi de la implicació del sistema histaminèrgic en LMA es troba encara a les beceroles, en no haver estat possibles els estudis de guany i pèrdua de funció, que hauran d'aportar informació valuosa en el futur, però sí que s'ha descartat un paper fonamental al fenotip de la transformació de LMA.

4.3. Estudi preclínic del potencial dels antihistamínics per a neoplàsies hematològiques

4.3.1. Estudi preclínic en línies cel·lulars de LMA

Després d'identificar els antihistamínics com a fàrmacs potencialment antileucèmics, haver validat l'efecte antileucèmic de terfenadina en una línia cel·lular de LMA i haver observat l'expressió de HRH1 en línies cel·lulars de LMA, es van analitzar els efectes citotòxics de diversos moduladors dels receptors d'histamina. 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 d'aquestes línies es van tractar 72h amb diversos compostos a una concentració final de 10 µM, una concentració típica als cribratges per al descobriment de *hits* (Hughes, Rees et al. 2011). Per estudiar els efectes a diferents punts del sistema histaminèrgic, es va utilitzar histamina com a agonista endogen de tots els receptors HRH, i un ampli repertori d'antagonistes o agonistes inversos de receptors d'histamina específics dels subtipus HRH1 (acrivastina, clemastina, cetirizina, ciproheptadina, ketotifèn, fexofenadina, loratadina, rupatadina, terfenadina i ebastina, antihistamínics), HRH2 (ranitidina, cimetidina i famotidina), HRH3 (JNJ-5207852) i HRH4 (JNJ-777120 i JNJ-10191584). La selecció d'antihistamínics a testar va tenir en compte l'estratègia de resposicionament de fàrmacs, i es van prioritzar antihistamínics de segona generació aprovats per la FDA.

Com recull la Figura 18, els resultats en totes quatre línies van ser similars; ni la histamina ni cap dels antagonistes o agonistes inversos dels receptors HRH2, HRH3 i HRH4 van mostrar efectes citotòxics rellevants. Per contra, 4 dels 10 antihistamínics estudiats van induir efectes citotòxics potents. D'una banda, aquests resultats encaixen amb anteriors observacions que l'únic receptor d'histamina detectat a totes quatre línies cel·lulars és HRH1. De l'altra, resulta sorprenent la dràstica diferència d'acció entre antihistamínics (antagonistes de HRH1), que ens va portar a separar-los en dos grups, que vam batejar com a antihistamínics antineoplàsics (ANHA, incloent terfenadina, ebastina, loratadina i rupatadina) i antihistamínics no-antineoplàsics (no-ANHA, incloent la resta). Aquests dos grups no es solapaven amb cap classificació evident: ni per famílies químiques, ni per classificacions funcionals de primera i segona generació. Especialment insòlites van resultar les discrepàncies entre els efectes de fàrmacs enormement similars com terfenadina i fexofenadina, discrepàncies que no van ser explicades fins més endavant.

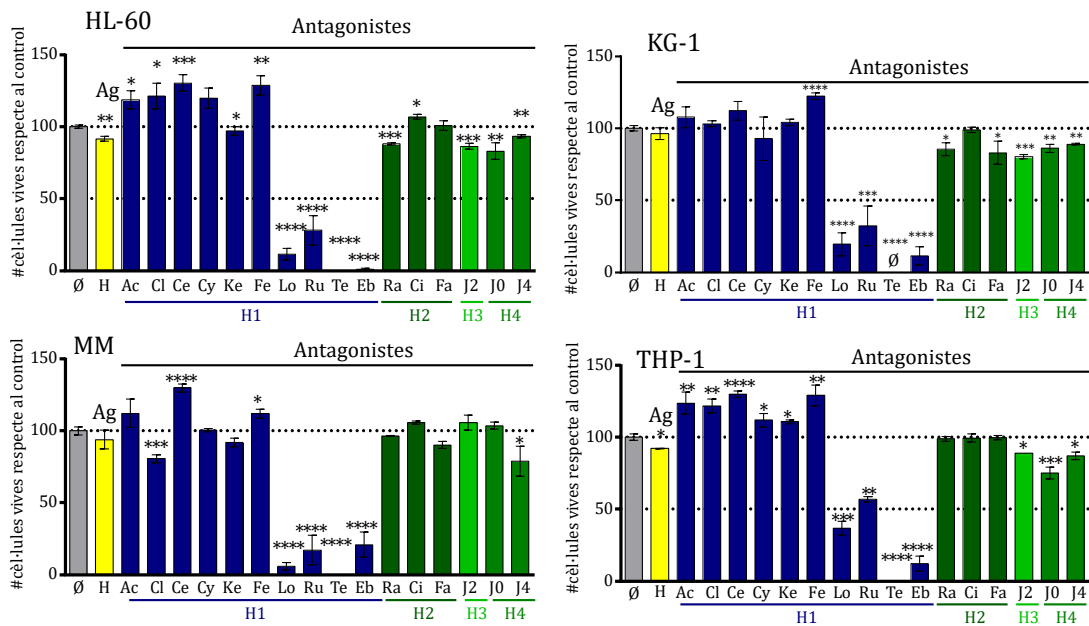
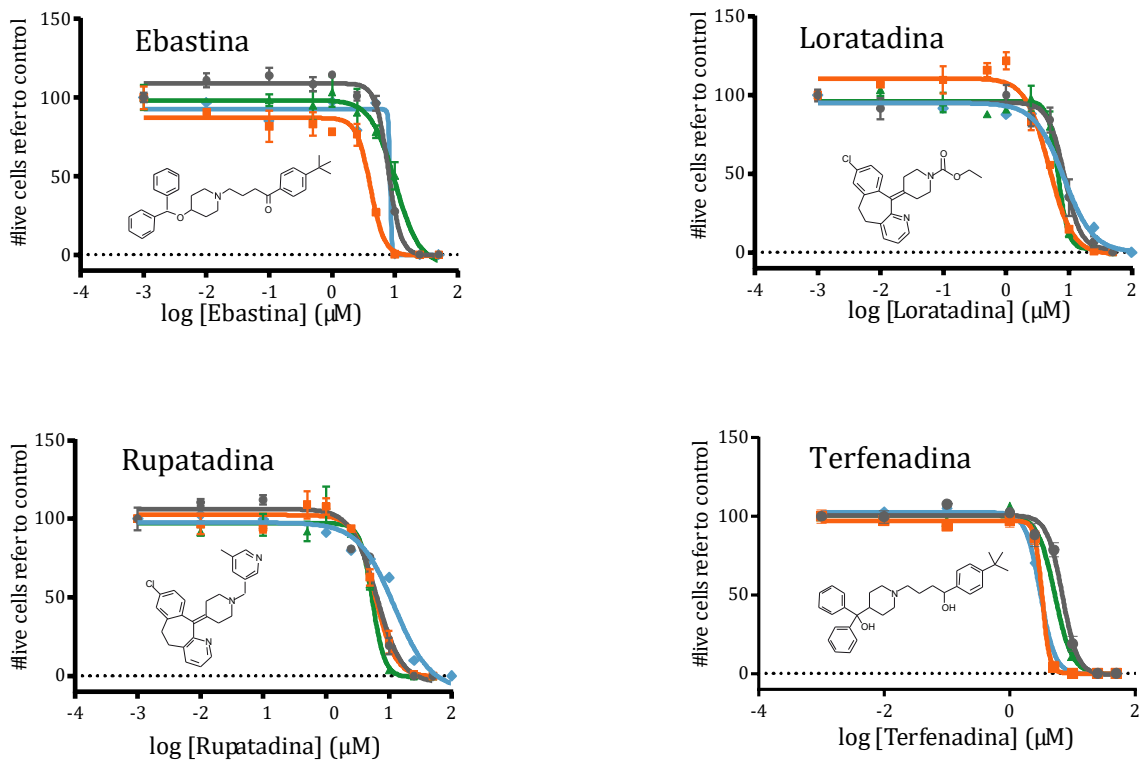


Figura 18. Un subgrup d'agonistes inversos de HRH1 mostren efectes antileucèmics en línies cel·lulars de LMA. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 (MM) i THP-1 es van tractar 72 h amb lligands dels receptors d'histamina a 10 μ M, i se'n va mesurar la viabilitat per citometria. Agonista: histamina (H, groc). Antagonistes o agonistes inversos de HRH1 (blau): acrivastina (Ac), clemastina (Cl), cetirizina (Ce), ciproheptadina (Cy), ketotifèn (Ke), fexofenadina (Fe), loratadina (Lo), rupatadina (Ru), terfenadina (Te), ebastina (Eb). Antagonistes o agonistes inversos de HRH2 (verd fosc): ranitidina (Ra), cimetidina (Ci), famotidina (Fa). Antagonista de HRH3 (verd clar): JNJ5207852 (J2). Antagonistes de HRH4 (verd): JNJ7777120 (J0), JNJ10191584 (J4). Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents.

Un cop identificat un subgrup d'antihistamínics amb interessant potència antineoplàsica en línies cel·lulars de LMA, se'n va caracteritzar el rang d'acció mitjançant la realització de corbes de citotoxicitat dosi-resposta, que ens van permetre determinar les concentracions efectives 50 (EC_{50}), a les quals un compost produeix la meitat del seu efecte màxim. Veient els potents efectes citotòxics a 72h, a més, es va optar per disminuir els tractaments a 48h. Com es mostra a la Figura 19, les EC_{50} es trobaven al rang micromolar baix, oscil·lant entre 3 i 12 μ M. En general, la línia més sensible als tractaments va ser KG-1, i l'antihistamínic més efectiu terfenadina. Aquestes dades van permetre optimitzar les concentracions per a experiments futurs. A més, es va sondejar superficialment l'efecte d'altres antihistamínics a concentracions més altes a 72h i es va observar que acrivastina, fexofenadina i cetirizina no afectaven la viabilitat de línies de LMA fins i tot a 100 μ M, mentre que ciproheptadina, ketotifèn i clemastina mostraven EC_{50} s entre 20 i 50 μ M.



		EC ₅₀ (µM)			
		Ebastina	Loratadina	Rupatadina	Terfenadina
—●—	HL-60	7,85	8,49	6,33	6,89
—■—	KG-1	4,09	4,79	6,04	3,29
—▲—	MonoMac-1	10,21	6,75	5,45	5,24
—◆—	THP-1	8,44	8,31	12,19	3,07

Figura 19. Els ANHA tenen efectes antileucèmics al rang micromolar baix. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar amb concentracions creixents d'ebastina, loratadina, rupatadina i terfenadina, i la viabilitat es va analitzar a les 48 h. Cada gràfic mostra la corba dosi-efecte d'un ANHA, i les EC₅₀ es troben recollides a la taula inferior. Cada punt representa la mitjana d'un triplicat ± SEM.

A banda de l'anàlisi de la viabilitat cel·lular, es va realitzar una anàlisi de l'efecte dels antihistamínics sobre la proliferació mitjançant la tinció amb CFSE i la determinació de la seva intensitat, que disminueix amb la proliferació. Com mostra la Figura 20, al llarg dels dies hi ha una diferència significativa en la tinció de CFSE amb el tractament amb ANHAs, indicativa d'una menor proliferació. Contràriament, amb el tractament amb el no-ANHA fexofenadina no s'observen diferències, suggerint que no només no és capaç d'induir la mort cel·lular o la diferenciació, sinó que a més no té cap efecte sobre la proliferació a temps més llargs com set dies.

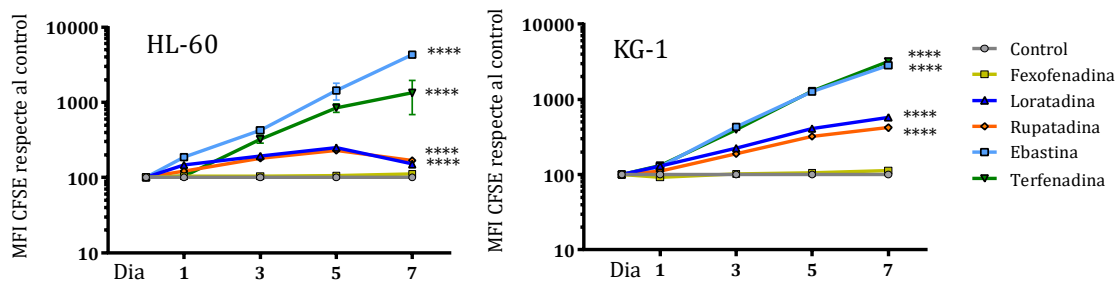


Figura 20. Els ANHA disminueixen la proliferació de línies cel·lulars de LMA. Cèl·lules HL-60 i KG-1 es van tenir amb CFSE i es van tractar amb fexofenadina (20 μ M), loratadina (10 μ M), rupatadina (10 μ M), ebastina (5 μ M) i terfenadina (5 μ M). Es representa la mitjana de la intensitat de fluorescència (MFI) de CFSE respecte al control tractat amb vehicle a dia 1, 3, 5 i 7. ****p<0,0001 en tests ANOVA de mesures repetides de dos factors.

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'eradicació de cèl·lules leucèmiques, es van analitzar els efectes dels antihistamítics sobre l'expressió de marcadors de diferenciació mieloide (CD11b, CD11c i CD14) per citometria de flux després de 72h de tractament i a concentracions on no es produís un excés de mort cel·lular. Com que s'han identificat els fàrmacs en un cribratge basat en la reversió d'una signatura de transformació i el bloqueig en la diferenciació és un esdeveniment fonamental en aquest procés, una inducció de la diferenciació suposaria, a més, una validació indirecta del cribratge. Curiosament, l'únic dels fàrmacs estudiats sorgit directament del cribratge, terfenadina, no va mostrar efectes sobre els marcadors de diferenciació. Per contra, loratadina, rupatadina i ciproheptadina van mostrar una potent inducció de l'expressió de tots tres marcadors mieloides en totes les línies cel·lulars i en general de manera dosi dependent (Figura 21). Ebastina va mostrar efectes inductors de diferenciació més lleus, però igualment molt potents quant a CD11b, i efectes en CD11c i CD14 dependents de la línia cel·lular. En altres experiments en què es va sondejar l'expressió d'aquests marcadors tractant amb antagonistes d'altres receptors d'histamina i amb antihistamítics no-ANHA no es va observar inducció de la diferenciació, en concordança amb la seva manca d'efecte citotòxic. Totes aquestes observacions suggereixen que els ANHA, a banda de tenir efectes citotòxics, són en general inductors de la diferenciació mieloide en línies de LMA.

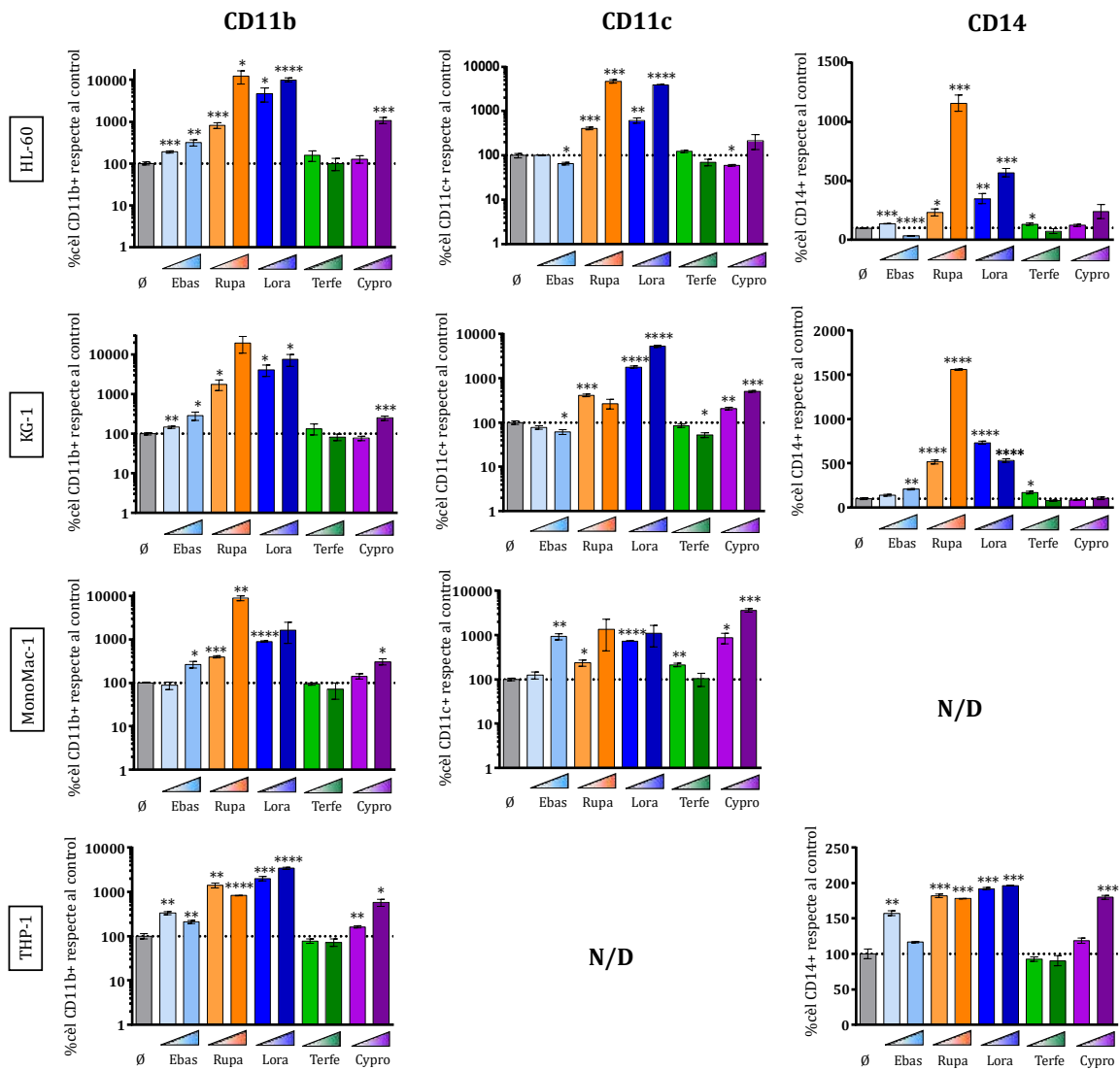


Figura 21. Alguns antihistamítics indueixen la diferenciació de línies cel·lulars de LMA. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 72h amb ebastina (Ebas, 1 i 5 μ M), rupatadina (Rupa, 5 i 10 μ M), loratadina (Lora, 5 i 10 μ M), terfenadina (Terfe, 1 i 5 μ M) i ciproheptadina (Cypro, 10 i 50 μ M) i l'expressió en superfície dels marcadors de diferenciació mioelode CD11b, CD11c i CD14 es van analitzar a les 72 h per citometria de flux. Les barres mostren la mitjana \pm SEM del percentatge de cèl·lules positives per a cada marcador respecte al control tractat amb vehicle (triplicats de dos experiments independents). N/D, dades no disponibles. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

En estreta relació amb la diferenciació i amb la proliferació, es va estudiar en línies cel·lulars de LMA l'efecte dels ANHA sobre el cicle cel·lular per citometria de flux a les 24 h de tractament. En concordança amb els anteriors resultats, es va observar en general un arrest del cicle cel·lular a la fase G2/M manifestat en un augment de cèl·lules en G2/M i una disminució de cèl·lules en G0/G1 (Figura 22).

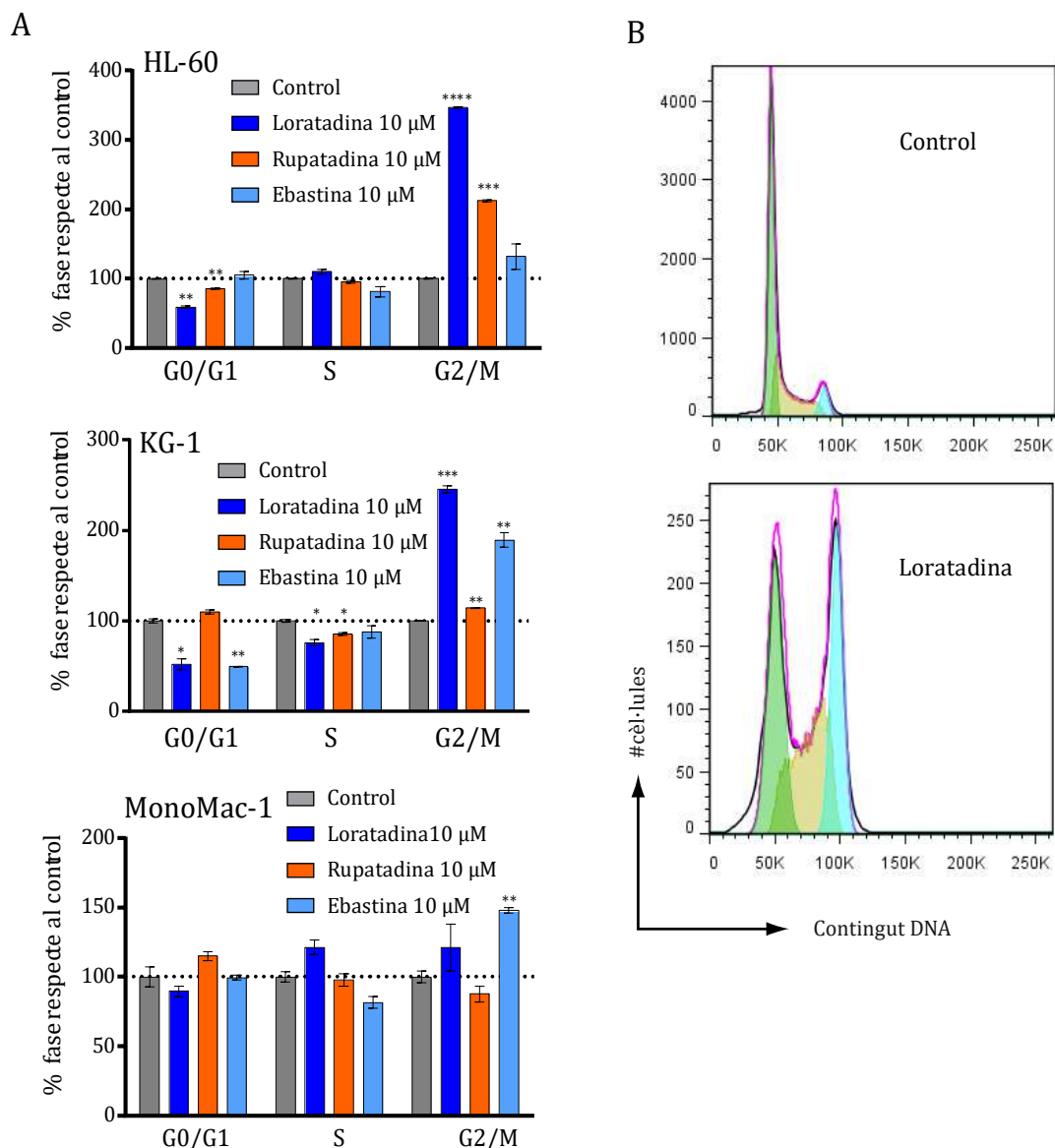


Figura 22 . Els ANHA indueixen arrest del cicle cel·lular en fase G2/M. Es van tractar cèl·lules HL-60, KG-1 i MM amb loratadina 10 μ M, rupatadina 10 μ M o ebastina 10 μ M a 24h i es va quantificar el percentatge de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular per citometria de flux. **A.** Percentatge de cèl·lules en cada fase respecte al control \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. **B.** Imatges representatives de citometria de cèl·lules HL-60 control i tractades amb loratadina. Fases del cicle determinades per Dean-Jett-Fox; verd, G0/1; groc, S; blau, G2/M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (t-test).

Per analitzar si els antihistamínics afectaven la capacitat d'autorenovació a llarg termini, es van realitzar estudis de clonogenicitat a 10 dies amb línies cel·lulars de LMA. Com s'observa a la Figura 23, tots quatre ANHAs van produir una disminució dràstica de la capacitat de formació de colònies, que suggereix un efecte sobre la població més primitiva.

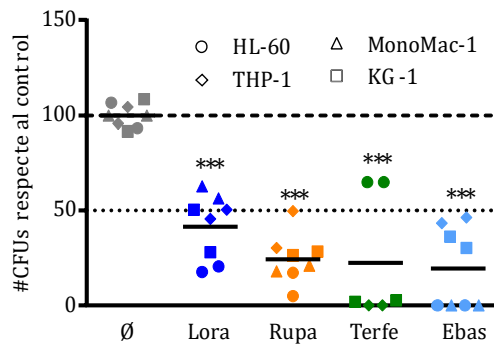


Figura 23. Els ANHA redueixen la capacitat clonogènica de línies cel·lulars de LMA. Cèl·lules HL-60 (cercles), KG-1 (quadrats), MonoMac-1 (triangles) i THP-1 (rombes) es van tractar 18h amb loratadina 10 μ M (Lora) rupertadina 10 μ M (Rupa), terfenadina 10 μ M (Terfe) o ebastina 10 μ M (Ebas) i es van 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-tests aparellats.

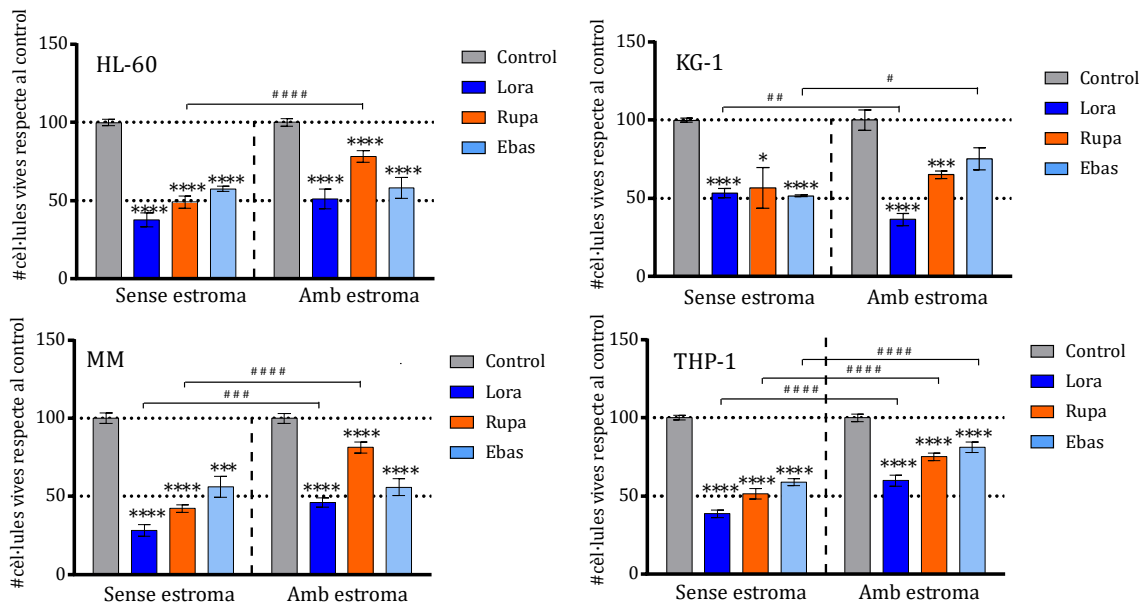


Figura 24. L'estroma reverteix només parcialment els efectes dels ANHA. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 48h amb loratadina 10 μ M (Lora) rupertadina 10 μ M (Rupa) o ebastina 5 μ M (Ebas) en presència o absència de la línia cel·lular d'estroma de medul·la òssia HS-5. Les barres representen la mitjana \pm SEM de cèl·lules vives de cada línia de LMA respecte al 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 #### $p < 0.0001$.

Durant la realització d'aquesta bateria d'estudis preclínic en línies cel·lulars es va considerar rellevant analitzar l'efecte del microambient medul·lar sobre l'acció dels ANHAs. S'ha descrit que l'entorn medul·lar de la LMA contribueix a un pitjor funcionament de la quimioteràpia, i una manera d'analitzar aquest efecte és mitjançant cocultiu amb la línia cel·lular humana d'estroma de medul·la òssia HS-5, un tipus d'experiment en què prèviament s'ha descrit l'efecte protector d'estroma sobre diversos tractaments (Garrido, Appelbaum et al. 2001). Es van cultivar, doncs, cèl·lules de línies de LMA soles o en cocultiu amb HS-5 i es va analitzar l'efecte citotòxic dels ANHA al cap de 48h per citometria de flux. Com es pot observar a la Figura 24, es va observar en general una certa reversió de l'efecte dels ANHA, però aquesta reversió va ser en la majoria dels casos més aviat lleugera, sense observar-se en cap cas una protecció total, i suggerint que l'acció dels ANHA no es troba greument pertorbada pel microambient, si bé es tracta sols d'un conjunt d'experiments que no arriben a aprofundir en la qüestió.

Es considera que, atesa l'heterogeneïtat de la LMA i les múltiples vies alterades sobre què es sustenta, les millores en els tractaments vindran de combinacions de teràpies, i no de monoteràpies (Estey, Levine et al. 2015; Kayser i Levis 2018). Per aquest motiu, es van realitzar en línies cel·lulars de LMA experiments de citotoxicitat d'ebastina en combinació amb citarabina, un quimioterapèutic fonamental al tractament actual de la LMA. Es va voler analitzar si ebastina, en exercir efectes presumiblement a través de vies diferents a citarabina, era capaç de produir mort addicional a la de citarabina a concentracions mitjanes-altes. Es va observar com, efectivament, ebastina a 5 μ M eliminava les cèl·lules resistents a altes concentracions de citarabina (Figura 25). D'especial interès van resultar les observacions fetes en la línia cel·lular KG-1, on l'acció de citarabina s'estanca sobre els 100 nM, romanent una població de cèl·lules resistents, que ebastina va ser capaç d'eliminar. La combinació d'ebastina a 5 μ M i citarabina a 100 nM, a més, va ser més potent que el tractament només amb citarabina a 200 nM.

Per analitzar si les combinacions mostraven efectes sinèrgics, additius o antagonics i ampliar l'estudi a altres ANHA, es va combinar citarabina i loratadina, rupatadina o ebastina. D'una banda se'n va calcular l'EOPA (valors positius indiquen sinèrgisme, negatius antagonisme) i de l'altra l'índex de combinació (CI, valors <1 sinèrgisme, valors >1 antagonisme). Es tracta de càlculs basats en models d'additivisme diferents, i en tots dos casos els valors van indicar efectes sinèrgics (Figura 26).

Aquests resultats fan que resulti atractiva l'opció de combinar ebastina i d'altres ANHA amb quimioteràpia convencional, si bé es tracta sols d'estudis molt preliminars i caldria efectuar assaigs de combinació més exhaustius.

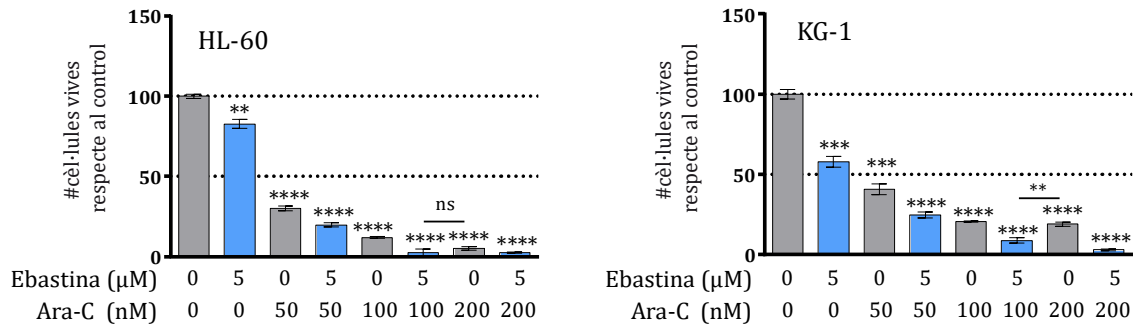


Figura 25. Ebastina permet efectes citotòxics addicionals als de citarabina. Es van tractar cèl·lules HL-60 i KG-1 amb diverses concentracions d'ebastina i citarabina (ara-C), i es va analitzar la viabilitat a les 48h per citometria de flux. Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu (de tres realitzats). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, no significatiu (t-test).

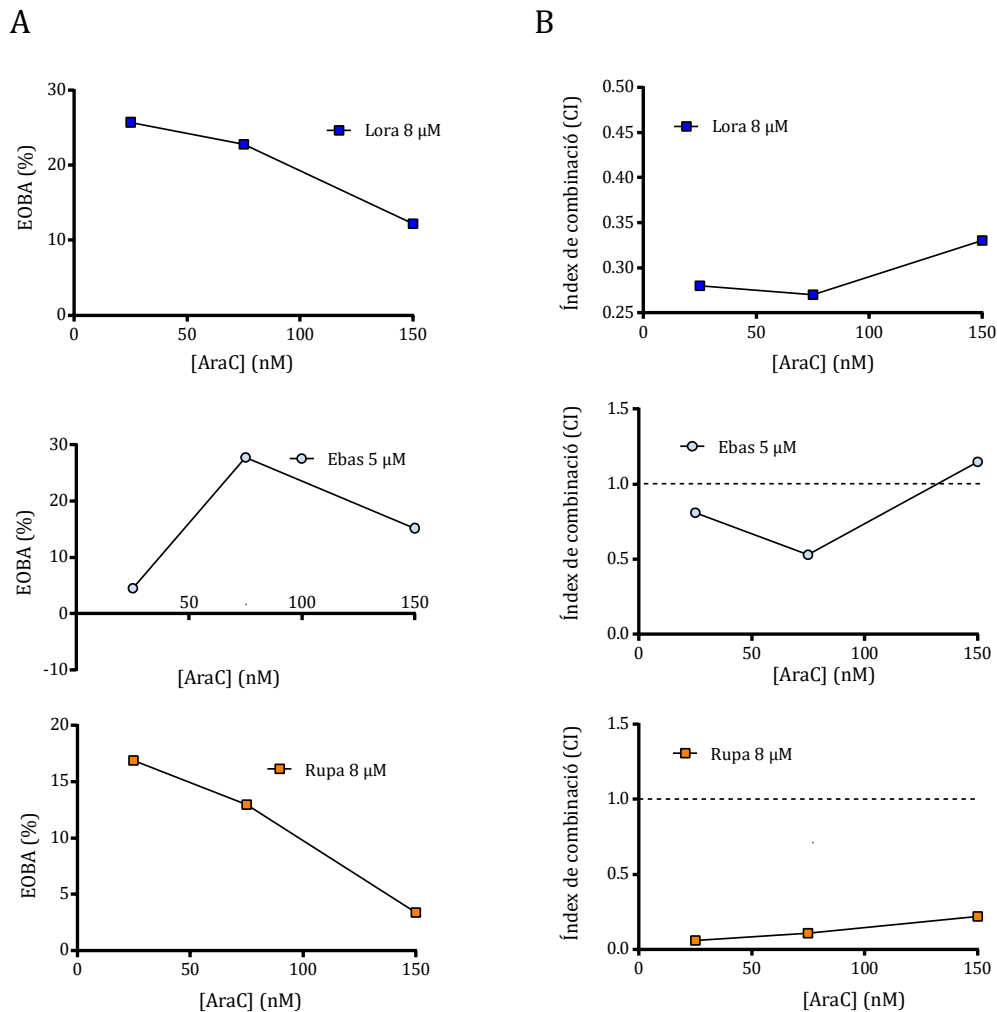


Figura 26. Els ANHA mostren sinergisme amb citarabina. Es van testar els efectes citotòxics a les 48h en cèl·lules KG-1 de combinar citarabina (ara-C 25, 75 i 150 nM) amb loratadina 8 μ M, ebastina 5 μ M o rupatadina 8 μ M. Es representen **A.** Els Eoba o **B.** Els índex de combinació, calculats a partir de la mitjana de triplicats.

En vista d'aquests resultats, es va estudiar l'efecte dels ANHA sobre l'expressió a nivell de mRNA de *BIRC5*, del qual se n'ha descrit la importància per l'autorenovació de les LSCs i la resistència a quimioteràpia (Carter, Qiu et al. 2012; Hu i Li 2016). En les tres línies cel·lulars estudiades es va observar una disminució general en l'expressió, especialment consistent en el cas d'ebastina (Figura 27), i suggerint que la senyalització per *BIRC5* podria estar relacionada amb els efectes sinèrgics prèviament observats.

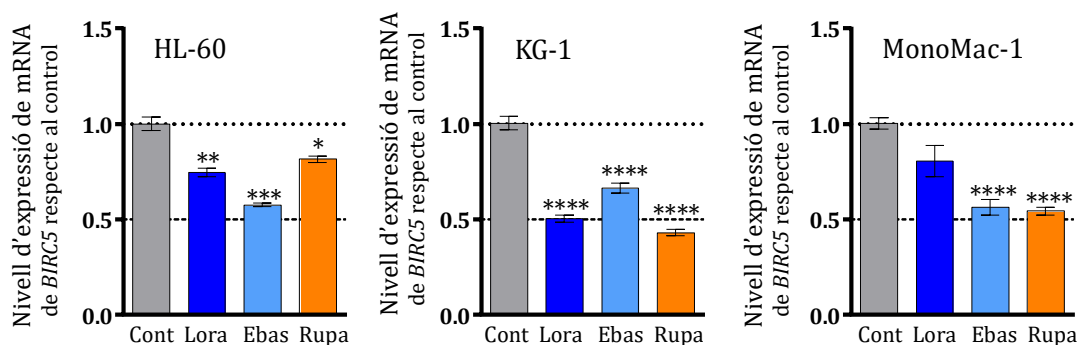


Figura 27. Els ANHA disminueixen l'expressió de BIRC5. Es van tractar 24h cèl·lules HL-60, KG-1 o MonoMac-1 amb loratadina 10 μ M (Lora), ebastina 5 μ M (Ebas) o rupatadina 10 μ M (Rupa), i passat aquest temps se'n va extreure i retrotranscriure l'RNA a partir del qual es va realitzar una PCR semiquantitativa per al gen *BIRC5* amb *GUSB* com a control d'expressió. Es mostra el *fold change*, ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). 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).

4.3.2. Estudi preclínic en cèl·lules hematopoètiques primàries sanes i neoplàsiques

Havent validat i caracteritzat l'efecte antileucèmic dels ANHAs en línies cel·lulars, es va prosseguir amb els estudis preclínic analitzant el seu efecte sobre blasts de 13 pacients de LMA. Després d'una prova pilot i en vista d'uns efectes menors, es va decidir estudiar els efectes dels ANHA a temps més llargs (3 i 6 dies) i a concentracions de loratadina i rupatadina més altes. Com mostra la Figura 28, els ANHAs posseeixen efectes citotòxics dependents de dosi més lleus que en línies cel·lulars però igualment potents, particularment en el cas d'ebastina i terfenadina que, ja a dia 3, són capaços d'eliminar el 100% de blasts de la majoria de mostres i més del 75% de la mitjana. Si bé l'eliminació de la majoria de la població blàstica és important a l'hora de desenvolupar nous tractaments per a la LMA, ho és també l'eliminació de la població més primitiva amb més capacitat d'autorenovació, que vam analitzar per experiments de formació de CFUs. Aquests estudis consisteixen en un tractament de 18h amb el fàrmac d'interès seguit del cultiu amb un medi semisòlid amb citocines instructives que permet la generació de colònies de cèl·lules a partir de cèl·lules que mantenen la capacitat d'autorenovació. Com es desprèn de la Figura 28B, els efectes en aquests estudis van ser similars als observats en experiments de

citotoxicitat, suggerint que els ANHA afecten la capacitat d'autorenovació de les cèl·lules leucèmiques més primitives. Atès que en línies cel·lulars s'havia observat una inducció de l'expressió de marcadors de diferenciació mieloide CD11b i CD14, es va analitzar si aquest efecte es mantenia *ex vivo*.

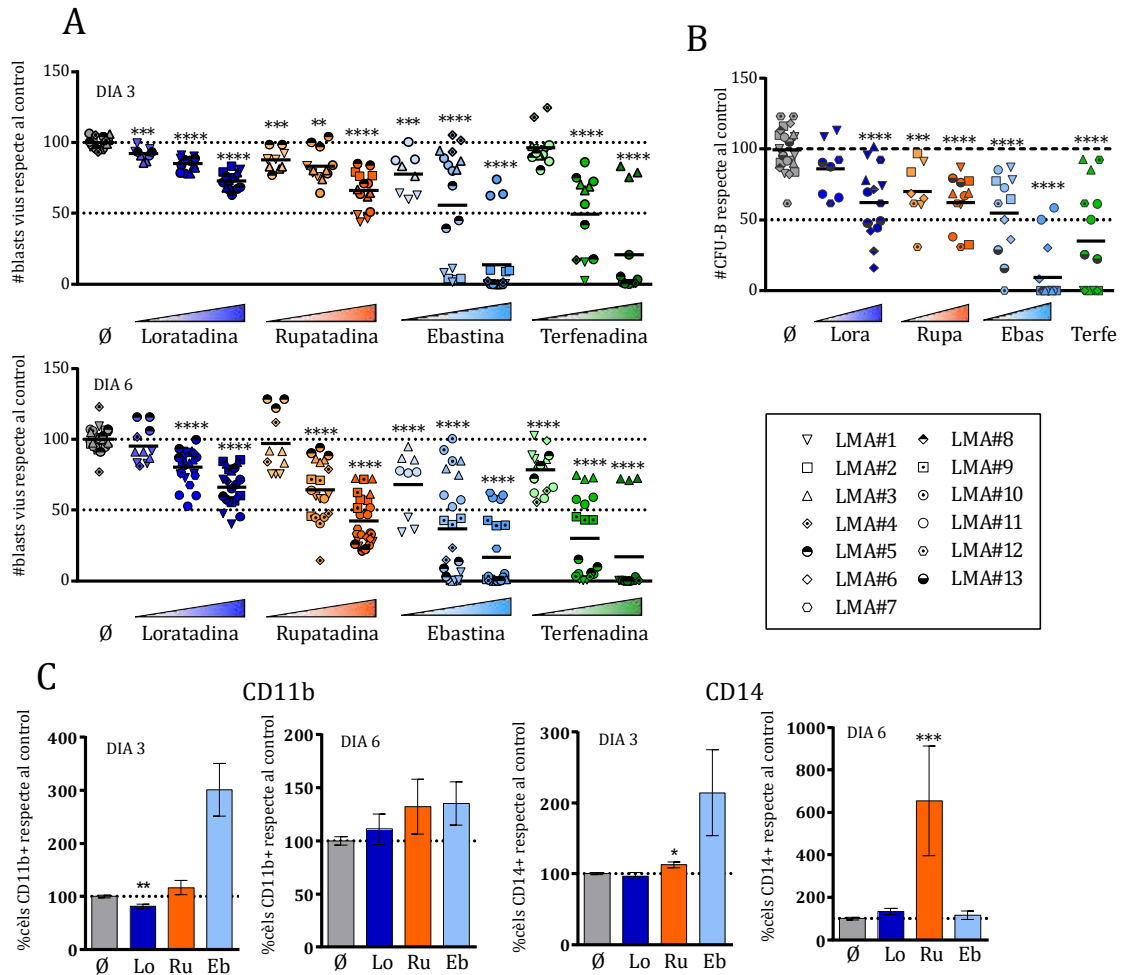


Figura 28. Els ANHA mostren efectes antileucèmics *ex vivo*. **A.** Es van tractar 13 mostres de LMA amb loratadina (5, 10 i 20 μ M), rupatadina (5, 10 i 20 μ M), ebastina (1, 5 i 10 μ M) i terfenadina (1, 5 i 10 μ M) i la viabilitat dels blasts es va analitzar al cap de 3 i 6 dies. Cada símbol representa una mostra i cada punt una mesura experimental (triplicats). **B.** Es va analitzar la capacitat clonogènica de mostres de LMA després de 18h de tractament amb loratadina (10 i 20 μ M), rupatadina (10 i 20 μ M), ebastina (5 i 10 μ M) i terfenadina (5 i 10 μ M) i posterior cultiu de 15 dies en medi semisòlid. Passat aquest temps es van comptar les colònies en base a la morfologia i la cel·lularitat. Cada símbol representa una mostra i cada punt una mesura experimental (duplicats). **C.** Es va analitzar l'expressió dels marcadors de diferenciació CD11b i CD14 en mostres de pacients de LMA tractades amb loratadina 20 μ M (Lo), rupatadina 20 μ M (Ru) o ebastina 5 μ M (Eb) al cap de 3 o 6 dies de tractament. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ en tests de Mann-Whitney.

A la Figura 28 es pot observar com no es produeix un efecte consistent sobre l'expressió d'aquests marcadors en blasts leucèmics, sent l'únic efecte significatiu i rellevant l'augment del percentatge de cèl·lules CD14+ en blasts tractats amb rupatadina. Es pot dir, per tant, que la observació feta en línies no es manté en aquest estudi *ex vivo*, tal vegada per una major heterogeneïtat de l'expressió basal de CD14, tal vegada per d'altres motius. Cal no oblidar que es va optimitzar el protocol per a l'anàlisi de la citotoxicitat i no de la diferenciació, de manera que podria succeir que, de manera similar a la mort cel·lular, la inducció de la diferenciació succeís a temps més llargs que en línies cel·lulars.

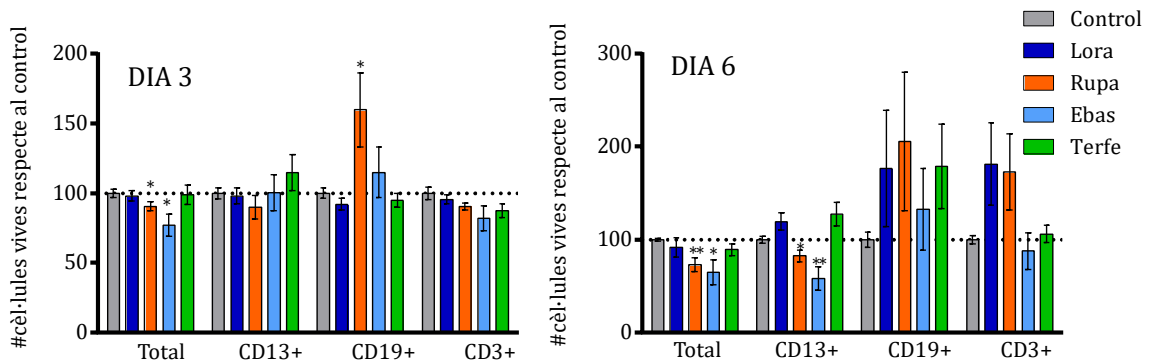
Per comprovar si aquests efectes afectaven específicament les cèl·lules de LMA o mostraven un patró de toxicitat general inespecífica, es van replicar els experiments anteriors amb mostres sanes. D'una banda es va analitzar la citotoxicitat sobre cèl·lules provinents de capes leucocitàries de donants sans, tant sobre el global de cèl·lules mononucleades com sobre la població mieloide i limfoide T i B. Com mostra la Figura 29A, rupatadina 20 μM , loratadina 20 μM i terfenadina 5 μM pràcticament no van afectar la viabilitat de les cèl·lules de capa leucocitària. Això no obstant, ben aviat en experiments preliminars terfenadina a 10 μM va demostrar una toxicitat del 100% en algunes cèl·lules sanes. Tenint en consideració, així mateix, que es tracta d'un fàrmac retirat del mercat per efectes cardiotòxics es va descartar com a candidat i es va interrompre part de la recerca amb aquest compost. Per la seva banda, ebastina a 10 μM va mostrar un efecte significatiu i rellevant, en especial sobre la població mieloide als 6 dies de tractament, que es va veure disminuïda pràcticament a la meitat.

A banda d'estudiar l'efecte sobre cèl·lules hematopoètiques madures, es va estudiar l'efecte sobre la funcionalitat de cèl·lules mare hematopoètiques (HSC) mitjançant experiments de clonogenicitat amb cèl·lules de sang de cordó umbilical negatives per marcadors de llinatge (lin-). En aquest cas, només terfenadina va mostrar efectes significatius, mostrant una disminució d'aproximadament el 25% en la capacitat de generació de colònies hematopoètiques, mentre que la resta de fàrmacs no van mostrar efectes rellevants ni a nivell del número total de colònies ni a nivell de la proporció dels diferents subtipus de progenitor (Figura 29B). Un cop analitzats els efectes *ex vivo* de cèl·lules tant sanes com neoplàsiques, es van comparar per establir l'efecte diferencial i determinar una finestra terapèutica. Loratadina, rupatadina i ebastina a les concentracions estudiades van mostrar un clar efecte diferencial, sent entre aproximadament 2 i 16 vegades més potents en LMA que en cèl·lules sanes. El tractament amb un major efecte diferencial és, sens dubte, el d'ebastina a 5 μM , que suposa una

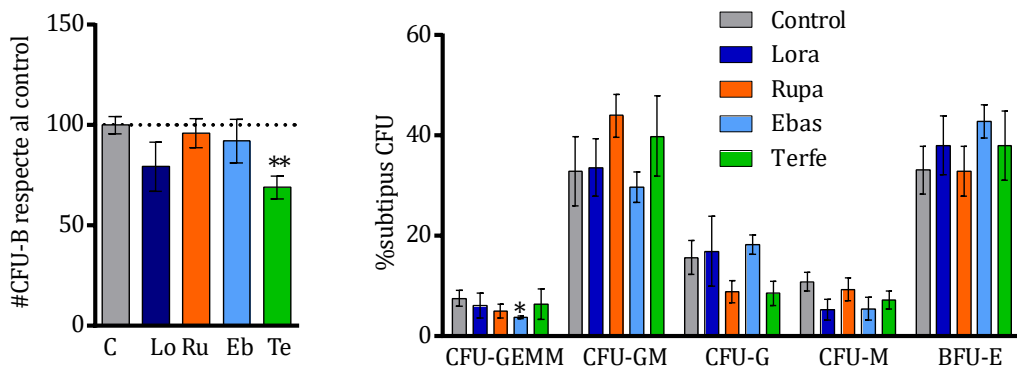
finestra terapèutica interessant. Malgrat això, ebastina a 10 μM permet una eliminació molt més completa de la població leucèmica mantenint un efecte diferencial important, motiu pel qual es va escollir aquesta concentració per als experiments *in vivo*.

Es pot dir doncs que, si bé ebastina afecta la viabilitat de cèl·lules madures de donants sans, no afecta la població més primitiva i mostra un clar efecte diferencial, afectant molt més les cèl·lules leucèmiques que les sanes, i esdevenint en candidat més atractiu del present treball.

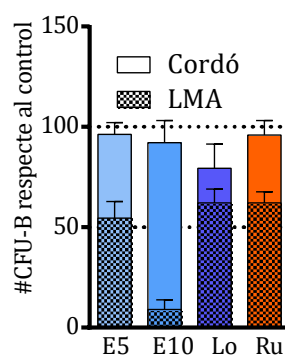
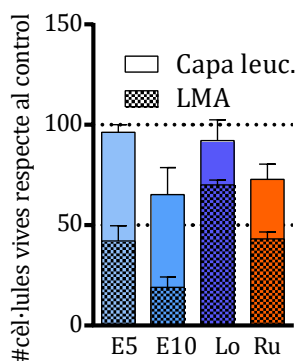
A Capa leucocitària



B Sang cordó umbilical



C Efecte diferencial



% reducció viabilitat

	LMA	CL	FC
E5	63,1	3,9	16,2
E10	83,4	34,8	2,4
L20	33,8	8,0	4,2
R20	57,7	27,1	2,1

% reducció CFU

	LMA	CL	FC
E5	45,3	3,7	12,2
E10	90,9	7,8	11,7
L20	37,8	20,6	1,8
R20	37,7	4,1	9,2

Figura 29. Els ANHA afecten menys les cèl·lules hematopoètiques sanes que les leucèmiques. **A.** Es van tractar cèl·lules mononucleades de capes leucocitàries provinents de 5 donants sans amb loratadina 20 μM (blau fosc), rupatadina 20 μM (taronja), ebastina 10 μM (blau clar) o terfenadina 5 μM (verd) i se'n van analitzar els efectes als dies 3 (esquerra) o 6 (dreta) sobre la població total i sobre la població mieloide (CD13+), limfoide B (CD19+) i limfoide T (CD3+). Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats de les 5 capes. **B.** Cèl·lules lin⁻ aïllades de sang de cordó umbilical de 3 individus sans es van tractar 18h en les mateixes condicions que l'apartat anterior i es van cultivar 15 dies en medi semisòlid *Methocult*. Es va analitzar el número total de colònies hematopoètiques formades (esquerra) i la proporció dels diferents subtipus (dreta). Les barres mostren la mitjana \pm SEM de duplicats de les 3 mostres. **C.** Es van comparar els efectes *ex vivo* dels ANHA en cèl·lules hematopoètiques sanes i de LMA en termes de viabilitat (esquerra) i clonogenicitat (dreta). Les dades representen la reducció de viabilitat i clonogenicitat de tractaments amb ebastina 5 i 10 μM (E5, E10), loratadina 20 μM (Lo) i rupatadina 20 μM (Ru). Les barres mostren les mitjanes+SEM sobreimposades de dades de la Figura 28 i Figura 29. Les taules mostren el percentatge mitjà de reducció de la viabilitat o formació de CFUs en LMA, capes leucocitàries (CL) o cordó umbilical (CU), així com el seu *Fold change* (FC; efecte en LMA/efecte en mostres sanes). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ en tests de Mann-Whitney.

4.3.3. Estudis *in vivo*

Per avaluar la seva rellevància terapèutica i com a darrera etapa de validació preclínica, es va procedir a estudiar l'efecte en models animals dels dos candidats més atractius, ebastina i rupatadina. Per a la consecució d'aquest objectiu es va treballar amb models de xenotrasplantament de cèl·lules humanes en ratolins immunodeficients NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) condicionats amb busulfan per a l'acceptació de l'empelt.

Primerament, es van realitzar experiments amb les línies cel·lulars KG-1 i MonoMac-1, injectant les cèl·lules als ratolins i deixant set dies per a l'establiment de la leucèmia. Passat aquest temps, es van realitzar tractaments en dies alterns durant 14 dies amb ebastina (8 mg/kg) i rupatadina (8 mg/kg). Les concentracions escollides van ser les màximes permeses per la solubilitat dels fàrmacs, ateses les altíssimes dosis tolerades recollides a les fitxes de seguretat de la direcció europea de qualitat del medicament i l'assistència sanitària (EDQM). Com mostra la Figura 30, els fàrmacs van tenir una eficàcia limitada en KG-1 i pràcticament cap efecte en MonoMac-1 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 antileucèmics i de l'altra la seva baixa solubilitat, que impedeix augmentar la concentració administrada. Aquests motius, que probablement suposarien un impediment per a l'efectivitat dels fàrmacs en pacients, sumats a d'altres criteris, va fer replantejar l'estratègia de reposicionament de fàrmacs. Aquesta es va substituir per una estratègia d'optimització dels *hits* seleccionats per obtenir fàrmacs més atractius amb millors característiques farmacològiques i antileucèmiques i més possibilitat de ser eventualment traslladats a la clínica. Abans de dur a terme aquesta optimització, que es tractarà en apartats posteriors, es van realitzar més experiments amb els ANHA amb l'objectiu d'efectuar-ne una validació més profunda i determinar-ne aspectes claus de cara al refinament dels *hits*.

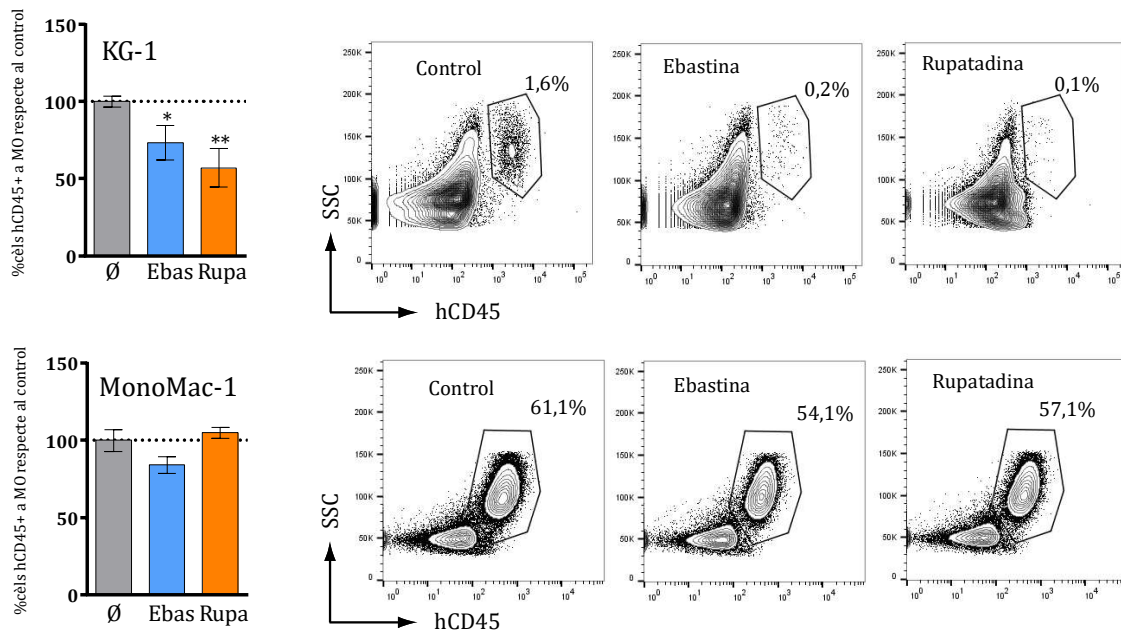


Figura 30. Ebastina i rupatadina no són efectius en experiments *in vivo* amb línies cel·lulars de LMA. Es van injectar per via intravenosa cèl·lules KG-1 (n=12) o MonoMac-1 (n=18) a ratolins NSG condicionats i es van deixar empeltar durant una setmana. Al cap d'aquest temps es van tractar els ratolins intraperitonealment amb ebastina, rupatadina o vehicle a dies alterns durant dues setmanes, després de les quals es va analitzar l'empelt a medul·la òssia (MO). Es representa la freqüència de cèl·lules humanes respecte al control \pm SEM. A la dreta es mostren gràfics de citometria representatius de cada grup. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ en t-tests.

Prosseguint els estudis *in vivo*, es van tractar mostres de tres pacients de LMA provinents de leucoafèresis terapèutiques 18 h amb els fàrmacs d'interès i es van injectar en ratolins, on es va establir la leucèmia durant 8 setmanes. En aquest cas, ebastina va abolir de manera quasi completa la regeneració de la malaltia, mentre que rupatadina en va reduir l'empelt a la meitat i loratadina no va tenir cap efecte (Figura 31A), en línia amb resultats anteriors. Aquests resultats suggereixen l'efecte d'ebastina i rupatadina sobre la població de cèl·lules mare leucèmiques, definides precisament per la capacitat de regenerar la malaltia en ratolins condicionats.

Per comprovar si aquest efecte era específic de cèl·lules leucèmiques, es va repetir el mateix procediment amb cèl·lules lin- de sang de tres cordons umbilicals (enriquides amb HSCs), observant-se una reducció d'aproximadament el 25% d'empelt amb el tractament amb ebastina i un increment amb el tractament amb rupatadina, consistent en tots tres cordons i per al qual encara no es té explicació (Figura 31B). Quant a les subpoblacions de les cèl·lules empeltades, es va mantenir aproximadament la mateixa composició, amb una lleugera disminució del percentatge de cèl·lules CD19+ en el tractament amb ebastina (Figura 31C).

Per analitzar la capacitat regeneradora residual de les cèl·lules empeltades i comprovar l'efecte a llarg termini sobre les cèl·lules mare es solen realitzar trasplantaments secundaris en ratolins. En aquest cas, però, el baix número de cèl·lules de LMA tractades amb ebastina empeltades va impedir la realització de l'estudi, que només es va poder realitzar amb les cèl·lules de cordó umbilical. Com mostra la Figura 31D, l'efecte d'ebastina en el trasplantament primari no es va mantenir al secundari, que va mostrar un grau similar d'empelt respecte al control, i el major empelt amb rupatadina es va mantenir. En base a totes aquestes dades, es va realitzar una comparativa anàlega a l'anteriorment realitzada als estudis *ex vivo*, determinant que ebastina afecta 3,5 vegades més l'empelt de cèl·lules de LMA que el de cèl·lules sanes (Figura 31E).

En definitiva, en experiments *in vivo* s'ha observat que ebastina i rupatadina afecten greument el compartiment de cèl·lules mare leucèmiques, mentre que majoritàriament preserven la funcionalitat de les cèl·lules mare hematopoètiques sanes.

4.3.4. Estudis preclínic en altres neoplàsies hematològiques

En vista de l'expressió de HRH1 en línies cel·lulars de diverses neoplàsies hematològiques i dels efectes anti-LMA dels ANHA, es va decidir ampliar l'estudi citotòxic a d'altres patologies similars incloent la LMC, la LLA-T, el LCM, la LCP, el limfoma de Burkitt i el mieloma múltiple. Així, es van tractar amb diversos antihistamínics un ampli ventall de línies cel·lulars i se'n va analitzar la viabilitat a les 72h. Com mostra la Figura 32A, ebastina va eliminar més de la meitat de les cèl·lules en totes les línies estudiades, mentre que loratadina i rupatadina van mostrar més diferències. Analitzant aquesta diversitat de resposta a la llum dels llinatges hematopoètics als quals pertanyen les línies es va observar una tendència a la menor sensibilitat de les cèl·lules limfoides, però també una gran diversitat dins de cada llinatge (Figura 32B). A banda dels ANHA, es van realitzar experiments amb antihistamínics no-ANHA; els efectes de tots ells es van recollir en un *heatmap* (Figura 32C). En aquest, s'observa el patró d'efectes citotòxics que s'ha evidenciat prèviament en LMA; els ANHA tenen efectes citotòxics en pràcticament totes les línies estudiades, mentre que clemastina, ciproheptadina i ketotifèn mostren efectes més lleus, o no en totes les línies o a concentracions més altes i acrivastina, cetirizina i fexofenadina no mostren efectes rellevants. L'establiment d'aquests tres grups resultarà important més endavant a l'hora d'escatir-ne el mecanisme d'acció.

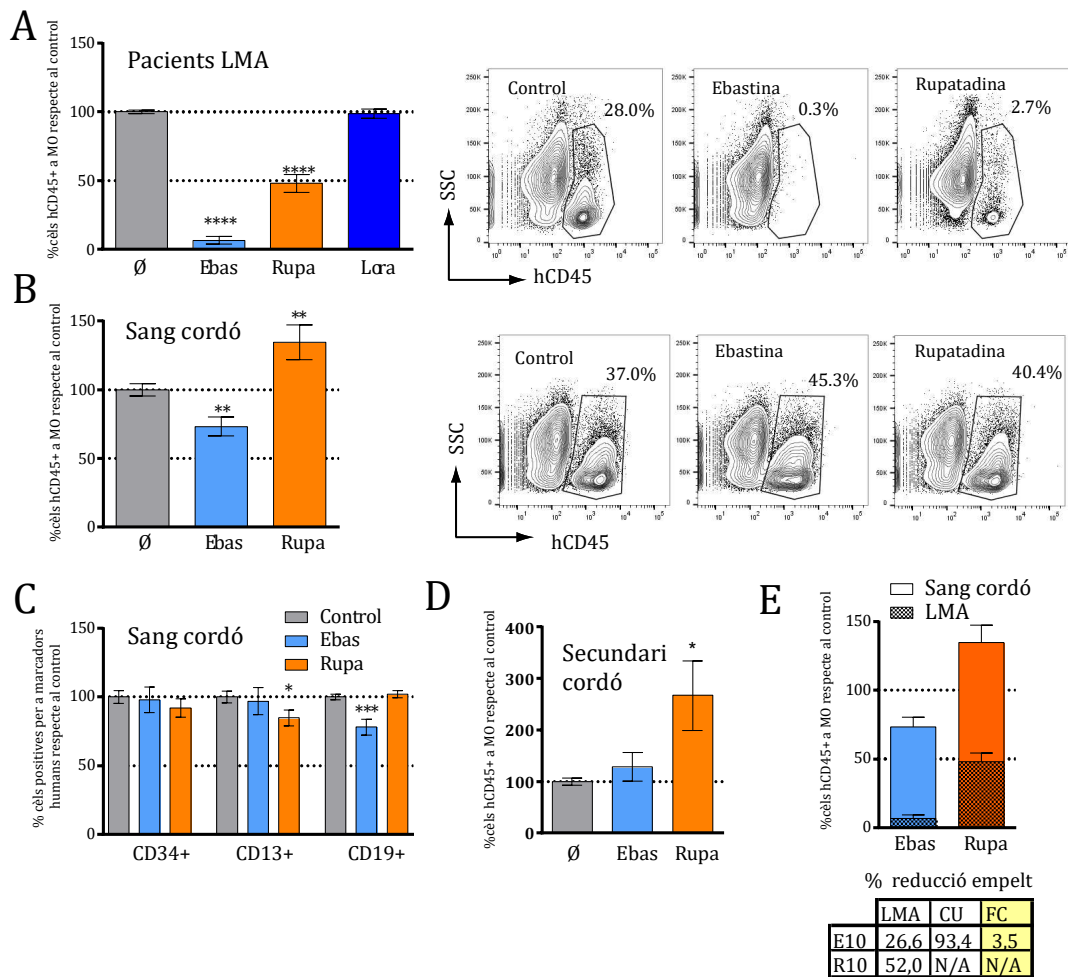


Figura 31. Els ANHA eliminen selectivament cèl·lules de LMA *in vivo* amb mostres de pacients. **A.** Es van trasplantar per via intravenosa a ratolins NSG condicionats (n=25) mostres de pacients de LMA amb alta puresa de blasts (LMA#2, LMA#3 i LMA#11) prèviament tractats 18h amb ebastina 10 μ M (Ebas), rupatadina 10 μ M (Rupa) o loratadina 10 μ M (Lora). Després de 8 setmanes, el grau d'empelt es va analitzar a la medul·la òssia (MO). Es representa la freqüència de blasts de LMA humans respecte al control \pm SEM de les tres mostres. A la dreta es mostren gràfics de citometria representatius de cada grup en l'experiment realitzat amb la mostra LMA#3. **B.** Es van trasplantar per via intravenosa a ratolins NSG condicionats (n=36) cèl·lules lin- provinents de sang de tres cordons umbilicals prèviament tractats 18h amb ebastina 10 μ M (Ebas), rupatadina 10 μ M (Rupa) o loratadina 10 μ M (Lora). Després de 8 setmanes, el grau d'empelt es va analitzar a la medul·la òssia (MO). Es representa la mitjana de la freqüència de cèl·lules humanes a MO respecte al control \pm SEM. A la dreta es mostren gràfics de citometria representatius de cada grup **C.** Les cèl·lules empeltades a (B) es van analitzar en funció de la presència dels marcadors CD34, CD13 i CD19 per determinar els canvis en la freqüència de progenitors hematopoètics, cèl·lules mieloides i cèl·lules limfoides respectivament. Les barres mostren la mitjana del percentatge de cada població respecte al control \pm SEM. **D.** Les cèl·lules humanes recuperades de B es van injectar en ratolins receptors secundaris i es va analitzar l'empeltament de manera anàloga a (B). **E.** Es van comparar els efectes *in vivo* dels ANHA en cèl·lules hematopoètiques sanes i de LMA en termes de grau d'empelt. Les dades representen l'empelt després del tractament amb ebastina 10 μ M (Ebas) o rupatadina 10 μ M (Rupa). Les barres mostren les mitjanes+SEM sobrepesades de dades de (A) i (B). Les taules mostren el percentatge mitjà de reducció del grau d'empelt en LMA o cordó umbilical (CU), així com el seu *Fold change* (FC; efecte en LMA/efecte en mostres sanes). *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001 (t-tests).

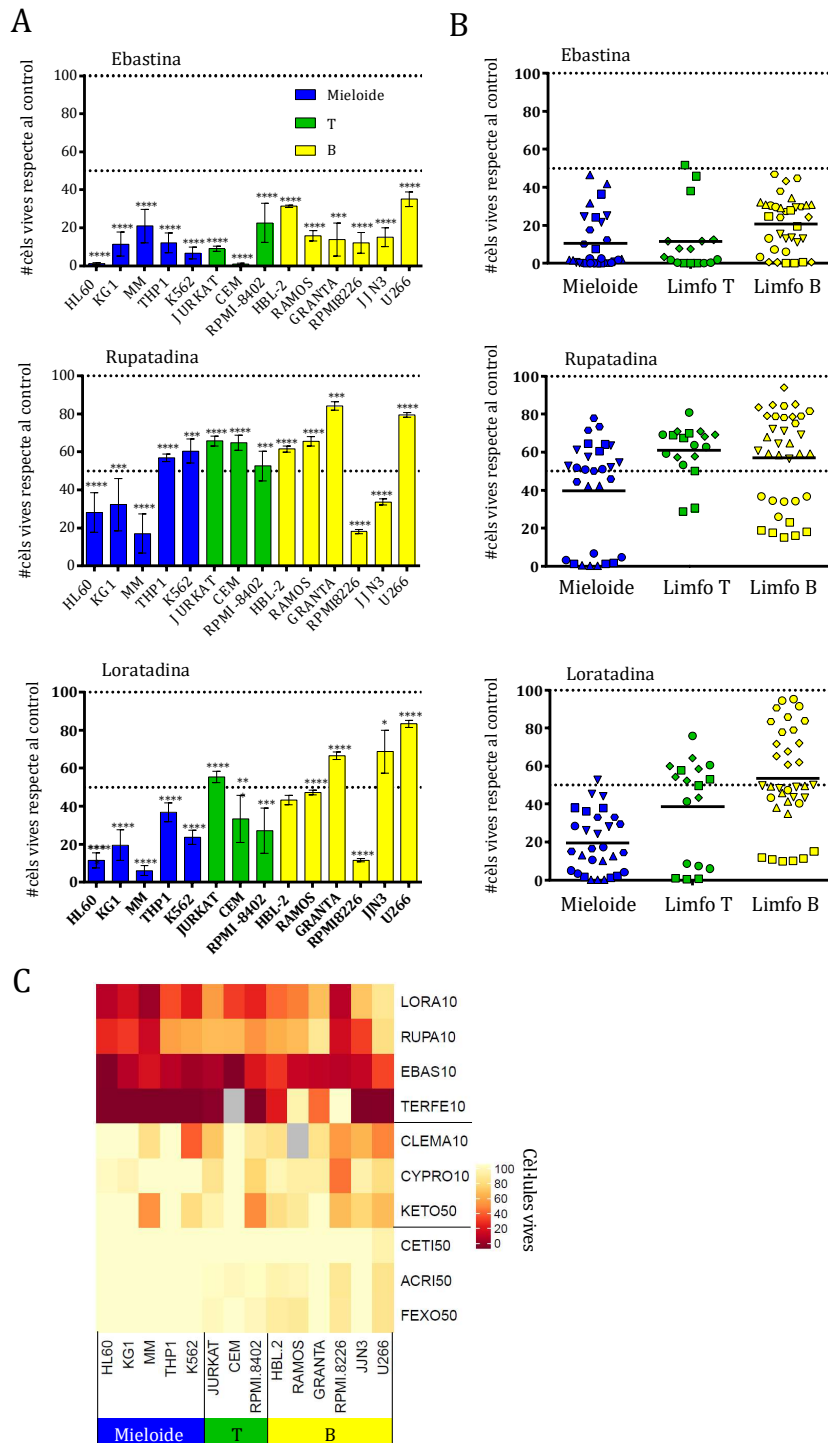


Figura 32. Els ANHA mostren efectes citotòxics en línies cel·lulars de diverses neoplàsies hematològiques. A. Es van tractar cèl·lules de les línies indicades amb ebastina, rupatadina o loratadina a 10 μ M i se'n va analitzar la viabilitat a les 72h. Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. **B.** Agrupació dels resultats de (A) segons el llinatge de cada línia cel·lular. Cada símbol representa una línia cel·lular i cada punt una mesura experimental. **C.** *Heatmap* que representa dades de viabilitat d'(A) incloent també tractament amb terfenadina 10 μ M (terfe10), clemastina 10 μ M (Clema10), ciproheptadina 10 μ M (cypro10), ketotifèn 50 μ M (keto50), cetirizina 50 μ M (ceti50), acrivastina 50 μ M (acri50) i fexofenadina 50 μ M (fexo50). Colors més foscos representen efectes citotòxics més grans, el gris representa punts sense dades. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001 (t-tests).

Un cop demostrat l'efecte en línies cel·lulars, es van realitzar experiments *ex vivo* amb mostres primàries disponibles al grup de recerca (dues de LMMC i una de LLA-T), observant-se en tots dos casos uns efectes similars als observats en LMA tant en termes d'efectes citotòxics sobre els blasts com en termes de la disminució de la clonogenicitat en LMMC (Figura 33A i B) i suggerint que els efectes dels ANHA podrien extrapolar-se a d'altres neoplàsies. Cal no oblidar, però, el baix nombre de mostres i línies estudiades, que permeten sols un anàlisi preliminar.

Disposant de tantes dades referents a la citotoxicitat dels ANHA en molts tipus cel·lulars diferents, es va voler realitzar un anàlisi global comparant els efectes en poblacions de capes leucocitàries (mieloide, T i B) amb els de tot el conjunt de línies neoplàsiques estudiades (Figura 33C). Si bé probablement no es tracti d'una comparació del tot adient, es va corroborar amb les dades disponibles l'efecte específicament antineoplàsic dels ANHA, amb efectes entre 1,9 i 6,6 vegades més potents en cèl·lules neoplàsiques i reforçant la denominació ANHA.

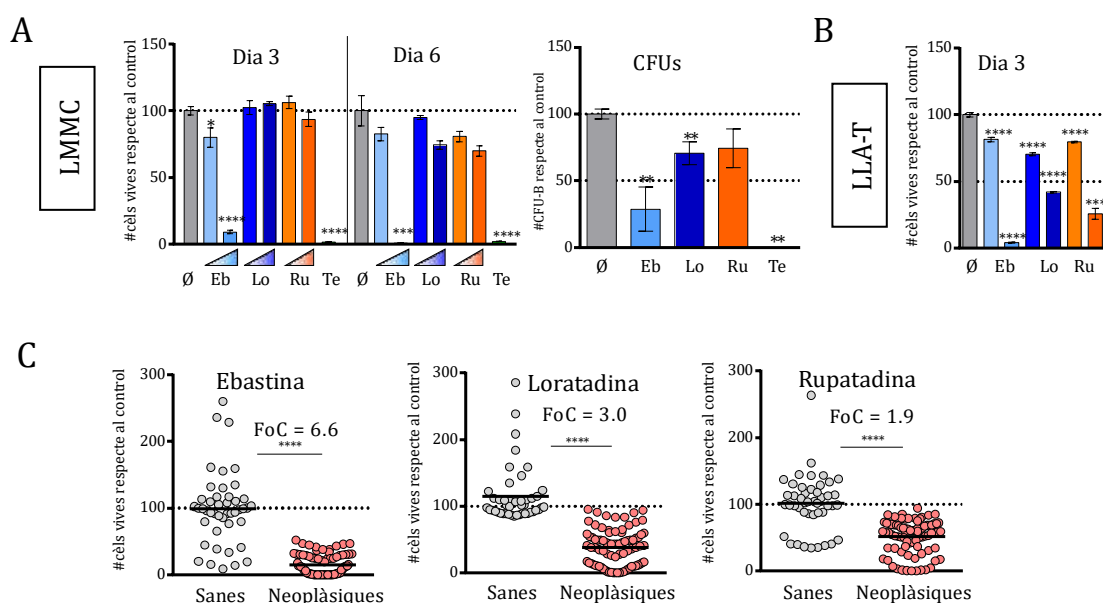


Figura 33. Els ANHA mostren efectes citotòxics en mostres primàries de LMMC i LLA-T. **A.** Dues mostres de LMMC es van tractar amb ebastina 5 i 10 μM (Eb), loratadina 10 i 20 μM (Lo), rupatadina 10 i 20 μM (Ru) i terfenadina 5 μM (Te) i se'n va analitzar la viabilitat dels blasts a 72h (esquerra). A la dreta es mostra l'efecte sobre la clonogenicitat tractant amb ebastina 10 μM , loratadina 20 μM , rupatadina 20 μM i terfenadina 5 μM . Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats en el cas de la viabilitat i duplicats en el cas de la clonogenicitat **B.** Una mostra de LLA-T es va tractar en les mateixes condicions que (A). Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. **C.** Es van agrupar dades de viabilitat de cèl·lules tractades amb ebastina 10 μM , loratadina 10 μM i rupatadina 10 μM segons fossin mostres sanes (diferents poblacions de capes leucocitàries) o neoplàsiques (línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques estudiades). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (tests Mann-Whitney). FoC: *Fold of Change*

4.4. Estudi dels mecanismes d'acció dels antihistamínics associats a la seva acció antileucèmica.

Un cop efectuats els estudis preclínics amb els ANHA, es va abordar el darrer objectiu de la tesi: la caracterització del seu mecanisme d'acció. Si bé la diana descrita per a l'acció antihistamínica dels ANHA és el receptor HRH1, no era obvi que també hagués de ser-ho per als efectes antileucèmics, i es van sondejar diverses dianes.

4.4.1. Cerca de dianes candidates

Al llarg del present treball es van cercar dianes candidates per a l'acció antileucèmica dels ANHA a banda de HRH1 amb diferents estratègies. D'una banda, mitjançant la cerca a la literatura, on es troben descrites dianes dels antihistamínics alternatives a HRH1 responsables en ocasions dels seus efectes secundaris. A través d'aquesta via es van identificar com a candidats els receptors muscarínics d'acetilcolina (Orzechowski, Currie et al. 2005) o la subunitat de canals de potassi K_v11.1 (Ko, Ducic et al. 1997). Estudis publicats en altres neoplàsies han identificat, així mateix, l'acumulació en lisosomes com a responsable d'efectes antitumorals d'alguns antihistamínics (Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016). D'altra banda, es va emprar l'eina SwissTargetPrediction de l'institut suís de bioinformàtica (www.swisstargetprediction.ch), que permet la predicció de dianes de molècules petites en base a similuds 2D i 3D amb un gran llibreria de compostos amb activitat coneguda (Gfeller, Michielin et al. 2013). Aplicant aquesta eina als quatre ANHA, es va observar la presència entre les dianes candidates amb puntuacions més altes de receptors muscarínics, que s'havien identificat prèviament mitjançant cerca a la literatura, receptors de serotonina, que es van afegir a la llista de candidats, i receptors adrenèrgics, que dades anteriors del laboratori suggereixen que no constitueixen una diana en LMA. Per últim, es va establir una col·laboració amb l'empresa *Chemotargets* per a la identificació de dianes i el disseny de noves molècules. Un exhaustiu estudi bioinformàtic comparant els antihistamínics ANHA i no-ANHA va predir una afinitat per al receptor de serotonina HTR1A significativament superior als no-ANHA. Aquest fet, sumat a estudis anteriors del laboratori referents al receptor HTR1A (Etxabe, Lara-Castillo et al. 2017), va reforçar els receptors de serotonina com a possible diana. Totes aquestes dianes identificades van ser estudiades, com es desgrana en els següents apartats.

4.4.2. Mecanisme dependent del receptor d'histamina 1

El primer pas lògic va ser l'estudi de HRH1, en ser la diana descrita per a l'ús antial·lèrgic i haver observat prèviament l'expressió del receptor en neoplàsies hematològiques. Es partia, però, d'observacions paradoxals; d'una banda, dels 10 antihistamínics testats,

només quatre posseïen activitat antileucèmica potent, de l'altra, s'havien observat efectes citotòxics en línies que no expressen el receptor. Per analitzar aquestes observacions en més profunditat, es van estudiar les possibles correlacions entre l'expressió del receptor i l'acció dels ANHA (Figura 34A), observant-se correlacions febles en loratadina i rupatadina, però constatant l'alta citotoxicitat en línies amb expressió nul·la de HRH1.

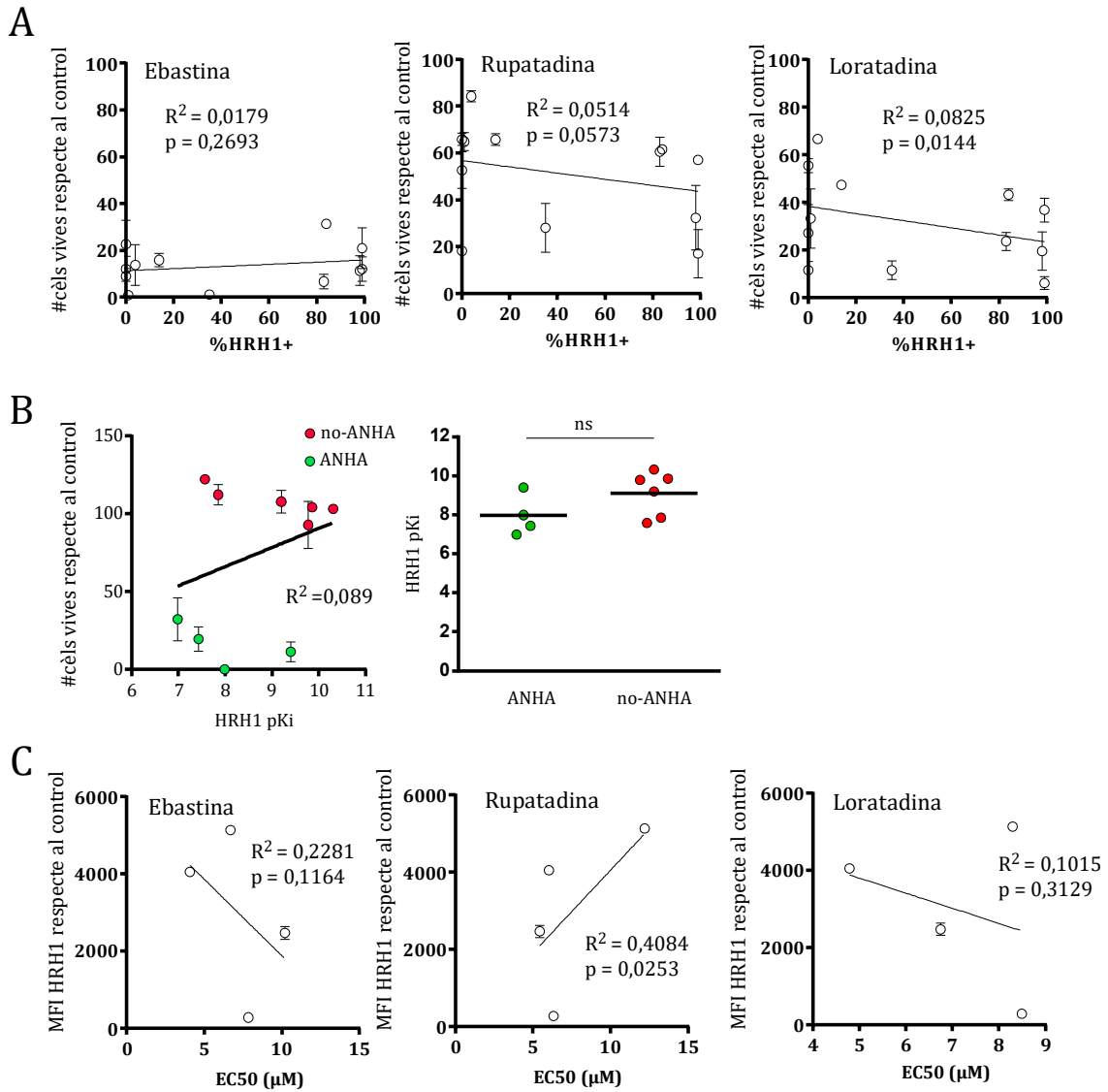


Figura 34. L'efecte dels antihistamínics no es correlaciona amb HRH1. A. Es va representar l'efecte citotòxic d'ebastina, rupatadina i loratadina 10 μM (eix Y) en diverses línies cel·lulars en relació al percentatge d'expressió de HRH1 en cada línia (eix X) i se'n van calcular R^2 i p. **B.** Al panell esquerre es va representar l'efecte citotòxic de tots els antihistamínics estudiats (eix Y) en relació a l'afinitat per HRH1 en termes de pKi (eix X) i se'n va calcular R^2 . Al panell dret es representen els valors de pKi dels antihistamínics ANHA i no-ANHA. **C.** Es va representar la mitjana de fluorescència (MFI) de HRH1 en 4 línies cel·lulars de LMA (eix Y) en relació a la EC_{50} d'ebastina, rupatadina i loratadina (eix X) i se'n van calcular R^2 i p. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (t-tests).

Quan es van intentar correlacionar els efectes de tots els antihistamínics testats amb la seva afinitat per HRH1 (dades extretes de www.guidetopharmacology.org) (Harding, Sharman et al. 2018) es va observar que els efectes citotòxics eren independents de l'afinitat i com, de mitjana, els no-ANHA tenen més activitat pel receptor que els ANHA (Figura 34B). A més a més, es va representar la EC₅₀ dels ANHA en línies cel·lulars de LMA en funció del nivell d'expressió de HRH1 (mesurat per la mitjana d'intensitat per citometria de flux), i es va constatar la manca de relació (Figura 34C). Tot plegat suggereix que l'acció sobre HRH1 no explica els efectes diferents dels antihistamínics ni l'acció antileucèmica dels ANHA.

Per aconseguir una confirmació més funcional de la independència de HRH1, es van tractar línies cel·lulars de LMA amb els ANHA en presència o absència d'altres concentracions d'histamina. Com mostra la Figura 35, amb alguna excepció no es va produir cap reversió de l'efecte tractant amb histamina, com seria esperable si els antihistamínics actuessin a través de HRH1, descartant definitivament aquesta diana.

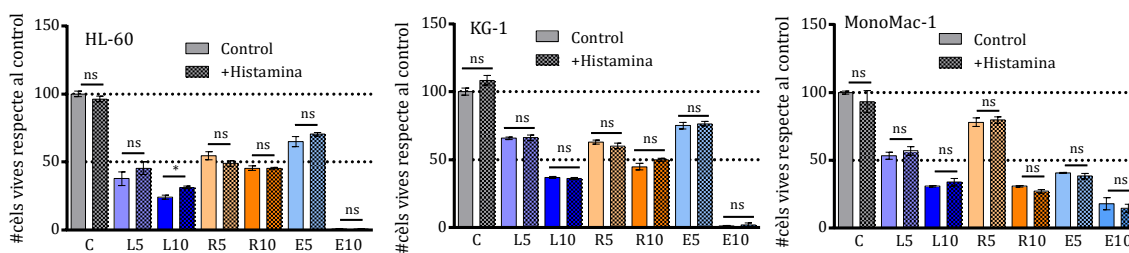


Figura 35. La histamina no reverteix la citotoxicitat dels ANHA. Cèl·lules HL-60, KG-1 i MonoMac-1 es van tractar 48h amb control de vehicle (C), loratadina 5 i 10 μ M (L5, L10), rupatadina 5 i 10 μ M (R5, R10), ebastina 5 i 10 μ M (E5, E10) en presència o absència d'histamina 200 μ M. Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu dels tres realitzats. * $p < 0.05$ (t-test)

4.4.3. Mecanisme dependent de receptors de serotonina

Descartada la diana més clàssica dels antihistamínics, es va analitzar la possible mediació dels receptors de serotonina en l'acció antileucèmica dels ANHA fent èmfasi en HTR1A. Atès que al grup de recerca on s'ha realitzat aquest treball s'ha estudiat extensament l'expressió de receptors de serotonina en neoplàsies hematològiques, es van relacionar les dades d'expressió de HTR1A en línies cel·lulars prèviament obtingudes (en col·laboració amb la Dra. Amaia Etxabe i Antònia Banús-Mulet) amb dades de toxicitat en aquestes línies d'ebastina, rupatadina i loratadina. Els resultats van ser molt semblants als obtinguts per a HRH1 amb una certa tendència en loratadina i rupatadina a resultar més citotòxics en línies amb alta expressió però cap correlació destacada (Figura 36A). Més important

encara, línies sense expressió de HTR1A en superfície detectable eren sensibles als tractaments.

Prèviament a aquest treball s'havia descrit l'expressió de HTR1A en línies de LMA però uns efectes modestos d'antagonistes del receptor (Etxabe, Lara-Castillo et al. 2017). Per estudiar més a fons la diana es va optar per combinar ebastina amb antagonistes neutres de HTR1A (NAN190 i UH301), que bloquegen el receptor però no indueixen senyalització i que sabem que no tenen efectes citotòxics importants en línies de LMA. El bloqueig de receptors amb altes concentracions d'antagonistes neutres altament específics haurien d'impedir en part els efectes d'ebastina si aquesta produís els seus efectes antileucèmics a través de HTR1A. Aquesta reversió de l'efecte, però, no es va produir (Figura 36B) fent improbable que HTR1A sigui la diana dels ANHA, malgrat aquests hi tinguin més afinitat predita que els no-ANHA.

Atès que altres subtipus de receptors de serotonina havien aparegut en prediccions bioinformàtiques com a dianes dels ANHA, es van realitzar experiments de reversió en línies de LMA amb l'agonista natural de tots els receptors de serotonina (serotonina, 5HT) i un agonista dels HTR1 (5-carboxamidotriptamina, 5CT). Es van realitzar corbes dosi-resposta d'ebastina en presència o absència d'aquests agonistes, sense observar-se cap diferència (Figura 36C), suggerint la poca rellevància dels receptors de serotonina en aquest context i duent-nos a abandonar el seu estudi.

4.4.4. Mecanisme dependent de canals de potassi

El bloqueig de canals de potassi, i particularment de la subunitat $K_v11.1$, s'ha relacionat amb els efectes cardiotòxics de la terfenadina, i s'ha descrit en menor mesura per a ebastina (Ko, Ducic et al. 1997). A més, se n'ha descrit la sobreexpressió en LMA (Pillozzi, Brizzi et al. 2002). Per sondejar si els efectes dels ANHA es podien produir a través del bloqueig d'aquest canal, es van testar en línies cel·lulars de LMA els bloquejadors de $K_v11.1$ dofetilida i lumefantrina a altres concentracions, sense observar-se efectes citotòxics consistents (Figura 37) i indicant que probablement no es tracti de la diana antileucèmica dels ANHA.

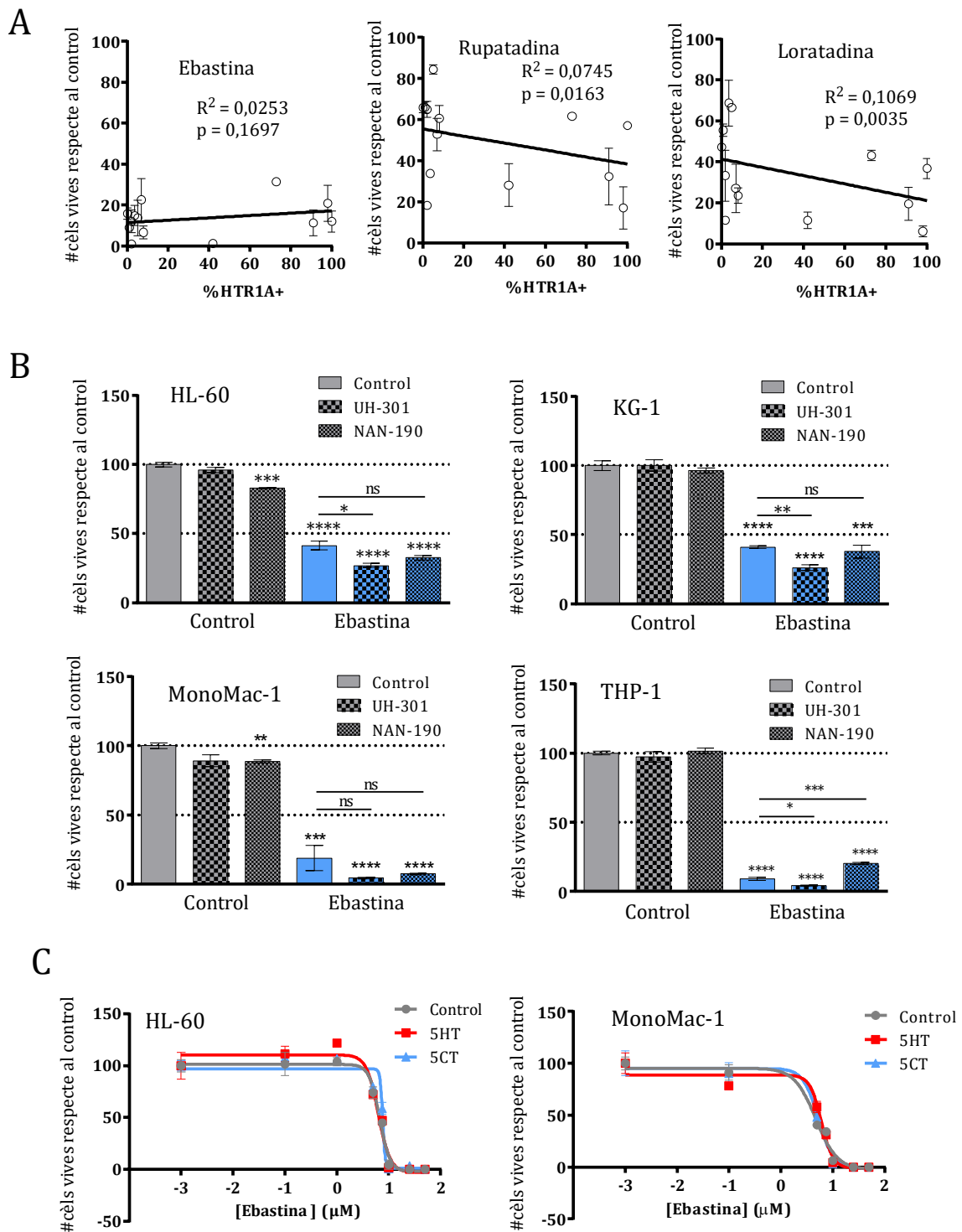


Figura 36. L'efecte dels ANHA no està relacionat amb HTR1A. A. Es va representar l'efecte citotòxic d'ebastina, rupatadina i loratadina 10 μM (eix Y) en diverses línies cel·lulars en relació al percentatge d'expressió de HTR1A en cada línia (eix X) i se'n van calcular R^2 i p. **B.** Es van tractar cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 o THP-1 amb UH-301 50 μM , NAN-190 10 μM , ebastina 10 μM , o combinacions d'aquests i es va analitzar el nombre de cèl·lules vives a les 48h. Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu d'entre tres realitzats **C.** Corbes de dosi-citotoxicitat d'ebastina a 48h en cèl·lules HL-60 o MonoMac-1 en presència o absència de 5HT o 5CT 10 μM . * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (t-tests).

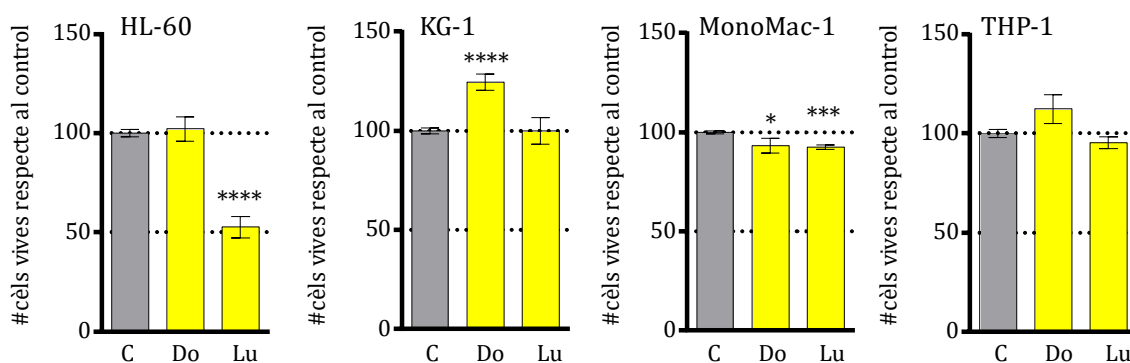


Figura 37. Inhibidors de hERG no tenen efectes citotòxics consistents en línies cel·lulars de LMA. Es van tractar cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 amb control de vehicle (C), dofetilida 50 μ M (Do) o lumefantrina 50 μ M (Lu), i se'n va analitzar la viabilitat a les 72h. Les barres representen la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (t-tests).

4.4.5. Mecanisme dependent de receptors muscarínics d'acetilcolina

La cerca de candidats a diana havia identificat els receptors muscarínics d'acetilcolina (CHRM), i com a primer pas per al seu estudi es va estudiar l'efecte de l'addició del lligand endogen de tots ells (acetilcolina) sobre l'acció antileucèmica dels ANHA en línies de LMA. L'acetilcolina a concentracions molt per sobre de la seva afinitat pels receptors va ser capaç de produir una reversió en alguns casos, si bé lleugera i inconsistent (Figura 38A). Per estudiar més a fons aquesta diana, es van emprar antagonistes específics de diversos receptors muscarínics: metoctramina (antagonista de CHRM2), pirenzepina (antagonista de CHRM1) i biperidèn i ipratropi (antagonistes pan-CHRM). Si l'acció antileucèmica dels ANHA es produís a través d'algun CHRM, esperaríem que antagonistes específics a altes concentracions induïssin efectes citotòxics com a mínim similars als ANHA. Contràriament, només biperidèn i ipratropi a 50 μ M van tenir algun efecte en MonoMac-1 i THP-1 (Figura 38B), efecte del tot diferent dels ANHA. Si bé es tracta de resultats ambigus que no permeten descartar categòricament la diana, no sembla probable que es tracti del mediador principal de l'acció antileucèmica dels ANHA, motiu pel qual es va interrompre la recerca amb aquests receptors.

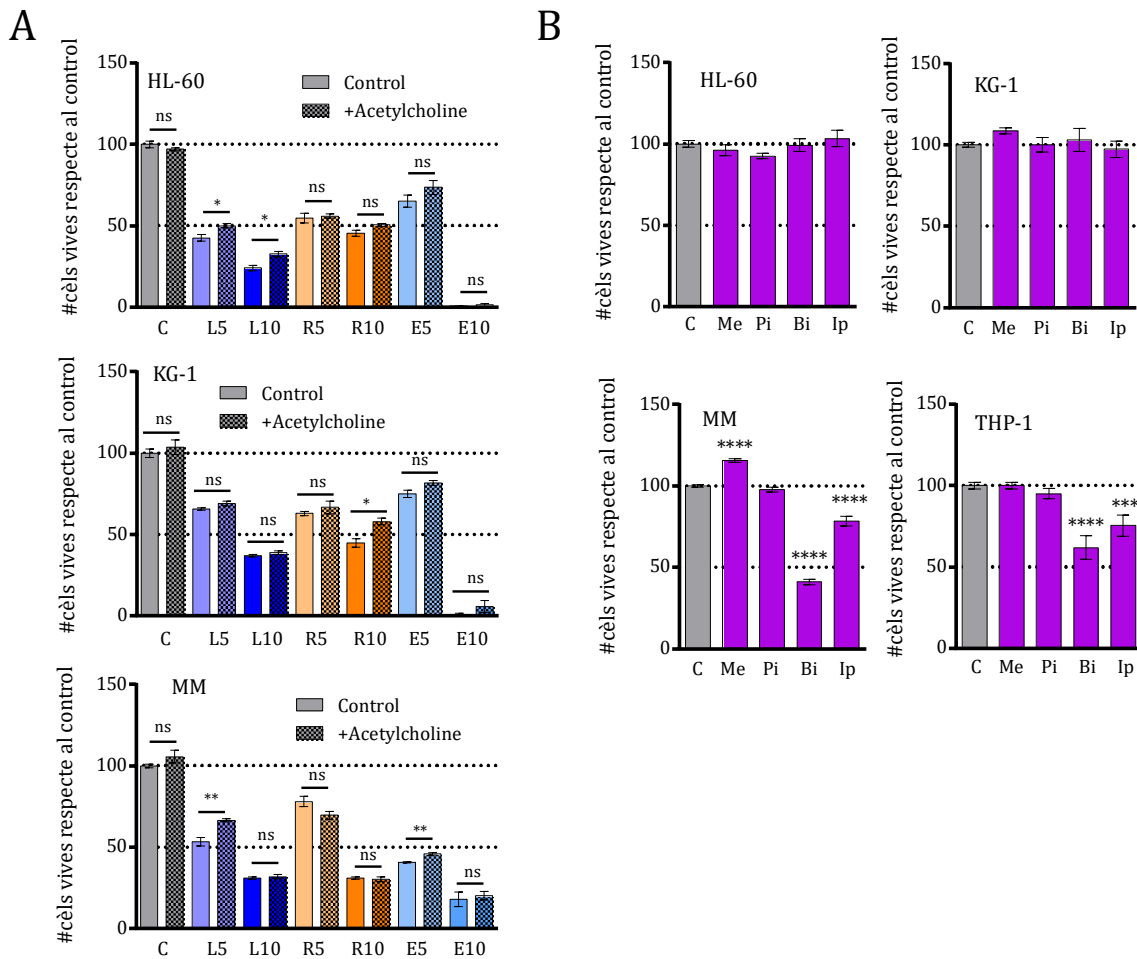


Figura 38. L'acetilcolina no reverteix la citotoxicitat dels ANHA. **A.** Cèl·lules HL-60, KG-1 i MonoMac-1 es van tractar 48h amb control de vehicle (C), loratadina 5 i 10 μ M (L5, L10), rupatadina 5 i 10 μ M (R5, R10), ebastina 5 i 10 μ M (E5, E10) en presència o absència d'acetilcolina 100 μ M. Les barres mostren la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu dels tres realitzats. **B.** Es van tractar cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 amb control de vehicle (C), metoctramina 50 μ M (Me), pirenzepina 50 μ M (Pi), biperidèn 50 μ M (Bi) o ipratropi 50 μ M (Ip) i se'n va analitzar la viabilitat a les 72h. 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-tests).

4.4.6. Efectes dels antihistamínics sobre el compartiment lisosomal i autofàgic

Després d'aquest peregrinatge a través de proteïnes amb funcions diverses, cap de les quals havia resultat ser una diana antileucèmica versemblant per als nostres fàrmacs, es va investigar la possible implicació del compartiment lisosomal. Recentment s'havia descrit el paper dels lisosomes com a mediadors dels efectes neoplàsics induïts en càncer de pulmó per antihistamínics com ebastina i terfenadina (Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016). A més, l'afectació d'aquest compartiment cel·lular pot induir la mort cel·lular en cèl·lules de LMA (Sukhai, Prabha et al. 2013). Aquest mecanisme també explicaria l'acció diferencial dels diferents antihistamínics, en estar relacionat amb propietats fisicoquímiques dels fàrmacs independents de l'acció antihistamínica, com es discutirà en

apartats posteriors. A grans trets, s'ha descrit la tendència dels fàrmacs catiònics amfifílics (CAD) d'acumular-se als lisosomes per atrapament iònic, i els ANHA, a diferències dels no-ANHA, compleixen les característiques que defineixen els CADs (Kodavanti i Mehendale 1990).

Per analitzar els possibles canvis sobre els lisosomes, es va fer ús de la sonda *LysoTracker Deep Red* (Invitrogen), una tinció fluorescent específica d'òrgans àcids (lisosomes i endosomes tardans). Les afectacions lisosomals es poden manifestar tant amb increments com amb disminucions de la fluorescència, segons l'efecte i el disseny experimental. En aquest cas, el tractament de línies cel·lulars de LMA amb ANHAs i la seva posterior tinció i anàlisi per citometria de flux va comportar un augment general en la fluorescència de *LysoTracker* en totes les línies, tant a 24 com a 48h (Figura 39). Terfenadina i ciproheptadina (un antihistamínic amb efectes antileucèmics a concentracions més altes) van tenir efectes menys consistents, si bé significatius en algunes de les condicions. Cloroquina, un antimalàric lisosomòtrop, va ser estudiat en tant que control positiu i, com era esperable va induir un augment de la fluorescència en tots els casos. Tractant-se d'un agent lisosomòtrop àmpliament estudiat i potent resulta remarcable que en algunes línies els ANHAs induïssin augments superiors. Tots aquests resultats suposen una primera prova de l'efecte sobre els lisosomes dels ANHAs en LMA.

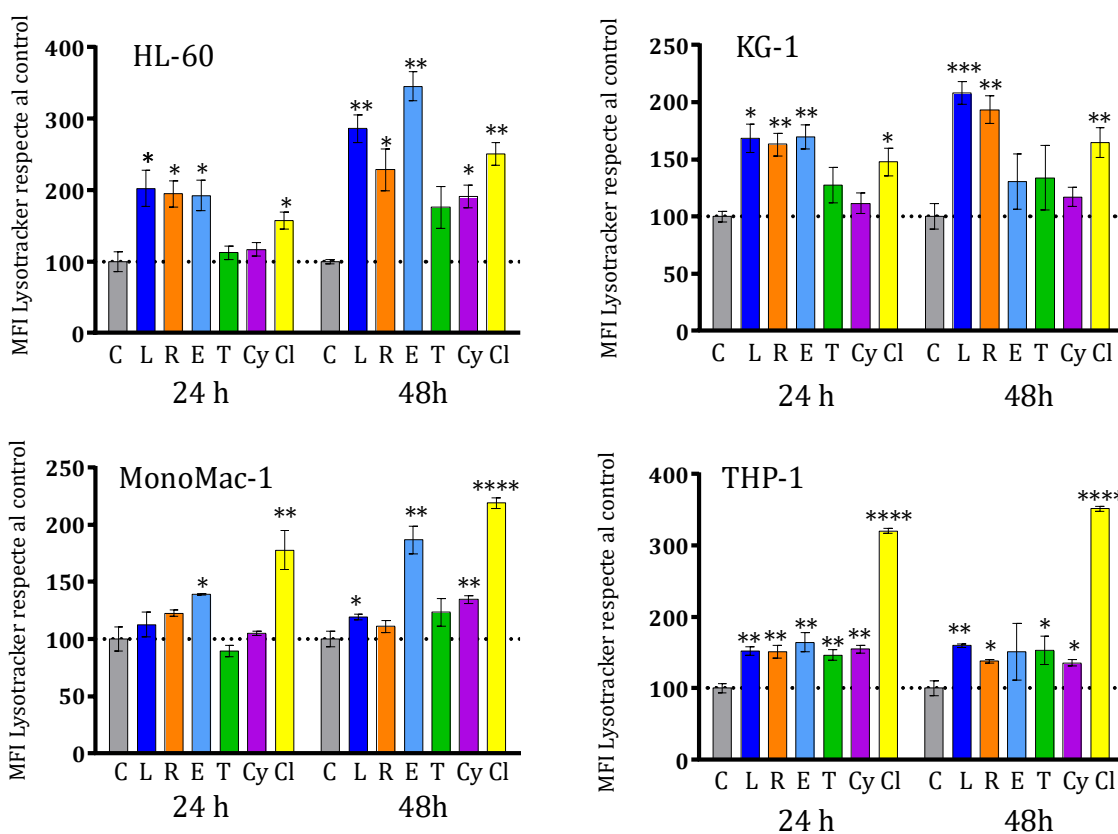
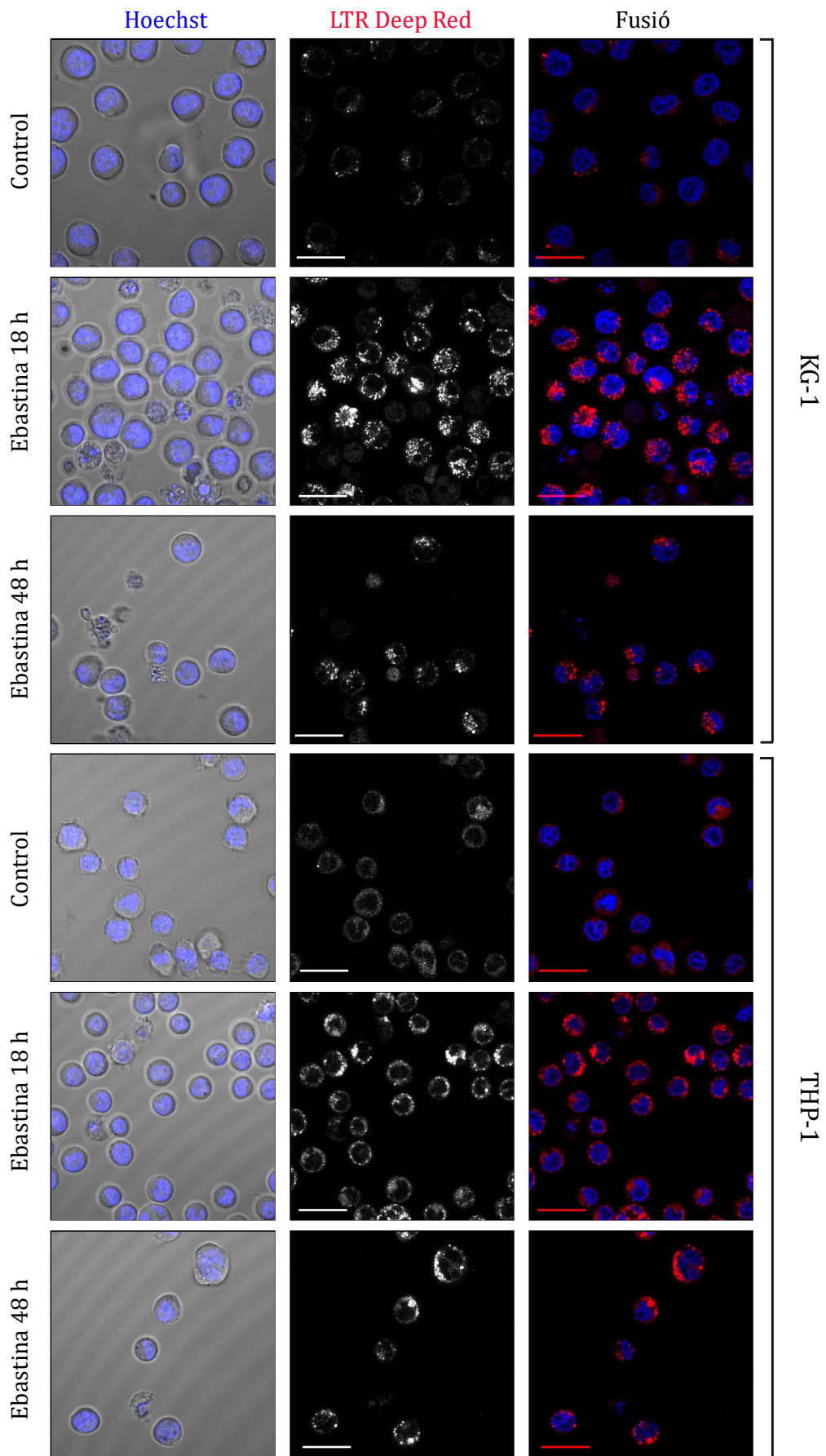


Figura 39. Els ANHA indueixen un augment de la massa lisosomal. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 24 o 48h amb control de vehicle (C), loratadina 10 μ M (L), rupatadina 10 μ M (R), ebastina 10 μ M (E), terfenadina 5 μ M (T), ciproheptadina 25 μ M (Cy) o cloroquina 20 μ M (Cl) i 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 de dos experiments independents.* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001 (t-tests).

L'anàlisi per citometria de flux de la tinció amb *LysoTracker* va aportar informació valuosa, però permetia sols analitzar si hi havia un efecte general sobre els lisosomes i no les característiques d'aquest efecte. Per poder observar més directament els lisosomes, es van tractar cèl·lules KG-1 i THP-1 18 i 48h amb ebastina a una concentració que no induís una mort general (5 μ M), es van tenyir amb *LysoTracker* i es van analitzar en viu per microscòpia de fluorescència. D'entrada, s'observa una pujada clara en la fluorescència general de *LysoTracker* que valida els anteriors resultats de citometria (Figura 40). L'efecte sobre la tinció és dràstic i evident; mentre que els controls mostren una tinció tènue amb molts punts fluorescents petits al citoplasma, l'addició d'ebastina provoca l'aparició de zones fluorescents més extenses i intenses. Aquest efecte és especialment espectacular en el cas del tractament de 18h en la línia KG-1 i apunta a una expansió del volum lisosomal. Per a un estudi amb més profunditat de la morfologia del compartiment, es van obtenir imatges a més augment, de les quals la Figura 41 mostra cèl·lules representatives. Aquestes imatges permeten constatar l'aparició de compartiments esfèrics molt intensos de fins a 3 micròmetres que són del tot absents a les cèl·lules control, alguns dels quals són visibles a les imatges de contrast per interferència diferencial. Aquesta observació és compatible amb un augment del volum lisosomal induït per l'acumulació de fàrmacs i la posterior coalescència entre orgànuls, que s'ha descrit per a diversos compostos (Goldman, Funk et al. 2009).

Figura 40. L'ebastina indueix una expansió del compartiment lisosomal en línies cel·lulars de LMA. Es van tractar cèl·lules KG-1 i THP-1 amb ebastina 5 μ M 18h o 48h, es van tenyir amb *LysoTracker DeepRed* i Hoechst33342 i es van observar en viu en un microscopi de fluorescència. Es mostren camps representatius de cada condició i els pertanyen a l'experiment a 48h, pràcticament idèntics a les 18h. Blau, hoechst33342; vermell/blanc, *LysoTracker DeepRed*. DIC, contrast per interferència diferencial. Les barres d'escala corresponen a 25 μ m (630 augments).



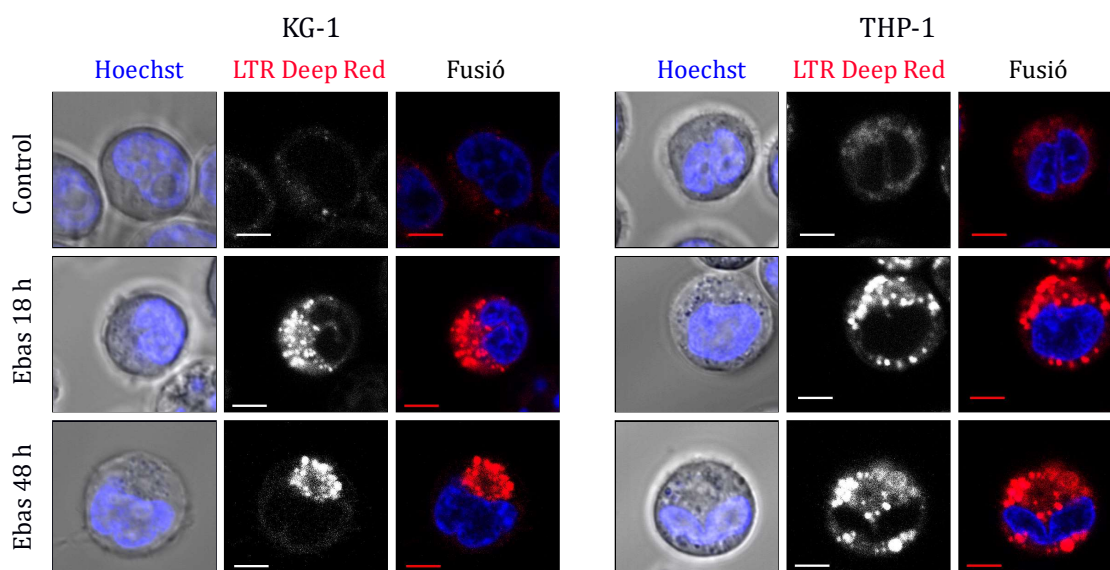


Figura 41. Ebastina indueix un augment del volum dels lisosomes. Imatges anàlogues a la a la Figura 40 obtingudes a 1260 augments. Les barres d'escala corresponen a 5 µm.

Un cop demostrada l'afectació lisosomal, va resultar d'interès l'estudi de l'autofàgia, un procés íntimament relacionat amb els lisosomes i amb implicacions en mort cel·lular. Per a fer-ho, es va estudiar per citometria de flux la tinció amb CYTO-ID (Enzo Life Sciences), una sonda fluorescent que tenyeix específicament autofagosomes i autofagolisosomes però no lisosomes. El procediment va ser anàleg al realitzat per a *LysoTracker* i els resultats van ser així mateix semblants, amb un augment en la fluorescència després del tractament amb ANHAs, tant a 24 com a 48h (Figura 42). Els ANHAs indueixen, doncs, un augment en les vesícules autofàgiques, bé per un augment del flux autofàgic com a resposta a les afectacions causades pels ANHA, bé com a efecte col·lateral de l'afectació lisosomal que impedeix la fusió final amb els autofagosomes. En aquesta ocasió, el tractament amb cloroquina va tornar a actuar com a control positiu, validant l'experiment.

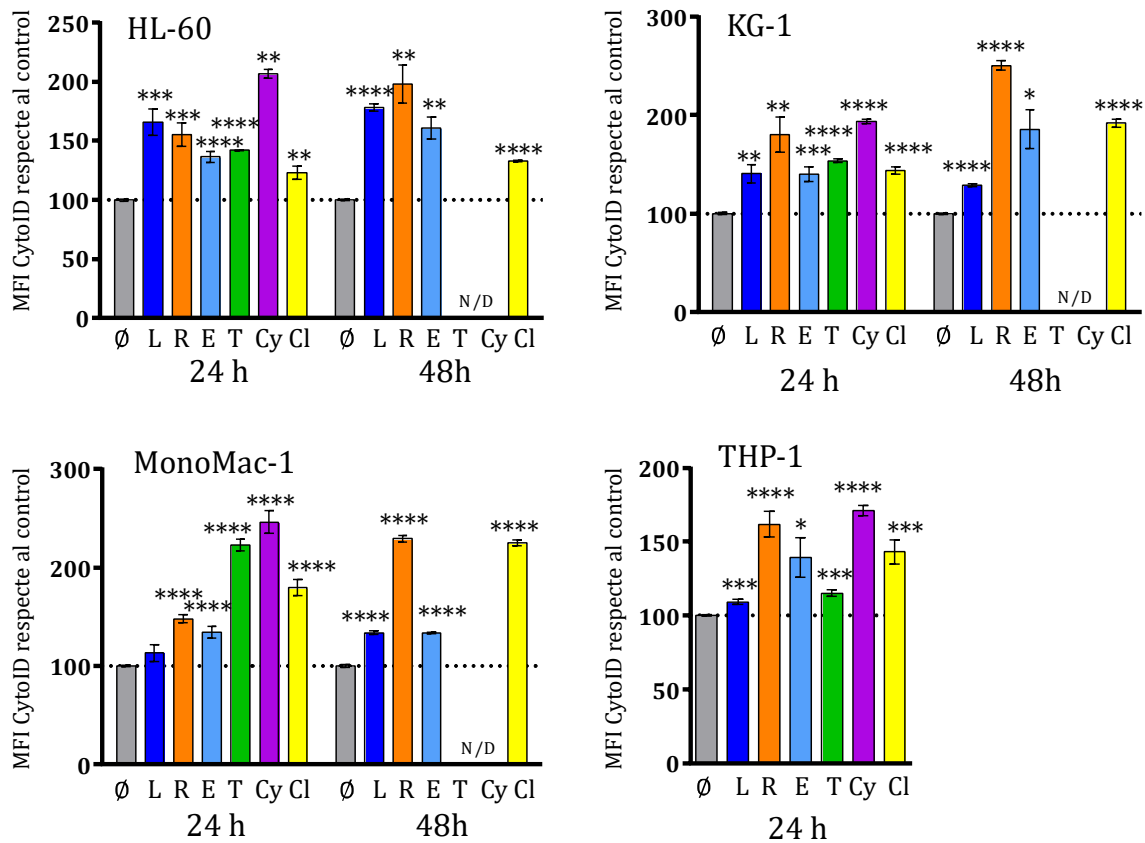


Figura 42. Els ANHA indueixen un augment del compartiment autofàgic. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 24 o 48h amb control de vehicle (C), loratadina 10 μ M (L), rupatadina 10 μ M (R), ebastina 10 μ M (E), terfenadina 5 μ M (T), ciproheptadina 25 μ M (Cy) o cloroquina 20 μ M (Cl) 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 volum del compartiment lisosomal. Les barres representen la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. N/D, dades no disponibles. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001 (t-tests).

Una de les mesures més acceptades per a l'anàlisi de l'activitat autofàgica és la detecció de LC3, una proteïna específica de vesícules autofàgiques, particularment la seva forma lipidada LC3II, associada a la maduració de fagòfors (Tanida, Ueno et al. 2008). Per a confirmar les observacions fetes mitjançant *CYTO-ID*, es van realitzar *western blots* per detectar LC3. En línies cel·lulars de LMA, els ANHA van induir un augment generalitzat de la forma LC3II (Figura 43A). En dues mostres primàries de LMA, a més, ebastina va produir el mateix efecte (Figura 43B), suggerint que, efectivament, els ANHA també afecten el compartiment autofàgic.

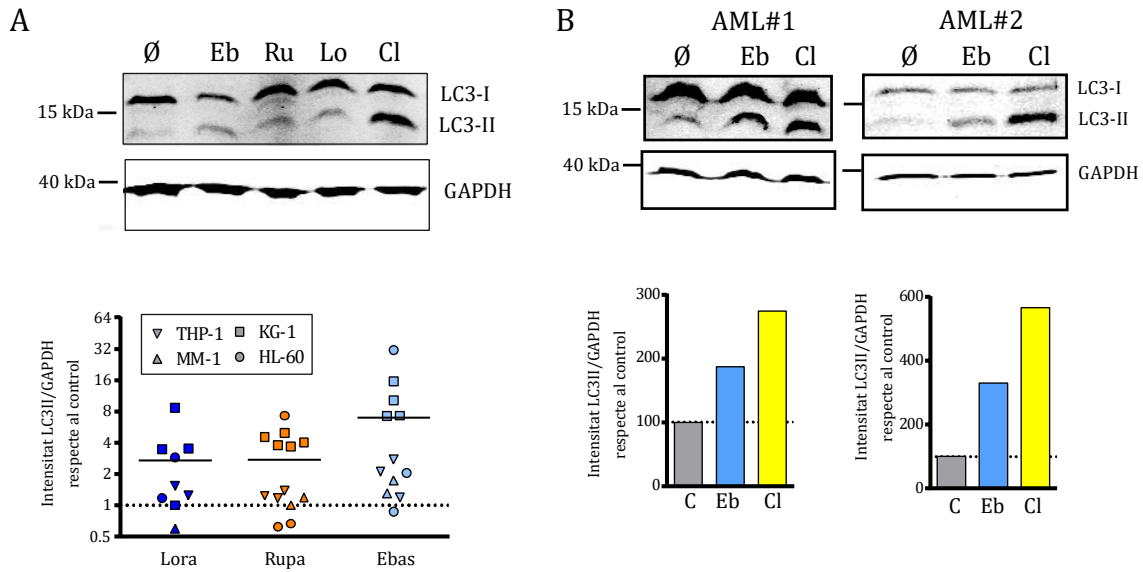


Figura 43. Els ANHA indueixen un augment del marcador autofàgic LC3II en LMA. Es van tractar 24h **A.** Línies cel·lulars o **B.** Mostres primàries de LMA amb alt percentatge de blasts amb control de vehicle (∅), ebastina 10 μM (Eb), rupertadina 10μM (Ru), loratadina 10 μM (Lo) o cloroquina 20 μM (Cl) i se'n van extreure proteïnes. Es van realitzar *Western blots* amb anticossos per a LC3 i el control GAPDH. Als panells superiors es mostren membranes representatives de KG-1 (A) i de dues mostres primàries (B). Als panells inferiors es mostra la quantificació de bandes. En A, cada punt simbolitza una rèplica experimental, en B, la mitjana de dues membranes.

En vista d'aquests resultats en línies cel·lulars, es va analitzar l'estat del compartiment autofàgic i lisosomal en 5 mostres primàries de LMA tractades 24 h amb ANHAs. Els resultats van ser molt heterogenis, amb efecte nul en algunes mostres i disminucions o augments en d'altres (Figura 44). L'estudi de l'autofàgia i els lisosomes en poblacions heterogènies com les de LMA és, sens dubte, un repte, si bé el control positiu, cloroquina, valida el model experimental. Els augments o disminucions amb el mateix tractament s'expliquen, probablement, per efectes qualitativament diferents en funció de les característiques cel·lulars dels blasts, per exemple, una expansió del volum associat a l'acumulació dels fàrmacs als lisosomes o una disrupció ràpida d'aquests en resposta al tractament.

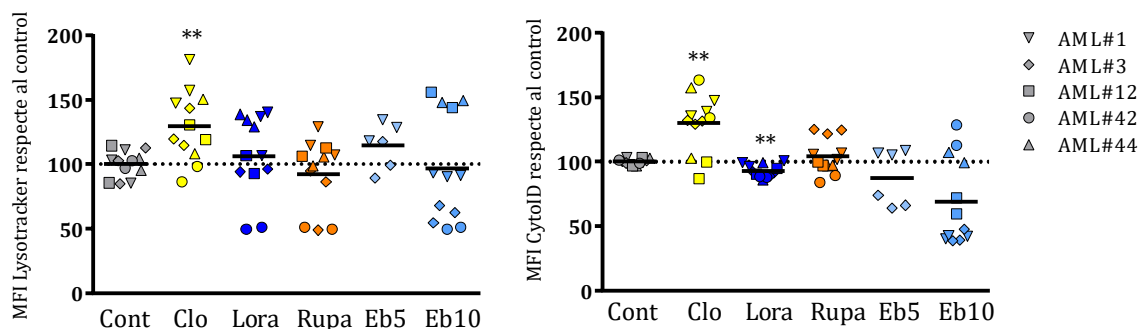


Figura 44. Els ANHA no tenen efectes consistents sobre mostres primàries de LMA. Es van tractar 5 mostres primàries de LMA amb cloroquina 20 μM (Clo), loratadina 10 μM (Lora), rupatadina 10 μM (Rupa), ebastina 5 μM (Eb 5) o ebastina 10 μM (Eb 10). Es va analitzar dins la població blàstica la intensitat mitjana de fluorescència (MFI) de *LysoTracker Deep Red* (esquerra) o *CYTO-ID* (dreta). Cada punt representa una mesura experimental, i cada símbol representa una mostra diferent. ** $p < 0,01$ en tests de Mann-Whitney.

Fins aquest punt s'ha demostrat com els ANHAs afecten els compartiments autofàgic i lisosomal induint-ne l'expansió, però no s'han relacionat aquestes observacions directament amb la mort cel·lular. Publicacions anteriors referents a la mort cel·lular dependent de lisosomes han determinat que un element fonamental d'aquesta és la permeabilització de la membrana lisosomal (LMP) que inicia la mort mitjançant l'alliberament d'hidrolases al citoplasma (Serrano-Puebla i Boya 2018). La detecció de LMP és una empresa complexa, en tractar-se d'un procés molt dinàmic i que afecta més d'un compartiment cel·lular. Això no obstant, s'han proposat diverses estratègies, una de les quals és la detecció microscòpica de punts de galectina (Aits, Krickler et al. 2015). Aquesta estratègia es basa en la formació d'agregats de galectina (en especial galectina-1 i galectina-3) als lisosomes permeables, que es poden detectar mitjançant anticossos específics, permetent una detecció sensible i acurada de LMP.

Quan es va analitzar la formació de punts de galectina en línies cel·lulars de LMA tractades 18h amb ebastina, es va comprovar com, efectivament, es produïa un augment de cèl·lules amb lisosomes permeables respecte al control (Figura 45), suggerint que s'estaria produint una LMP prèvia a la mort cel·lular.

S'han descrit diversos actors moleculars implicats en la desestabilització dels lisosomes i la LMP. Un dels més estudiats és l'esfingomielinasa àcida (ASM), un enzim intralisosomal ancorat a membrana que catabolitza l'esfingomielina, regulant en part la composició de la membrana lisosomal. S'ha observat que diversos fàrmacs que alteren els lisosomes són inhibidors funcionals d'ASM, provocant l'acumulació d'esfingomielina i subseqüent permeabilització de la membrana. Per aquesta raó es va estudiar si el tractament amb ASM recombinant de *Bacillus Cereus* era capaç de revertir els efectes citotòxics dels ANHA apaivagant l'acumulació d'esfingomielina.

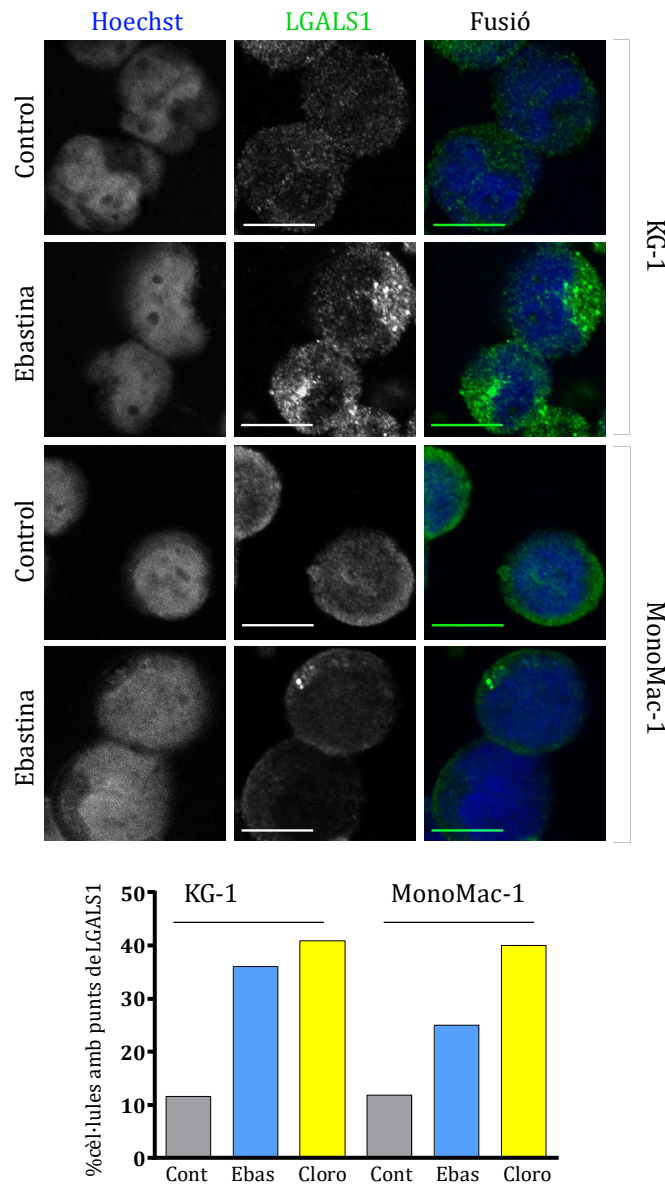


Figura 45. Ebastina indueix LMP. Es van tractar cèl·lules KG-1 i MonoMac-1 18h amb control de vehicle o ebastina 7 μ M, i es va observar la distribució de galecina-1 (LGALS1) per immunofluorescència. Es va emprar Hoechst 33342 per a la tinció dels nuclis. Es mostren imatges representatives. El gràfic inferior mostra el percentatge de cèl·lules vives amb punts de galectina en les cèl·lules tractades amb control de vehicle (Cont), ebastina (Ebas) o el control positiu cloroquina (Cloro). Es van comptar un mínim de 25 cèl·lules per condició.

Com mostra la Figura 46, els efectes van ser poc consistents entre les diverses línies cel·lulars. Així mentre que en HL-60 l'ASM va àdhuc potenciar els efectes d'ebastina, en KG-1 es va observar una reversió potent a 10 μM , i en diferents experiments en MonoMac-1 es va observar una certa tendència a la reversió, sense que aquesta fos significativa. D'aquestes observacions extreiem que ASM podria jugar algun paper en la mort induïda per ebastina, però no es tracta probablement d'un paper central.

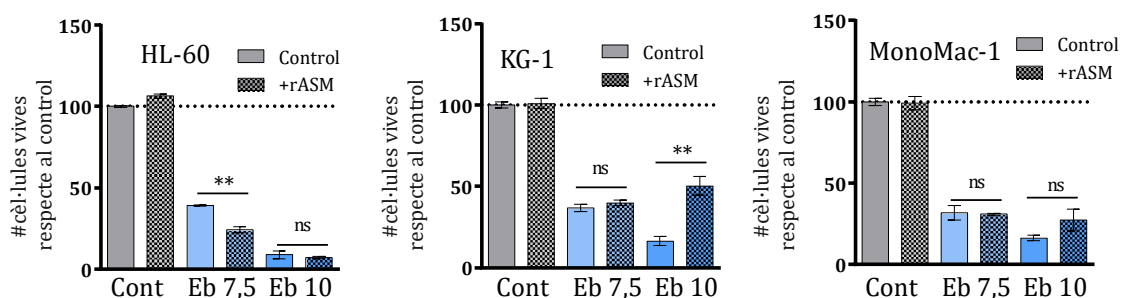


Figura 46. L'esfingomielinasa àcida recombinant només reverteix la mort induïda per ebastina en KG-1. Cèl·lules HL-60, KG-1 i MonoMac-1 es van tractar 1h amb medi a pH 5,2 amb presència o absència de 0,1 U/mL d'esfingomielinasa àcida de *Bacillus cereus*, i posteriorment es van cultivar en medi a pH fisiològic 48 h amb control de vehicle (Cont), ebastina 7,5 μM (Eb 7,5) o ebastina 10 μM (Eb10) i se'n va analitzar la viabilitat per citometria de flux. Les barres representen la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu (de tres realitzats). ** $p < 0,01$ en t-tests. Ns, no significatiu.

Una altra eina comunament utilitzada per a l'estudi de fàrmacs que afecten els lisosomes (i mitocondris) és l' α -tocoferol, una molècula que d'una banda disminueix la peroxidació lipídica, procés involucrat en la desestabilització lisosomal i mitocondrial, i de l'altra produeix una redistribució intracel·lular de compostos catiónics amfifílics, disminuint la seva acumulació lisosomal (Marenchino, Alpstag-Wohrle et al. 2004). Així, es van pretractar línies cel·lulars de LMA amb α -tocoferol i posteriorment es van afegir ANHAs i es van observar els efectes citotòxics a les 48h per citometria de flux. La reversió de l'efecte citotòxic dels ANHA es va donar en tots els ANHA i en totes les línies cel·lulars de manera dependent de dosi, i va ser particularment espectacular en el tractament amb ebastina 10 μM , en què es va passar d'una mort pràcticament total a la mort de menys del 50% de cèl·lules (Figura 47). Aquestes dades emfasitzen la importància de la distribució subcel·lular i els efectes sobre els lisosomes en la mort cel·lular induïda per ANHAS.

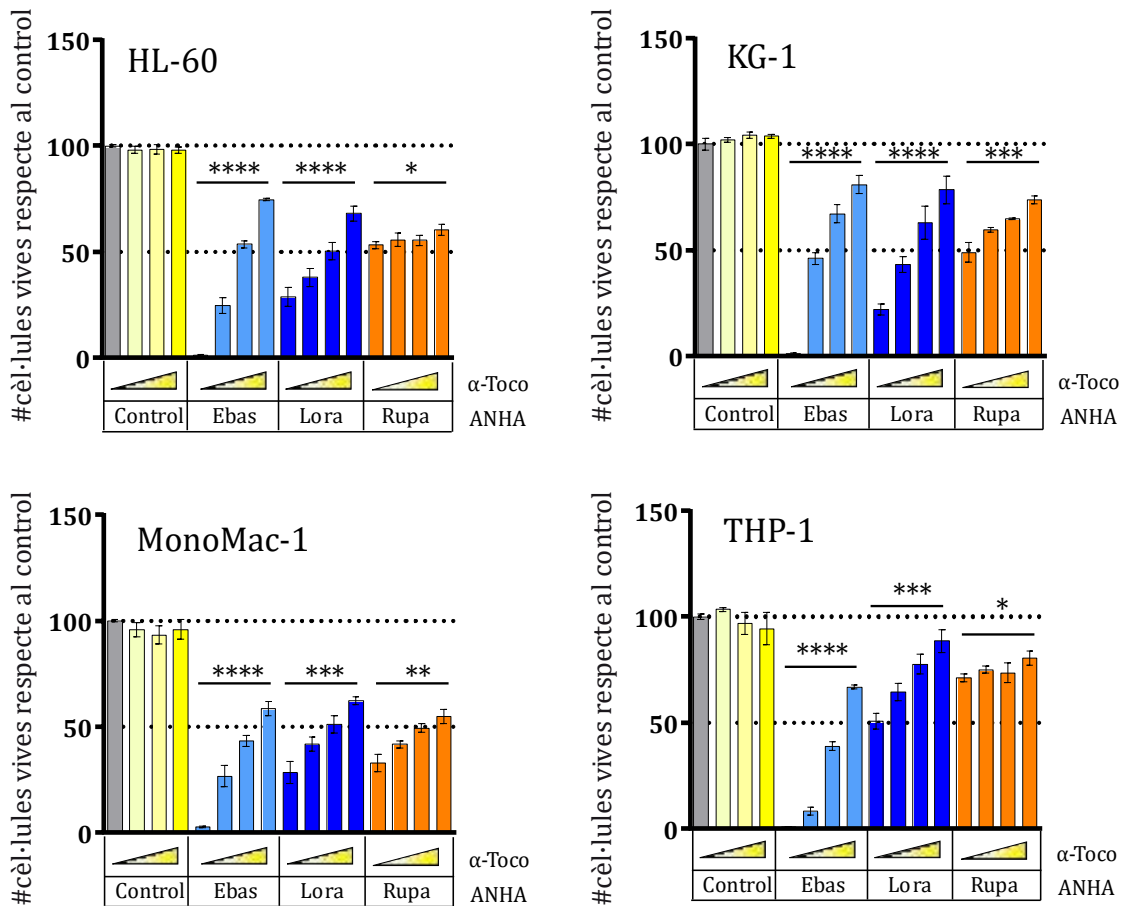


Figura 47. A-tocoferol reverteix els efectes citotòxics dels ANHA. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar amb concentracions creixents d' α -tocoferol (α -Toco; 500, 1000 i 2000 μ M) durant 24h i posteriorment 48h amb control de vehicle (Control), ebastina 10 μ M (ebas), loratadina 10 μ M (Lora) o rupatadina 10 μ M (Rupa) i se'n va analitzar la viabilitat per citometria de flux. 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-tests).

A banda de la importància dels lisosomes, es va voler sondejar la rellevància de l'expansió observada del compartiment autofàgic. Per fer-ho, es va emprar 3-metiladenina (3-MA), un inhibidor d'autofàgia els efectes del qual es van validar prèviament. A la Figura 48 es pot veure com 3-MA no va ser capaç de revertir la mort causada per ebastina en línies cel·lulars de LMA, si bé es va observar una certa tendència en KG-1. Atès que l'autofàgia actua com a procés de resposta a estrès i és un efecte col·lateral en molts escenaris de mort cel·lular, es va abandonar l'estudi de l'autofàgia com a mitjancer principal de la mort cel·lular per ANHAs.

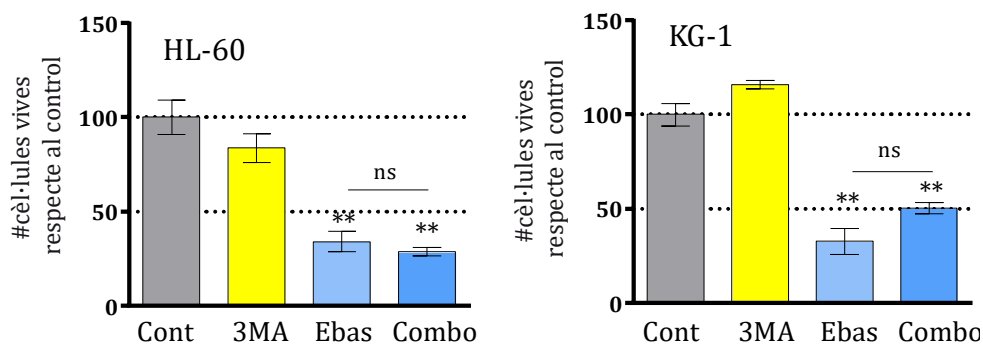


Figura 48. 3-MA no reverteix els efectes citotòxics dels ANHA. Es van tractar cèl·lules HL-60 i KG-1 amb control de vehicle (Cont), 3MA 500 μ M, ebastina 7 μ M (Ebas) o una combinació de tots dos (combo) i se'n va analitzar la viabilitat de les 48h . Les barres representen la mitjana \pm SEM d'un experiment.

4.4.7. Efectes dels antihistamínics sobre la funció mitocondrial

Fins a aquest punt hem constatat la implicació del compartiment lisosomal en la mort cel·lular induïda per ANHAs. La desestabilització lisosomal és, però, un procés comú en d'altres vies de mort cel·lular, que acompanya la mort més que determinar-la. A més, s'ha descrit prèviament l'acumulació de fàrmacs catiónics amfifílics en mitocondris (Vater, Mockl et al. 2017). Aquests fets van dur a l'estudi de l'apoptosi i l'afectació mitocondrial induïts per ANHA.

Per analitzar si la mort cel·lular induïda per ANHAs era compatible amb apoptosi es va realitzar en primer lloc un estudi en línies cel·lulars de LMA amb annexina V, que s'uneix a la fosfatidilserina translocada 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. Com es pot observar a la Figura 50, el percentatge total de cèl·lules positives per a la tinció amb annexina V es va veure fortament incrementat amb tots els tractaments en totes les línies, especialment en el cas d'ebastina. Quan es va analitzar el perfil annexina V-7AAD, es va observar que la gran majoria de cèl·lules després del tractament amb ebastina 10 μ M eren annexina-V+/7AAD+ (Figura 50), indicant que presentaven les característiques pròpies de l'apoptosi tardana.

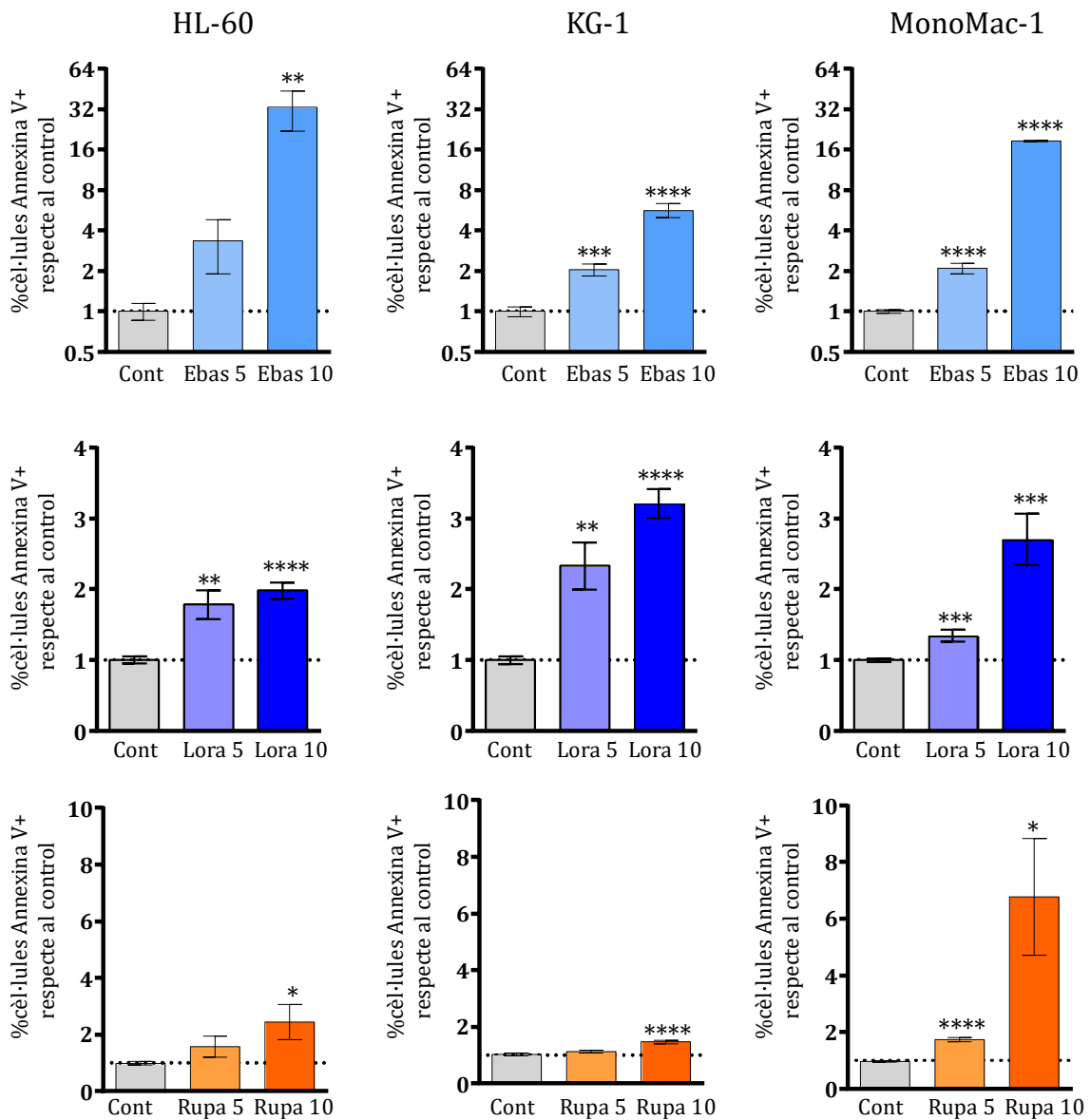


Figura 49. Els ANHA indueixen un augment de cèl·lules Annexina V+. Cèl·lules HL-60, KG-1 o MonoMac-1 es van tractar 48 h amb control de vehicle (Cont), ebastina 5 i 10 μ M (Ebas 5, Ebas 10), loratadina 5 i 10 μ M (Lora 5, Lora 10) o rupatadina 5 i 10 μ M (Rupa 5, Rupa 10) i es van tenyir amb Annexina V. Es representa el percentatge de cèl·lules positives per a la tinció respecte al control de vehicle. Es mostra la mitjana \pm SEM de triplicats de dos o tres experiments independents. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001 (t-tests).

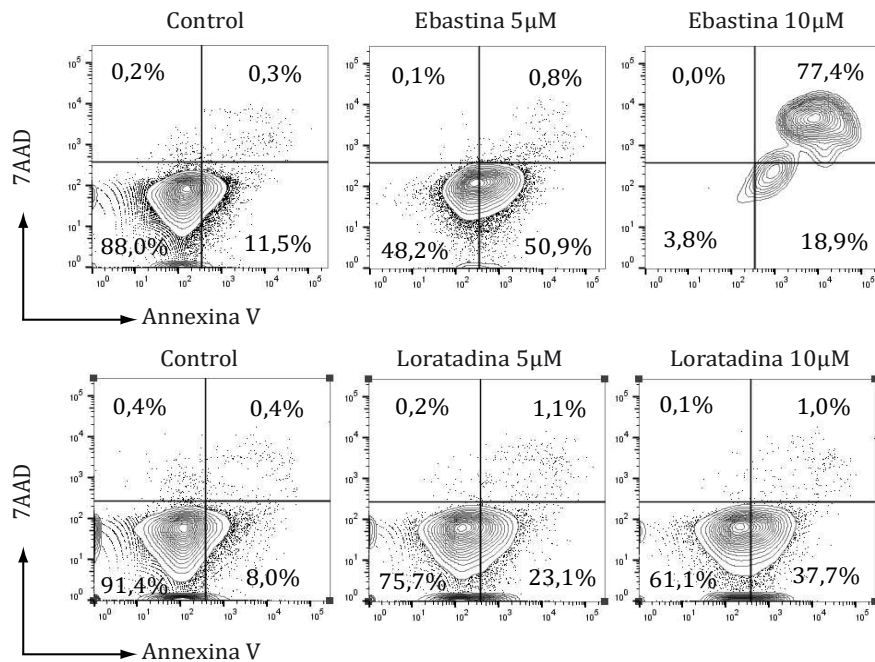


Figura 50. Els ANHA indueixen una mort cel·lular compatible amb l'apoptosi. Es mostren gràfics de citometria de flux representatius dels experiments recollits a la Figura 49.

A banda de l'estudi amb annexina V, es va estudiar un altre element característic de l'apoptosi: la condensació i fragmentació ordenada del nucli, que es va analitzar per microscòpia mitjançant la tinció de DNA amb Hoechst33342. Com es desprèn de la Figura 51, efectivament l'ebastina induïa una condensació i fragmentació nuclear, manifestada en una major intensitat de la tinció amb Hoechst33342 i una pèrdua de la integritat formant-se cossos discrets, tal i com és característic de la morfologia apoptòtica de la mort cel·lular. Així mateix, les imatges de contrast permeten observar en algunes cèl·lules l'embutllament que condueix a la formació de cossos apoptòtics.

Un cop observades aquestes característiques típiques de cèl·lules apoptòtiques, es va realitzar un estudi del mediador molecular principal de l'apoptosi, l'activació de caspases efectores. Mitjançant un *kit* basat en luminiscència que permet determinar el grau d'activació de caspases 3 i 7 (Caspase-Glo® 3/7 Assay, Promega) es va constatar una activació de caspases notable a les 24 hores de tractament amb loratadina, ebastina i rupatadina a 10 μM en 4 línies cel·lulars de LMA (Figura 52), en alguns casos similar a l'observada amb el tractament amb etopòsid, un activador de caspases paradigmàtic. Queda clar, doncs, que els ANHA indueixen una activació de caspases que condueix a una mort cel·lular amb trets apoptòtics.

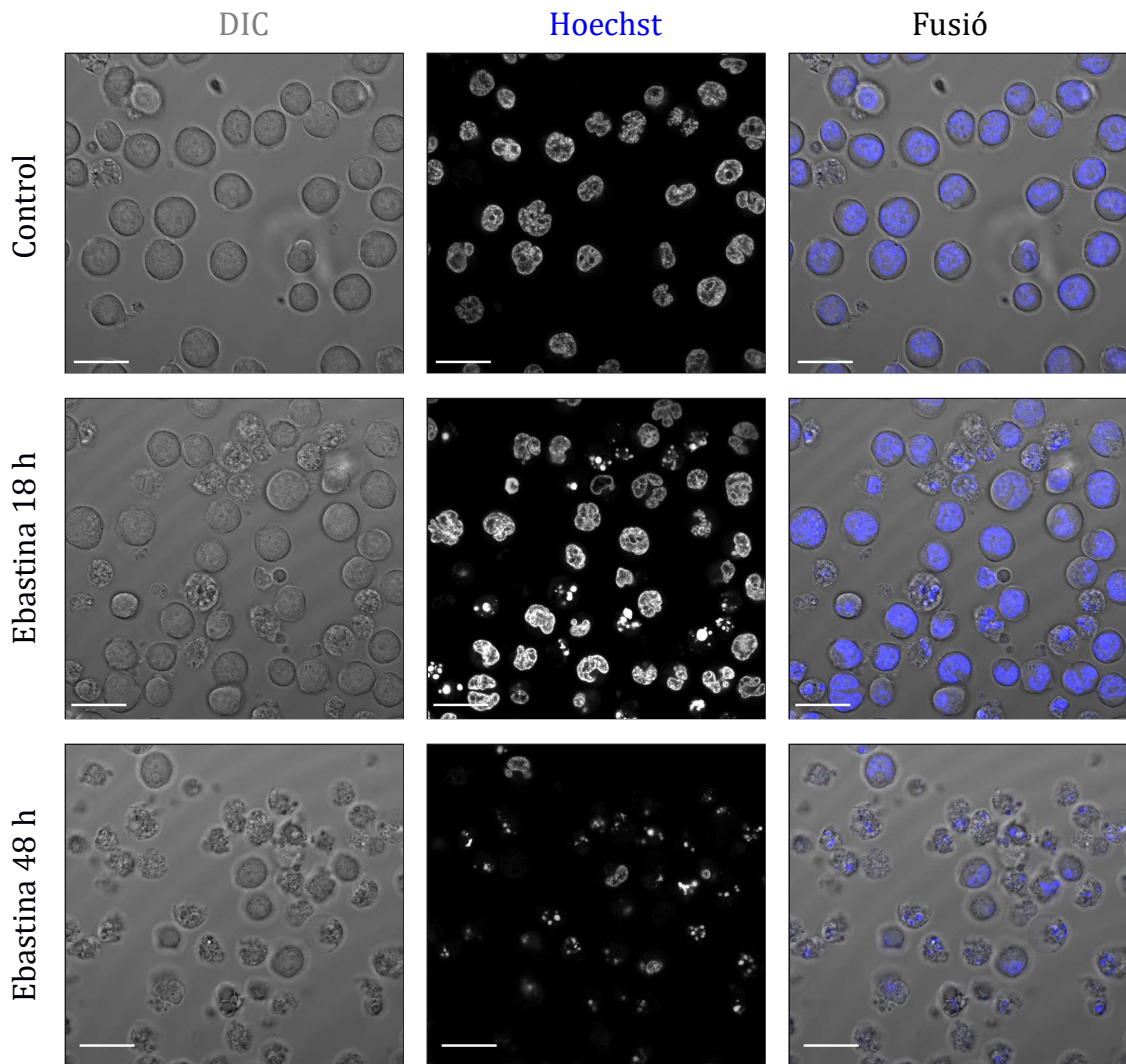


Figura 51. Els ANHA indueixen una condensació i fragmentació del nucli compatible amb l'apoptosi. Es mostren imatges representatives de contrast per interferència diferencial (DIC) i de la tinció amb Hoechst 33342 dels experiments mostrats a la Figura 40. Les barres representen 25 μ M.

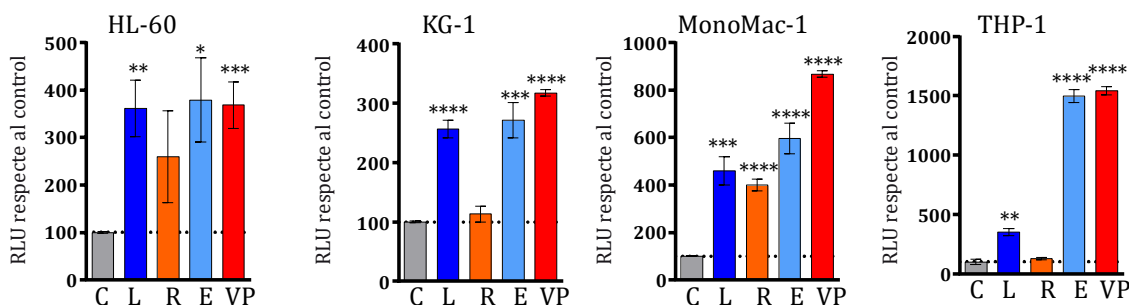


Figura 52. Els ANHA indueixen una activació de caspases efectores a les 24h. Es van tractar cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 amb control de vehicle (C), loratadina 10 μ M (L), rupatadina 10 μ M (R), ebastina 10 μ M (E) o etopòsid 5 μ M (VP). A les 24h, es va analitzar per luminiscència l'activació de caspases mitjançant el kit CaspaseGlo 3/7 assay ®. Es mostren les unitats de luminiscència relativa (RLU) respecte al control. Les barres representen la mitjana \pm SEM de triplicats de dos experiments independents. RLU, Unitats de luminiscència relativa. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (t-tests).

Arran de totes les evidències que apuntaven a una inducció de l'apoptosi per part dels ANHAs, es va voler analitzar si la inhibició de caspases era capaç de revertir els efectes citotòxics dels ANHA. Amb aquest objectiu es va emprar el pan-inhibidor de caspases Z-VAD-FMK a concentració de 50 μ M, una concentració que assegura una inhibició pràcticament completa. Per validar que en el nostre model Z-VAD-FMK era capaç d'inhibir l'activació de caspases induïda per ebastina es va realitzar una petita prova amb el Caspase-Glo® 3/7 Assay, observant-se'n una abolició completa (Figura 52A). Validat així el sistema experimental, es van tractar cèl·lules HL-60 i KG-1 amb diversos ANHAs en presència o absència de Z-VAD-FMK, i es va observar com pràcticament no hi havia diferències (Figura 52B). Aquests resultats insinuen que, o bé les caspases s'activen durant la mort cel·lular induïda per ANHAs però no hi juguen un paper central, o bé existeixen mecanismes capaços de sobreposar-se a la inhibició de caspases. En qualsevol dels casos, es dibuixa un escenari en què es produeix una mort cel·lular complexa amb implicació de diferents compartiments cel·lulars i mediadors moleculars.

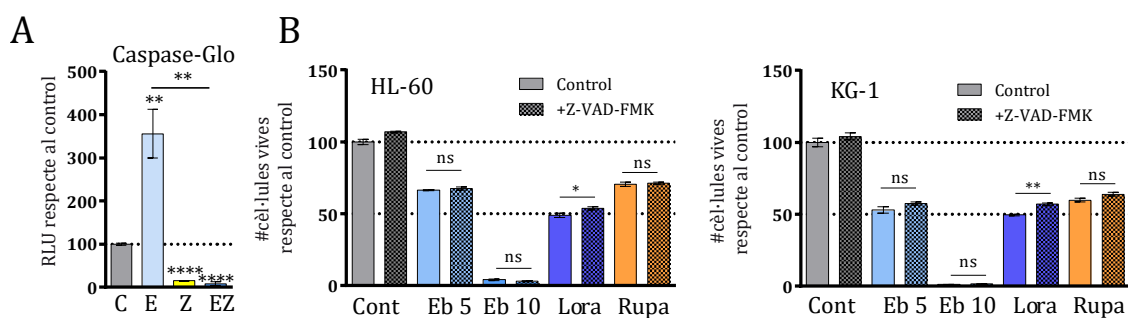


Figura 53. L'inhibidor de caspases zVAD-fmk no reverteix la mort induïda per ANHAs. **A.** Es van tractar 12h cèl·lules HL-60 amb control de vehicle (C), ebastina 10 μ M, (E), Z-VAD-FMK 50 μ M (Z) o amb una combinació dels dos últims (EZ), i es va medir l'activació de caspases mitjançant el kit CaspaseGlo 3/7 assay **B.** Es van tractar cèl·lules HL-60 o KG-1 amb o sense Z-VAD-FMK 50 μ M i amb control de vehicle (Cont), ebastina 5 μ M (Eb 5), ebastina 10 μ M (Eb 10), loratadina 10 μ M (Lora) o rupatadina 10 μ M (Rupa). Al cap de 48h es va analitzar el número de cèl·lules vives per citometria de flux. Les barres representen la mitjana \pm SEM de triplicats d'un experiment representatiu (de 3 realitzats). * p <0.05; ** p <0.01 (t-tests). Ns, no significatiu.

En vista de la implicació de la maquinària apoptòtica, es va procedir a analitzar l'afectació dels ANHA sobre el compartiment mitocondrial. D'una banda, es va analitzar l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen al mitocondri (mitROS), en tractar-se d'un procés comú en l'alteració de l'homeòstasi mitocondrial i un dels desencadenants de l'activació de caspases (Kannan i Jain 2000). Per fer-ho, es va analitzar per citometria de flux la intensitat de fluorescència de la sonda específica de mitROS *MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator* (Thermo Fisher) després de 24h de tractament amb ANHAs de línies cel·lulars de LMA. Com mostra la Figura 54, els ANHAs van induir un augment molt notable en els nivells de mitROS.

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. S'ha descrit que una disminució de la intensitat de fluorescència està relacionada amb una pèrdua de $\Delta\Psi_{mit}$ (Baracca, Sgarbi et al. 2003). En els estudis realitzats amb línies cel·lulars de LMA tractades amb ANHA, es va observar una disminució general de $\Delta\Psi_{mit}$ (Figura 55), especialment amb el tractament amb ebastina.

Aquestes dues observacions suggereixen que, a banda d'una afectació del compartiment lisosomal i una LMP, es dona una afectació mitocondrial i una pèrdua del seu potencial de membrana, probablement en estreta relació amb l'observació d'una mort cel·lular amb característiques apoptòtiques.

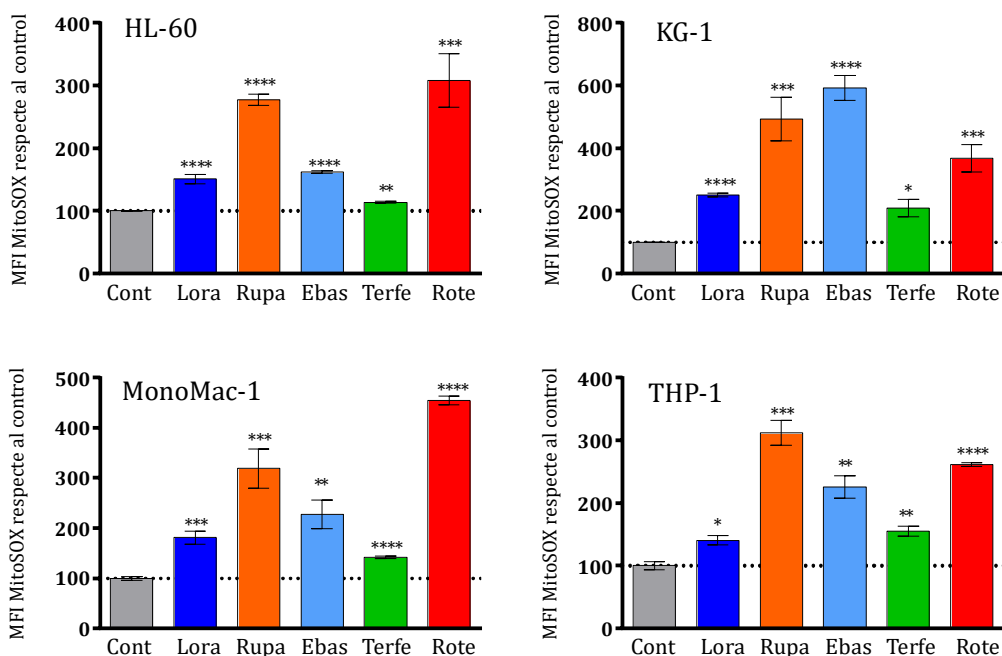


Figura 54. Els ANHA indueixen una acumulació de mitROS. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 24h amb control de vehicle (Cont), loratadina 10 μ M (Lora), rupatadina 10 μ M (rupa), ebastina 10 μ M (Ebas), terfedadina 1 μ M (Terfe) o rotenona 0,1 μ M (Rote, control positiu) i es van 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 de dos experiments independents. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001 (t-tests).

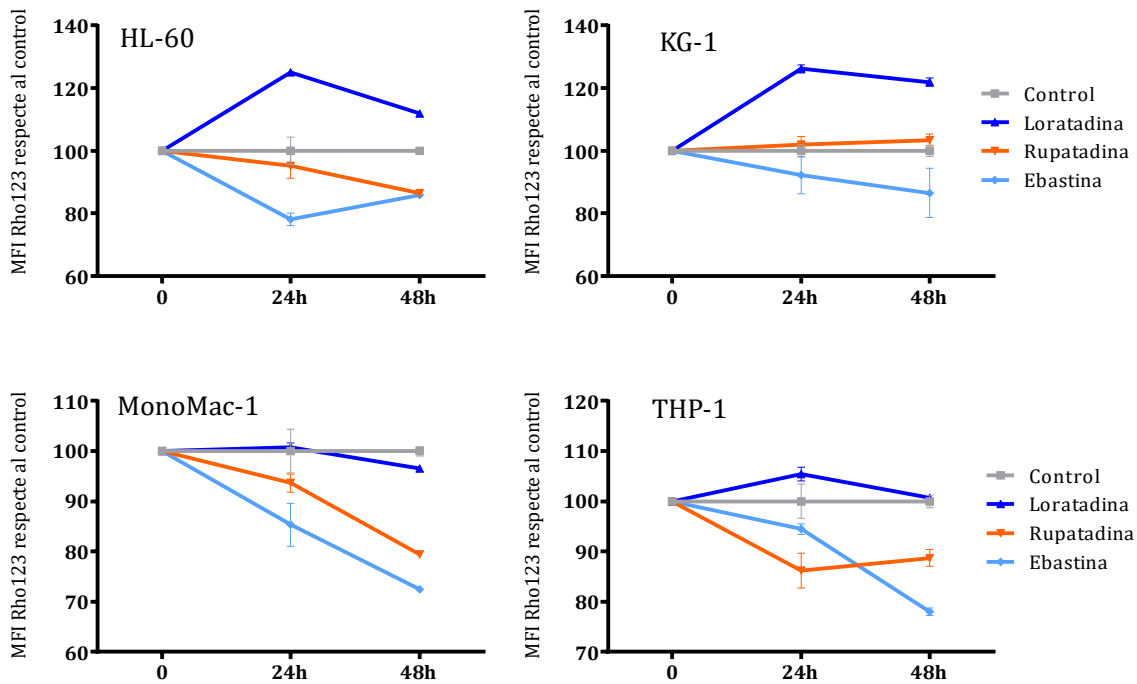


Figura 55. Ebastina i rupatadina indueixen una pèrdua de potencial de la membrana mitocondrial. Cèl·lules HL-60, KG-1, MonoMac-1 i THP-1 es van tractar 24h o 48h amb control de vehicle (gris), loratadina 10 μ M (blau fosc), rupatadina 10 μ M (taronja) o ebastina 10 μ M (blau clar) i es va analitzar la tinció amb rodamina-123 per citometria de flux. Els punts representen la mitjana \pm SEM de dos experiments independents.

4.4.8. Cinètica dels efectes dels antihistamínics sobre els diferents compartiments cel·lulars

Ha quedat constatada en apartats anteriors l'acumulació d'ANHAs als lisosomes i la LMP, i també l'afectació mitocondrial, l'acumulació de mitROS, l'activació de caspases i trets de mort cel·lular apoptòtica. Lluny de resultar dades contradictòries, encaixen en el model cada cop més acceptat que hi ha una gran interrelació entre fenòmens prèviament considerats independents (Galluzzi, Vitale et al. 2018). Com que serà l'objectiu de futurs estudis la millora de les molècules per a cercar nous tractaments, resulta fonamental comprendre quin és l'esdeveniment determinant en la mort induïda per ANHAs; quin és el seu mecanisme d'acció. Fent ús de les eines emprades als darrers apartats, es va realitzar una cinètica dels efectes sobre els diferents compartiments cel·lulars en la línia cel·lular de LMA KG-1, si bé també es va sondejar en altres línies cel·lulars, amb resultats similars. Com mostra la Figura 56, el primer esdeveniment observable és l'augment de mitROS, que s'observa ja a la mitja hora de tractament i assoleix un estancament cap a les 4h. No és fins a les 6-12h que s'observa un augment detectable tant en l'activació de caspases com en l'augment del volum lisosomal, que evolucionen de manera força paral·lela. Pel que fa a l'autofàgia, en el cas d'ebastina no s'observen canvis rellevants fins a les 24h, mentre que en loratadina i rupatadina la cinètica és similar a l'observada pels lisosomes.

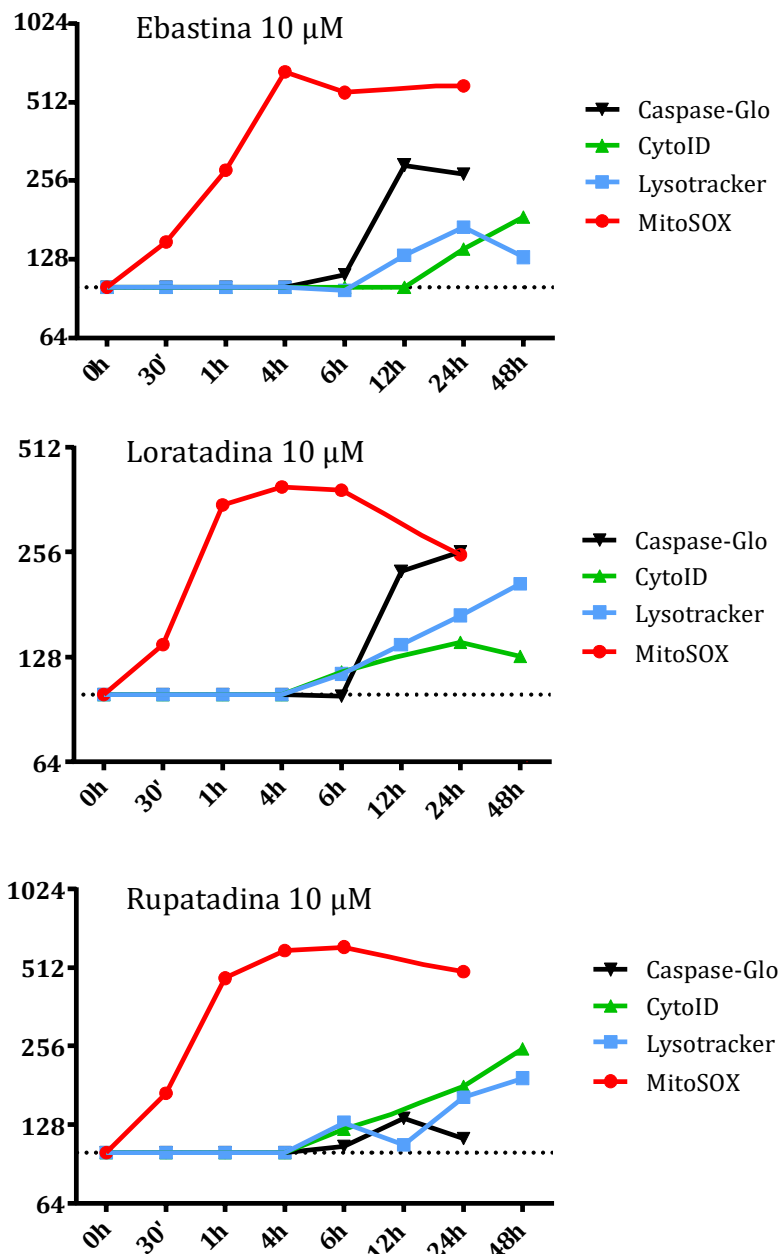


Figura 56. Cinètica d'esdeveniments observats després del tractament amb ANHAS. Es van tractar cèl·lules KG-1 amb ebastina, loratadina o rupatadina a les concentracions indicades i es van analitzar en diferents punts experimentals l'activació de caspases (Caspase-Glo, negre), el compartiment autofàgic (intensitat de CYTO-ID respecte al control, verd), el compartiment lisosomal (intensitat de LysoTracker respecte al control, blau) i els nivells de superòxid mitocondrial (intensitat de MitoSOX respecte al control, vermell). Cada punt representa la mitjana de triplicats de dos experiments independents, i no es mostren barres d'error perquè impedirien la correcta visualització de la cinètica. L'eix de les X no es troba a escala amb els temps indicats.

Per analitzar en més profunditat el punt on s'inicien tant l'activació de caspases com l'augment del volum lisosomal es van analitzar tots dos esdeveniments a les 12h de tractament amb ANHAS. En el cas d'ebastina sembla que l'augment de volum lisosomal és un esdeveniment lleugerament més primerenc que l'activació de caspases, mentre que en

rupatadina s'observa en general el patró contrari, i en loratadina una acció paral·lela (Figura 57). Tot plegat suggereix una aparició paral·lela dels dos esdeveniments, fent improbable tant que l'activació de caspases sigui la responsable dels efectes lisosomals com el contrari i insinuant que es tracta d'esdeveniments fins a un cert punt independents. El primer esdeveniment observat, l'acumulació de mitROS, podria ser responsable de l'activació de caspases, però difícilment explicaria un augment tan marcat del volum lisosomal.

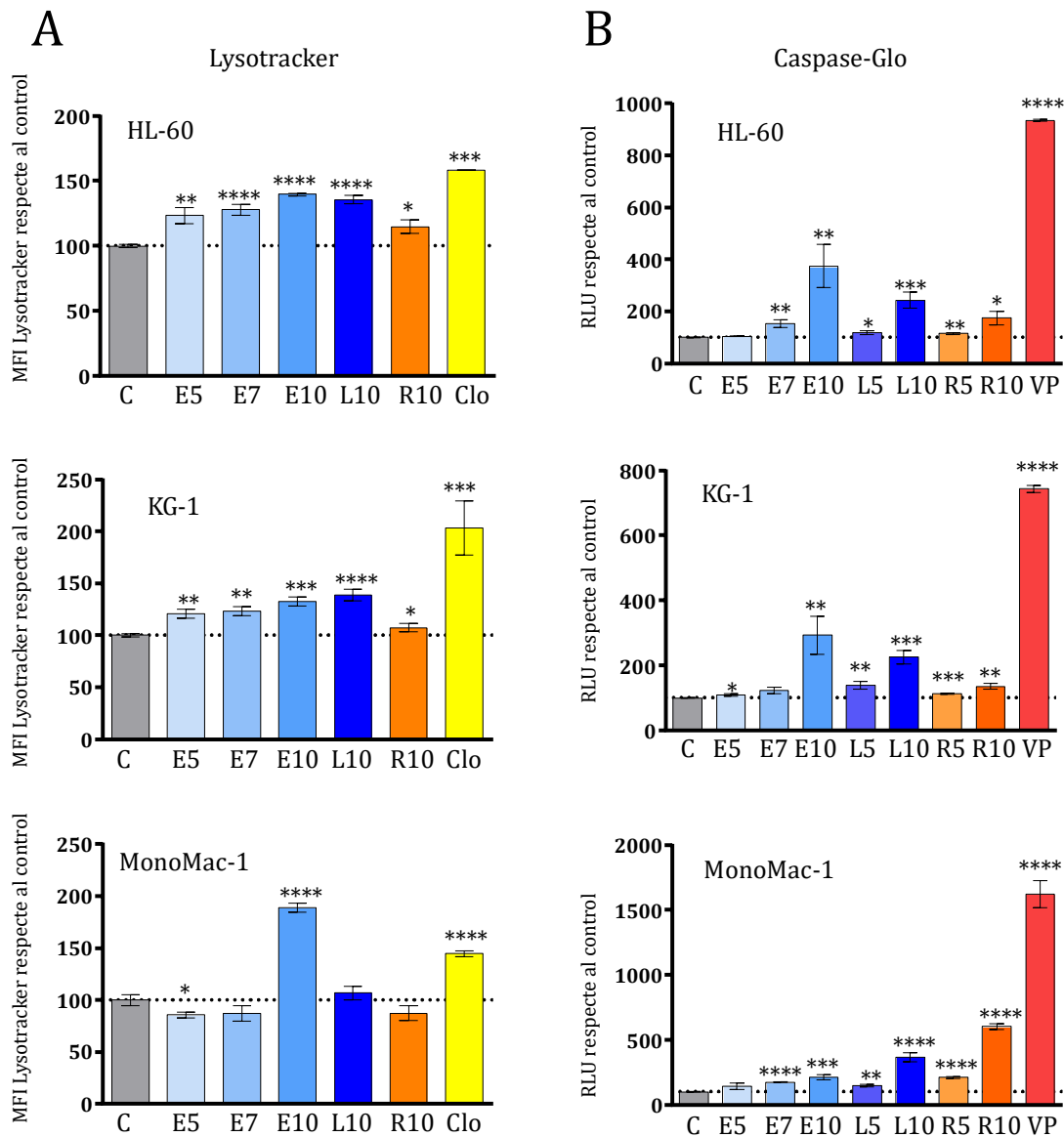


Figura 57. Estudi del compartiment lisosomal i l'activació de caspases a les 12h de tractament amb ANHAs. Cèl·lules HL-60, KG-1 o MonoMac-1 es van tractar 12h amb control de vehicle (C), ebastina 5µM (E5), ebastina 7,5 µM (E7), ebastina 10 µM (E10), loratadina 5 µM (L5), loratadina 10 µM (L10), rupatadina 5 µM (R5), rupatadina 10 µM (R10), cloroquina 20 µM (Clo) o etopòsid 5 µM (VP). Passat aquest temps se'n va analitzar **A**. La mitjana de la intensitat de fluorescència (MFI) per a la sonda LysoTracker o **B**. L'activació de caspases efectores (mitjançant Caspase-Glo). Les barres representen la mitjana ± SEM de triplicats de dos experiments independents. *p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001 (t-tests).

4.4.9. Relació de l'acció dels antihistamínics amb les seves propietats fisicoquímiques

Com hem vist en apartats anteriors, dins la família farmacològica estudiada s'hi troben compostos amb i sense activitat antileucèmica, i aquesta activitat és dependent de la seva distribució subcel·lular, fortament condicionada per propietats fisicoquímiques. Per estudiar l'impacte d'aquestes sobre l'acció antileucèmica i amb la vista posada en el desenvolupament de futurs compostos, es van comparar propietats d'interès entre els antihistamínics amb activitat antileucèmica a 10 μ M, amb activitat antileucèmica a concentracions més altes i sense activitat antileucèmica. L'objectiu d'aquesta comparació no va ser establir correlacions estadístiques, d'altra banda dificultoses atès el baix nombre de compostos estudiats, sinó més aviat observar tendències i analitzar si aquestes eren capaces de solidificar els efectes experimentals observats.

En alguns paràmetres, recollits a la Figura 58, no es van observar diferències substancials entre grups, tals com en el pKa bàsic o en el número d'enllaços rotables. En d'altres, es van observar diferències en la línia dels efectes antileucèmics, principalment en termes d'hidrofobicitat, un paràmetre clau per a la capacitat de creuar membranes. Així, tant analitzant els cLogPs predits per dos softwares diferents (ALOGPS i ChemAxon) com el logD a pH 7,4 es van constatar una major hidrofobicitat en aquells compostos més antileucèmics. Aquesta hidrofobicitat i permeabilitat de membrana associada és un prerrequisit per als mecanismes d'atrapament iònic, fet que encaixa amb l'expansió del volum lisosomal. També en relació a la polaritat, es pot observar com els no-ANHA mostren valors de TPSA més elevats, indicant que la seva estructura conté una fracció polar més alta. En aquest paràmetre, però, es van observar discrepàncies entre ANHAs i antileucèmics moderats; els segons amb valors més baixos de TPSA, i també de pes molecular. Aquesta diferència probablement es relacioni amb el fet que són molècules més petites i amb una amfifilicitat menys evident, que podria estar relacionada amb el seu menor efecte. Quant als pKas àcids, la comparació va palesar com els no-ANHA tenen grups àcids fàcilment ionitzables, mentre que aquells fàrmacs amb alguna capacitat antileucèmica tenen pKas àcids de valors molt més alts.

Per últim, es va establir una comparació química en el context que es vol estudiar. Com s'ha exposat a la introducció, es considera que la hidrofobicitat en ella mateixa no és el factor més rellevant per a l'acumulació lisosomal de compostos; ho és la hidrofobicitat diferencial al citoplasma i al lisosoma. Mitjançant un predictor de logD (de ChemAxon) es va calcular la ratio de logD a pH 7 (pH aproximat del citosol) i a pH 4 o 5 (pH aproximat del

lisosoma). Com es pot veure, els no-ANHA mostren tots valors molt propers a 1, indicant que la seva hidrofobicitat és la mateixa a ambdós compartiments, mentre que en la resta s'observen (amb una excepció, loratadina) valors superiors a 1, indicant una major hidrofobicitat al citosol respecte al lisosoma, atesa la protonació en medi àcid.

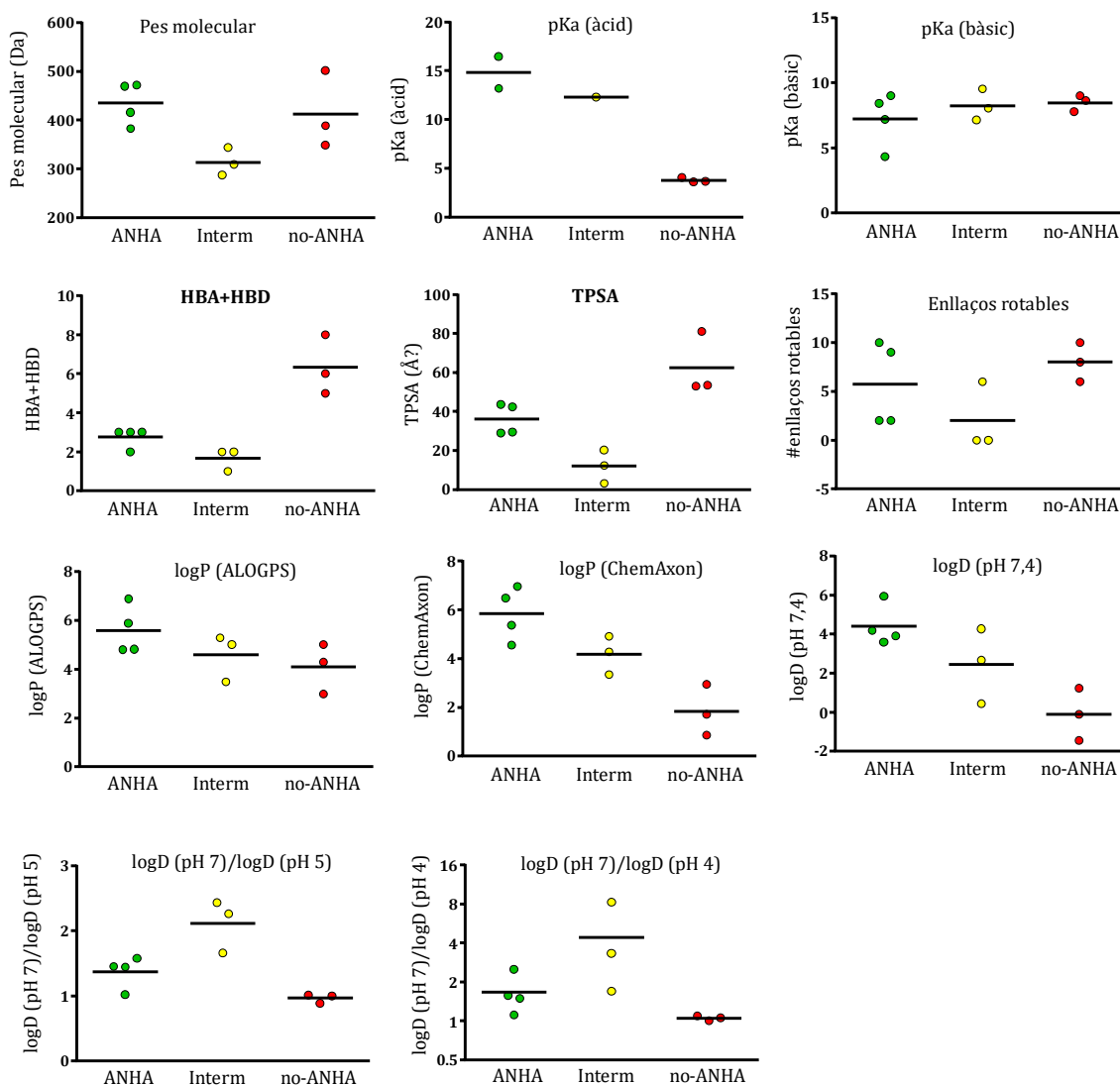


Figura 58. Agrupació de propietats fisicoquímiques dels antihistamítics segons els seus efectes antileucèmics. Es van agrupar els antihistamítics segons tinguessin efectes antileucèmics potents a 10 μM (ANHA), efectes antileucèmics a concentracions més altes (interm) o cap efecte antileucèmic (no-ANHA). HBA, número d'acceptors d'enllaços d'hidrogen; HBD, número de donadors d'enllaços d'hidrogen; TPSA, àrea topològica de la superfície polar. Les dades de logD a pHs 4, 5 i 7 es van obtenir del simulador *LogD Predictor* (ChemAxon).

En vista de la identificació com a paràmetre d'interès del logP, es va voler establir si existia una relació entre aquest valor i la EC_{50} observada en línies de LMA. La Figura 59 mostra com, efectivament, aquesta relació existia i era significativa, subratllant la importància de la hidrofobicitat.

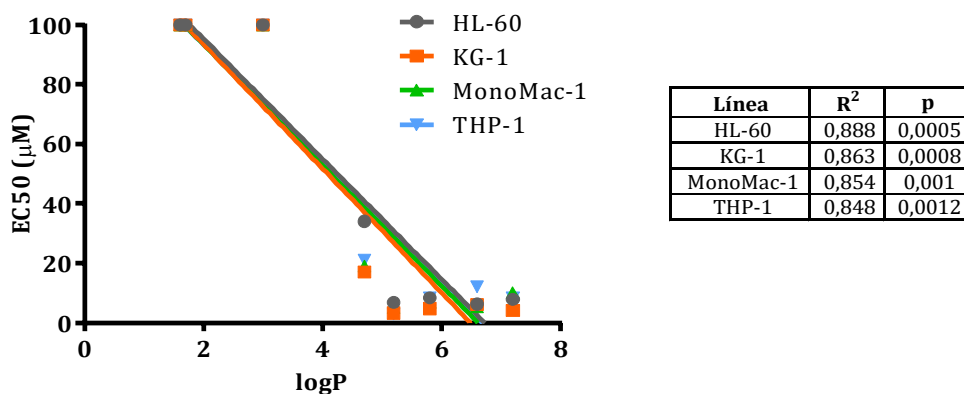


Figura 59. El logP dels antihistamínics es correlaciona amb el seu efecte antileucèmic. Es van relacionar per regressió lineal valors de logP dels antihistamínics i la seva EC50 en 4 línies cel·lulars de LMA. Per a antihistamínics sense efecte antileucèmic fins i tot a altes concentracions, es van emprar valors de 100 µM. A la taula es mostren valors rellevants de la regressió lineal realitzada amb cada línia.

Un cop establertes totes aquestes relacions, es van representar conjuntament els valors de logD a pH7,4 i de TPSA (Figura 60). S'ha proposat que un compost, per creuar membranes per difusió passiva ha de complir com a mínim el requisit de $TPSA < 75 \text{ \AA}^2$ i $\log D_{7,4} > 0$ (Camenisch, Alsenz et al. 1998; Zhu, Jiang et al. 2002; Liu, Tu et al. 2004; Pham-The, Gonzalez-Alvarez et al. 2013). A la representació es va delimitar l'àrea d'aquests dos requisits i es va constatar com, d'una banda, tots els compostos amb alguna activitat antileucèmica complien els requisits, mentre que cap dels no antileucèmics ho feia. A més a més, aquesta representació va presentar una agrupació diferencial entre els ANHA i els antihistamínics amb efectes a concentracions més altes; concretament, els primers tendeixen a tenir logD i TPSA més alts.

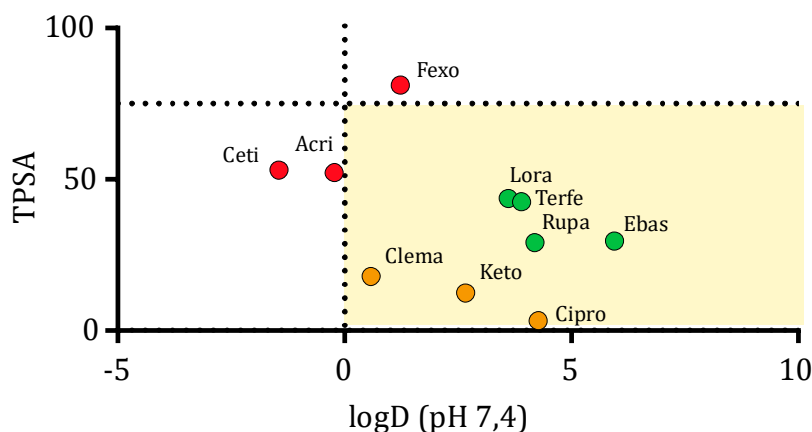


Figura 60. Els ANHA tenen valors de logD alts i valors de TPSA intermedis. Es van agrupar els antihistamínics segons tinguessin efectes antileucèmics potents a 10 µM (ANHA, verd), efectes antileucèmics a concentracions més altes (taronja) o cap efecte antileucèmic (no-ANHA, vermell) i se'n van representar logD a pH 7,4 i TPSA (en Å²). L'àrea acolorida representa un rang d'interès que es descriu al text.

Com a últim estudi d'aquestes propietats, es va realitzar un anàlisi de *clustering* no supervisat dels antihistamítics a partir de diverses característiques fisicoquímiques (cLogP ALOGPS, TPSA, logD, logS, càrrega fisiològica, número de donadors d'enllaços d'hidrogen, número d'acceptors d'enllaços d'hidrogen, cLogP Chemaxon, número d'àtoms de nitrogen i d'oxigen). L'anàlisi va lliurar una agrupació dels compostos segons aquesta propietat idèntica a l'agrupació que hauríem establert per als seus efectes antileucèmics (Figura 61A). A més, un anàlisi de components principals amb els mateixos paràmetres va mostrar de nou una agrupació clara (Figura 61B). Totes aquestes dades acaben de validar la nostra idea que les propietats fisicoquímiques expliquen en gran mesura les diferents propietats antileucèmiques dels antihistamítics.

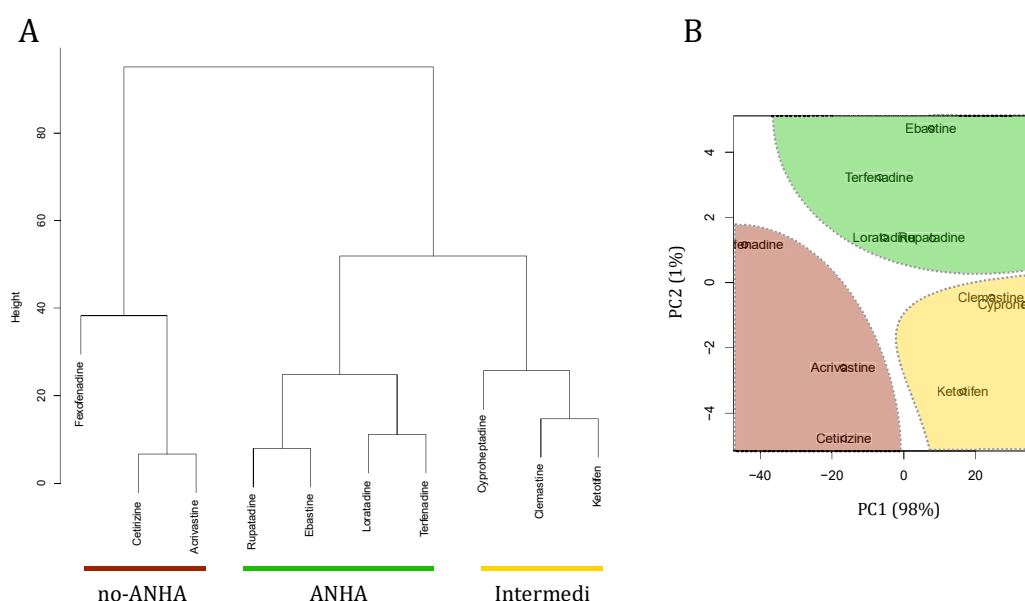


Figura 61. L'agrupament de fàrmacs per característiques fisicoquímiques coincideix amb els efectes antileucèmics. **A.** Es va realitzar un anàlisi de *clustering* jeràrquic a partir dels següents paràmetres dels diferents antihistamítics: cLogP ALOGPS, TPSA, logD, logS, càrrega fisiològica, número de donadors d'enllaços d'hidrogen, número d'acceptors d'enllaços d'hidrogen, cLogP Chemaxon, número d'àtoms de nitrogen i d'oxigen. Se'n mostra el dendrograma, amb els grups antileucèmics coincidents **B.** Es va realitzar un PCA amb les mateixes dades. Diferents colors mostren zones associades a diferents grups d'acció antileucèmica: no-ANHA (vermell), ANHA (verd) i fàrmacs intermedis (groc).

Després de tots els anàlisis anteriors, l'observació directa de l'estructura de les molècules estudiades (Figura 62) va permetre una nova interpretació. A nivell químic podem dir que els no-ANHA són compostos que, malgrat posseir una part hidròfoba, es troben carregats a pH fisiològic (generalment mostrant una forma zwitteriònica amb una càrrega total neutra fruit d'una càrrega positiva i una negativa) i són, per tant, mals candidats al creuament de membranes. La resta de compostos són més hidròfobs i més aptes per creuar membranes, si bé alguns és probable que es trobin en part protonats a pH fisiològic. Aquestes

característiques permetrien d'una banda l'atrapament iònic als lisosomes i de l'altra l'entrada d'espècies catióniques al mitocondri, considerant sempre els equilibris químics.

D'altra banda, si comparem els tres fàrmacs amb efectes a concentracions altes, veiem com, a diferència dels ANHA, són més petits i menys amfifílics, característica que s'ha definit com a fonamental per a l'acumulació en lisosomes (Logan, Kong et al. 2014). En definitiva, propietats fisicoquímiques han resultat ser explicatives dels efectes antileucèmics.

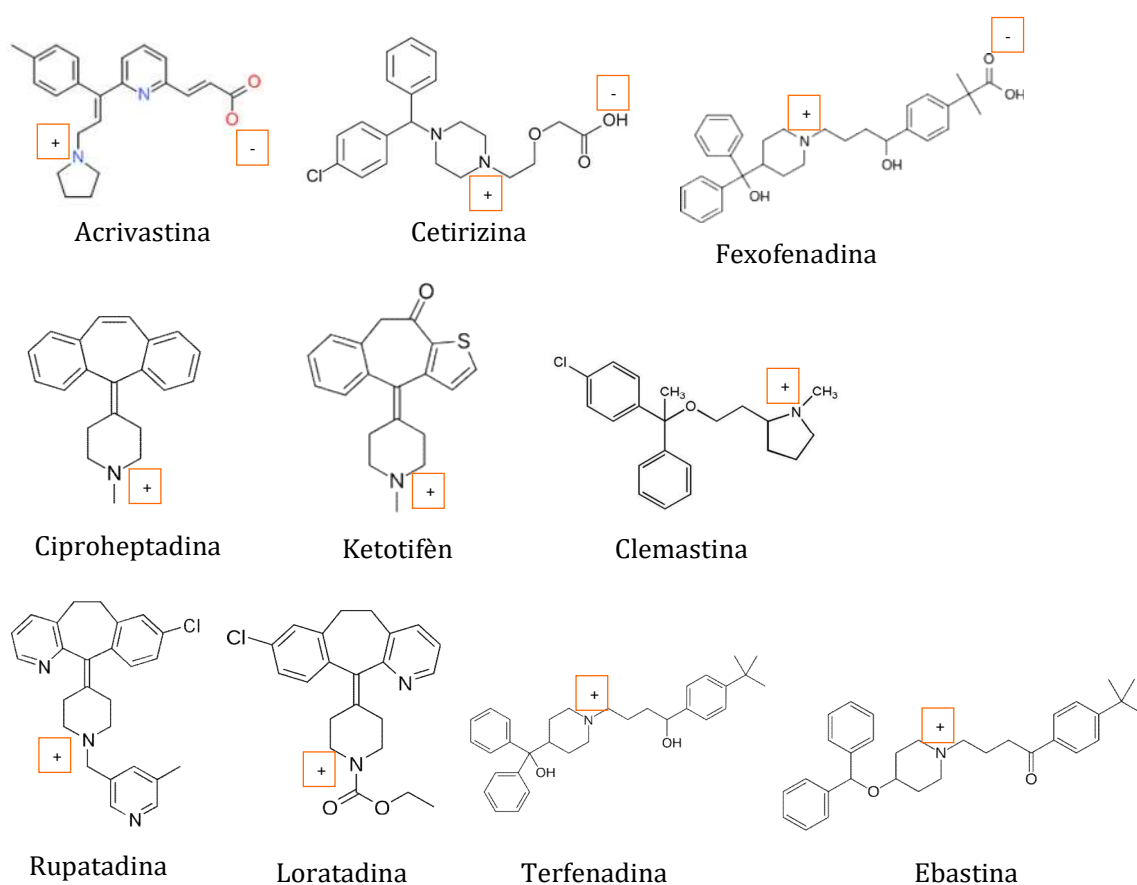


Figura 62. Estructura química dels antihistamínics estudiats. Els requadres taronges indiquen els àtoms fàcilment ionitzables.

4.4.10. Estudi de nous compostos

En aquest punt, es coneixen les línies generals del mecanisme d'acció dels ANHAs, i se n'han descrit característiques fisicoquímiques relacionades. Abans d'aquests coneixements, però, i a partir de les dades sobre l'activitat diferencial de 10 antihistamínics diferents, l'empresa *Chemotargets* va realitzar *in silico* un anàlisi per identificar fàrmacs existents que poguessin induir efectes similars als ANHA. En aquesta anàlisi es van identificar pimetixè (antagonista de receptors de serotonina i histamina), nordoxepina (antidepressiu tricíclic), pizotifèn (antagonista de receptors de serotonina i

histamina) i 3-CPMT (inhibidor de la recaptació de dopamina) i es van proposar 120 compostos orgànics més que havien de permetre l'obtenció de molècules amb millors perfils farmacològics.

En aquest estudi quimioinformàtic, es van buscar compostos possiblement antileucèmics en dues bases de dades químiques; d'una banda, una que conté en conjunt de catàlegs de proveïdors químics (fins a 12 milions de molècules) i de l'altra una base de dades confeccionada per la mateixa *Chemotargets* que conté 12.131 fàrmacs o candidats a fàrmacs. En primer lloc, van dur a terme un cribratge per semblança per seleccionar totes les molècules amb un bon grau de similitud química (valor de tall=0,77) amb algun dels antihistamínics antileucèmics sense tenir el mateix esquelet exacte. Aleshores, les molècules seleccionades es van processar a través de 30 models discriminants de descriptors químics (2), combinacions de descriptors (12), dianes (1) i combinacions de descriptor-diana (15) que s'havien generat durant la recerca de dianes, obtenint les molècules i fàrmacs prèviament descrits.

Al moment de dipositar aquesta tesi, s'havien testat a la línia cel·lular de LMA HL-60 un total de 50 compostos sorgits de l'estudi per part de *Chemotargets*, estudiant els efectes citotòxics a 10 μ M a les 48h. Dels 50 testats, 27 van induir algun efecte citotòxic, 8 dels quals de més del 25% i 5 d'aquests de més del 50% (Figura 63A). Un d'aquests compostos va induir un efecte citotòxic del 100 % i, interessantment, mostrava una estructura amb un cap hidrofòbic més rígid i gran que els ANHA prèviament estudiats, una amina protonable, i una cadena alifàtica que separava ambdues parts funcionals. Aquesta troballa anava en la línia d'observacions anteriors i suposarà un punt de partida per a l'obtenció de nous compostos més efectius o efectius a concentracions més baixes, amb propietats més atractives i sense protecció intel·lectual. Quan es va relacionar l'efecte d'aquests nous compostos amb la seva hidrofobicitat definida com a logP, es va observar una associació significativa però feble, amb una tendència a una major citotoxicitat a majors valors de logP.

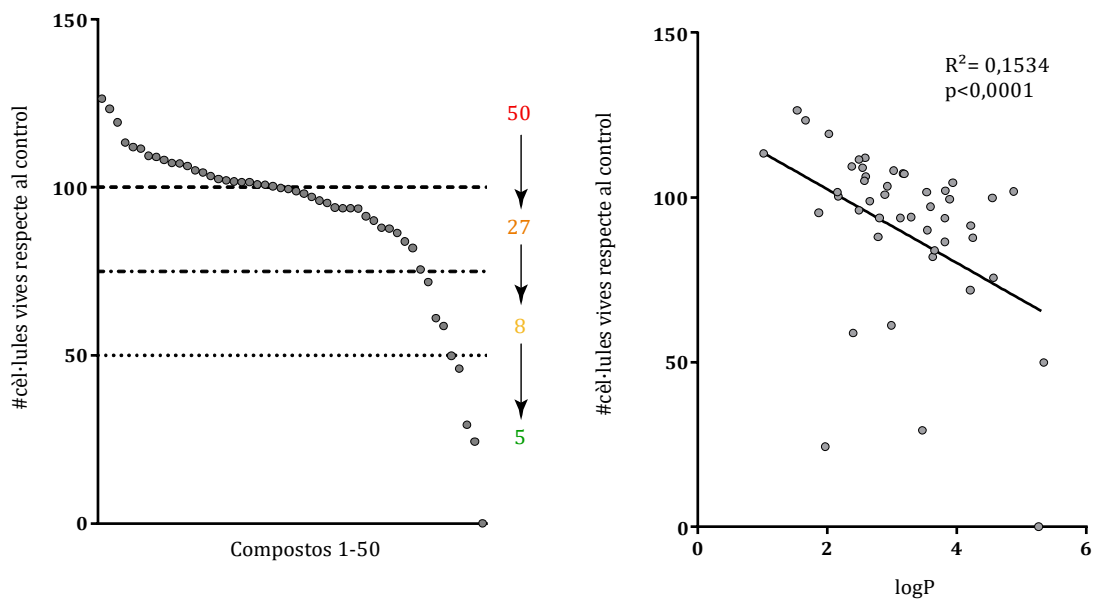


Figura 63. El cribratge identifica diversos compostos d'interès. Es van tractar cèl·lules HL-60 48 h amb els compostos proposats per al cribratge a 10 μM , i se'n va analitzar la viabilitat. **A.** Cada punt representa la mitjana de triplicats de dos experiments independents amb cada compost. **B.** Es representa l'efecte de cada compost sobre la viabilitat en relació al seu logP (valors calculats proporcionats pel proveïdor). Es van relacionar els paràmetres mitjançant una regressió lineal, de la qual es mostren els valors de p i de R^2 .

Per una anàlisi en una mica més de profunditat de les propietats fisicoquímiques dels nous compostos amb activitat antileucèmica, es van representar el logP contra el TPSA, observant-se la semblança en aquests paràmetres d'ebastina amb el compost més actiu. Pel que fa a la resta, no s'observa un patró clar.

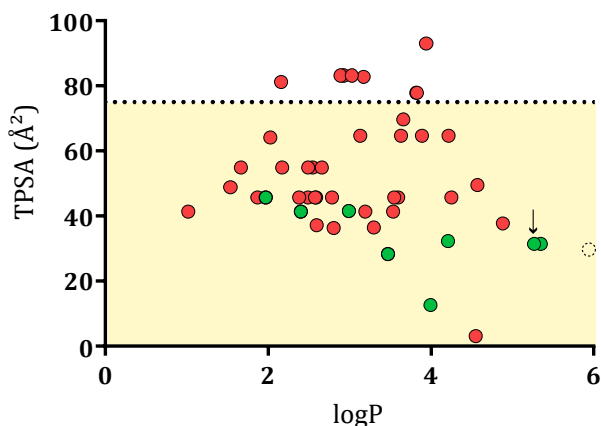


Figura 64. Representació dels compostos del cribratge segons logP i TPSA. Es van representar el logP i el TPSA (en Å^2) dels nous compostos. En verd es mostren els compostos amb activitat citotòxica $>50\%$ a 10 μM en HL-60, i en vermell els $<50\%$. El punt sense omplir representa ebastina, com a punt de referència. La fletxa assenjala el compost més citotòxic. L'àrea acolorida representa un rang d'interès que es descriu al text.

En definitiva, s'ha posat la primera pedra per a la recerca de nous compostos i s'ha posat l'accent de nou en la rellevància de les propietats fisicoquímiques.

5. Discussió

Al llarg de la present tesi s'ha descrit com un grup d'antihistamínics, que hem anomenat antihistamínics antineoplàsics o ANHA, presenten efectes antileucèmics selectius i independents del receptor d'histamina 1, estudiats en profunditat en leucèmia mieloide aguda (LMA). Aquests efectes s'han pogut relacionar amb l'acumulació en lisosomes i mitocondris explicada parcialment per característiques fisicoquímiques de les molècules.

El sistema histaminèrgic en neoplàsies hematològiques

Des que Kahlson formulés inicialment una hipòtesi segons la qual la histamina seria un mediador de gran importància per al creixement cel·lular (Kahlson, Rosengren et al. 1958), múltiples grups de recerca han estudiat el rol de la histamina i els seus receptors en diferents tipus de càncer, sense que a dia d'avui s'hagi pogut aclarir del tot la seva rellevància (Cianchi, Vinci et al. 2008). Així, s'han observat efectes contradictoris de la histamina i resultats molt diversos en analitzar cadascun dels 4 receptors en cèl·lules tumorals, presentant-se tant en nivells més alts com més baixos en cèl·lules de diferents tumors respecte a les seves equivalents sanes (Faustino-Rocha, Ferreira et al. 2017). Quant al grup de càncers estudiats al grup de recerca, les neoplàsies hematològiques, el sistema histaminèrgic ha estat poc estudiat, amb un article assenyalant a l'efecte proliferatiu d'histamina en LLA (Malaviya i Uckun 2000), un altre descrivint la sobreproducció d'histamina en LMC (Aichberger, Mayerhofer et al. 2006) i diversos treballs apuntant a l'efecte de la histamina rebaixant la immunosupressió causada per cèl·lules mieloides immadures a través del receptor HRH2 (Monczor, Copsel et al. 2017). Aquest darrer efecte de la histamina, que ha demostrat clínicament reduir les recaigudes en pacients (Brune, Castaigne et al. 2006), s'emmarca dins el seu paper immunoregulador estimulant el sistema immune a través de HRH1 i disminuint la formació de ROS en monòcits, neutròfils i cèl·lules de LMA monocítica o mielomonocítica a través de HRH2 (Monczor, Copsel et al. 2017).

Al grup on s'ha realitzat el present treball i en d'altres, a més, s'havia constatat prèviament la rellevància de l'expressió de receptors de serotonina i dopamina en neoplàsies hematològiques (Sachlos, Risueno et al. 2012; Etxabe, Lara-Castillo et al. 2017); receptors acoblats a proteïnes G heterotrimèriques amb moltes semblances fisiològiques i connexió amb els receptors d'histamina. Amb aquests precedents i després d'identificar alguns antihistamínics com a potencials antileucèmics, aquest projecte es va proposar abordar l'estudi de diferents aspectes del sistema histaminèrgic en neoplàsies hematològiques, particularment LMA, i així afegir una peça més al trencaclosques histamina-càncer. Als

nostres estudis hem constatat l'expressió de HRH1 en cèl·lules de neoplàsies mieloides, observada en cèl·lules mieloides sanes a nivells similars, mentre que no s'ha detectat en cèl·lules de llinatge T tant sanes com neoplàsiques. A més, no hem detectat diferències proliferatives en cèl·lules de LMA tractades amb histamina.

Pel que fa a l'expressió de receptors d'histamina en línies de LMA, s'ha observat expressió majoritària de HRH1 i HRH2, sense poder-se detectar HRH3 ni HRH4. L'expressió de HRH2 en LMA no és una novetat, sinó que és consistent amb estudis previs on s'ha demostrat la seva presència en monòcits i cèl·lules de LMA, que s'ha explotat per a disminuir els nivells de ROS generats per blasts immadurs (Monczor, Copsel et al. 2017). Quant a l'expressió del receptor HRH1, que hem estudiat més a fons, tant en línies cel·lulars com en mostres primàries, es pot dir que la seva presència en superfície presenta una estreta connexió amb la diferenciació en diferents llinatges; té una alta expressió en cèl·lules mieloides, variable en cèl·lules B i nul·la en cèl·lules T, tant neoplàsiques com sanes. En cèl·lules T sanes s'havia descrit prèviament la rellevància funcional de HRH1, però només s'havia estudiat en els subgrups de cèl·lules Th1 i Th2 (Jutel, Akdis et al. 2009) fet que podria explicar la discrepància amb els nostres resultats, en haver analitzat el global de cèl·lules CD3+.

L'alta expressió de HRH1 observada en cèl·lules neoplàsiques mieloides (LMA, LMC, LMMC, SMD) atenent-nos al conjunt de dades obtingudes no sembla que estigui relacionada amb el desenvolupament d'un rol fonamental en la fisiologia tumoral, sinó que més aviat seria un reflex del seu origen o estat de diferenciació. Donant suport a aquesta concepció, les cèl·lules de LMMC, que presenten característiques de llinatge monocític, tenen una expressió homogènia i alta de HRH1, molt similar a la de les cèl·lules CD14+ sanes. D'altra banda, les cèl·lules de SMD i LMA, que presenten una alta heterogeneïtat en termes de diferenciació, mostren una expressió també heterogènia de HRH1. Aquesta heterogeneïtat no es correspon amb diferents graus de risc de SMD, i no sembla doncs rellevant per a la transformació a LMA. En canvi, en LMA l'expressió disminueix en augmentar el risc, però, malgrat semblar a priori contradictori amb la manca de rellevància del receptor, encaixa del tot amb la relació amb la diferenciació; les cèl·lules leucèmiques més indiferenciades s'associen a un pitjor pronòstic dels pacients (Gentles, Plevritis et al. 2010; Eppert, Takenaka et al. 2011). Per tant, les cèl·lules de pacients amb risc favorable presenten en general un major grau de diferenciació i, conseqüentment, també un major expressió de HRH1. Per reblar el clau, les dades dels repositoris han

mostrat també com l'expressió de HRH1 és molt heterogènia fins i tot dins dels subgrups de LMA i com aquesta no es relaciona amb la supervivència dels pacients.

Si bé és, fins on arriba el nostre coneixement, la primera vegada que es descriu l'expressió de HRH1 en superfície en LMA, en altres tumors s'ha observat prèviament expressió del receptor a nivells iguals o inferiors que en els seus equivalents sans, en alguns casos sense mostrar-se conseqüències fisiològiques d'aquest com en el nostre cas (Lemos, Davio et al. 1995; Cricco, Martin et al. 2000; Molnar, Cricco et al. 2001; Boer, Helinger et al. 2008). En definitiva, HRH1 és un receptor expressat de manera normal en algunes cèl·lules hematopoètiques, especialment les mieloides, i aquesta expressió es manté després de la transformació o es perd paral·lelament al bloqueig en la diferenciació.

Ampliant el focus a tot el sistema histaminèrgic, si bé els estudis funcionals en la seva majoria han fracassat i per tant no permeten una discussió en profunditat, les poques dades obtingudes apunten també a la poca importància del sistema en LMA. Si bé caldria estudiar la proliferació a llarg termini amb el tractament amb histamina i amb models més fidedignes, el fet que altes concentracions d'histamina no modifiquin la proliferació a 72h fa pensar que no es tracta d'un mediador potent, contràriament al que s'ha observat en d'altres neoplàsies (Rivera, Cricco et al. 2000). Tampoc la inhibició dels receptors d'histamina afecta la viabilitat cel·lular, atès que només antagonistes del receptor HRH1 tenen efectes antileucèmics, i aquests no estan mitjançats pel receptor, en línia amb observacions fetes en LMC (Aichberger, Mayerhofer et al. 2006) i contràriament al que s'ha suggerit en altres tumors (Faustino-Rocha, Ferreira et al. 2017). Totes aquestes observacions, a més, poden relacionar-se amb l'ús d'histamina com a tractament de consolidació en LMA; si bé la histamina produeix la seva acció anti-immunosupressora a través del receptor HRH2, si la histamina actués afavorint la proliferació probablement no s'observaria una disminució en les recaigudes. Així, a grans trets, les nostres dades no involucren la histamina ni els seus receptors en la patofisiologia dels blasts leucèmics, tot i que s'estan actualment duent a terme estudis per elucidar-ho.

Les dades de tot aquest bloc han de ser agafades amb prudència, en comptar amb poques mostres i no haver resultat possible l'estudi funcional de HRH1, que serà objecte de futurs projectes. De ben segur, no només estudis del nostre laboratori inspeccionaran encara més el sistema histaminèrgic, sinó que la investigació del seu paper al sistema hematopoètic sa des del camp de la immunologia encara haurà d'aportar molta més llum. Sorprenentment, malgrat el centenar d'anys que han passat des que es descobrí la histamina, encara manca

un abordatge integral del seu paper en les cèl·lules sanguínies, més enllà de la seva síntesi i rol en alguns tipus cel·lulars. Malgrat la prudència i a l'espera de futurs estudis, les dades acumulades per nosaltres i per d'altres indiquen en conjunt que el sistema histaminèrgic no és una peça clau de la patofisiologia dels blasts leucèmics, i la seva expressió en aquestes és sols un reflex del seu estat de diferenciació. A més, HRH1 no sembla una diana útil per a atacar les cèl·lules leucèmiques.

Reposicionament d'ANHAs

La leucèmia mieloide aguda és, malgrat els avenços, una malaltia de mal pronòstic; si bé un percentatge important de pacients responen inicialment al tractament, la majoria sucumbirà a recaigudes letals (Döhner, Weisdorf et al. 2015). Les darreres dècades ha augmentat molt el nostre coneixement sobre la base biològica de la malaltia quant a alteracions genètiques i quant a mecanismes subjacents a l'heterogeneïtat tumoral, amb la identificació de cèl·lules mare del càncer responsables de les recaigudes. Aquest coneixement, en canvi, no s'ha traduït en canvis rellevants als tractaments, que han patit poques modificacions de fons i es segueixen basant en quimioteràpia intensiva. De fet, es considera que les millores en la supervivència no es deuen a l'aparició de tractaments innovadors sinó a la millora i optimització de la quimioteràpia, el suport hospitalari i els trasplantaments (Dombret i Gardin 2016). Malgrat recentment s'han presentat encara noves optimitzacions de la quimioteràpia (Talati i Lancet 2018), que de ben segur seran útils per a l'augment de l'esperança de vida dels pacients, probablement després de 40 anys d'optimització ens trobem al límit del rendiment que es pot extreure dels tractaments actuals. 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, s'ha descrit un reguitzell d'agents innovadors amb activitat preclínica i s'ha treballat en el desenvolupament de teràpies dirigides. Molts d'aquests treballs han culminat en assaigs clínics, la majoria dels quals han fracassat i una petita part dels quals han entrat recentment a la pràctica clínica, com enasidenib (Stein i Tallman 2016). 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'òrgànuls sencers, la funció dels quals es troba alterada en càncer (Sakhrani i Padh 2013). Malgrat es tracti d'estratègies noves i innovadores, el coneixement del tropisme de certes molècules petites a òrgànuls específics no és nova sinó que es remunta al segle passat; aquest coneixement no s'havia intentat traslladar a la clínica davant la concepció que seria impossible un efecte selectiu

antitumoral, en constar les cèl·lules sanes i neoplàsiques dels mateixos orgànuls. No ha estat fins la descripció de les alteracions dels compartiments cel·lulars en càncer que aquesta estratègia no ha agafat embranzida, inicialment en altres tipus de tumor (revisat a Sakhrani i Padh 2013) i el darrer lustre també en LMA. Concretament, s'ha descrit l'efecte selectiu antileucèmic de fàrmacs que afecten la funció general lisosomal (Sukhai, Prabha et al. 2013) i mitocondrial (Lee, Angka et al. 2015). Es tracta, doncs, d'un camp molt poc explorat i amb moltes preguntes per respondre abans de ser aplicat a la clínica: manca un coneixement profund sobre les diferències dels compartiments cel·lulars de les cèl·lules hematopoètiques sanes i neoplàsiques i manquen estudis de tropisme a orgànuls. Els estudis realitzats fins ara, no només en LMA sinó en d'altres neoplàsies, s'han focalitzat majoritàriament en un o altre compartiment sense establir una visió global de la distribució subcel·lular i els seus efectes. En aquest sentit, malgrat no ser l'objectiu inicial de la tesi, s'han analitzat efectes simultanis d'un grup de fàrmacs sobre lisosomes i mitocondris.

En base als precedents d'altres grups de recerca i les observacions realitzades durant el treball experimental del present estudi, es proposa l'efecte selectiu antileucèmic dels ANHA seguint el següent model (Figura 66):

Els ANHA, compostos hidròfobs, amfifílics i amb una amina protonable presenten un equilibri entre la seva forma protonada, incapaç de creuar membranes, i la seva forma neutra, que les creua lliurement (Goldman, Funk et al. 2009). Aquest equilibri és diferencial al citoplasma respecte als mitocondris i lisosomes atesos els gradients de pH i electroquímics; l'equilibri es desplaça a formes impermeables a l'interior dels orgànuls fent que s'hi acumulin i n'alterin l'homeòstasi (Kuzu, Toprak et al. 2017; Teixeira, Amorim et al. 2018). Aquesta alteració duu a un augment de superòxid mitocondrial, una activació de caspases, i a una permeabilització de la membrana lisosomal; tots tres, processos que condueixen eventualment a la mort cel·lular (Jezek, Cooper et al. 2018; Serrano-Puebla i Boya 2018). Aquestes alteracions afecten preferentment les cèl·lules leucèmiques atesos d'una banda els majors gradients de pH i electroquímics i de l'altra la major fragilitat dels seus lisosomes i el major nivell basal de superòxid mitocondrial (Sukhai, Prabha et al. 2013; Moloney, Stanicka et al. 2017).

Efectivament, en aquesta tesi s'han observat els efectes antileucèmics de terfenadina, loratadina, rupatadina i ebastina en línies cel·lulars de LMA i d'altres neoplàsies hematològiques al rang micromolar baix, contràriament a altres antihistamínics com fexofenadina, acrivastina o cetirizina, que no indueixen la mort cel·lular. Aquesta mort,

que es produeix fins i tot en presència d'estroma, va acompanyada d'una diferenciació mieloide, i una disminució de la capacitat clonogènica. La seva acció a més, s'ha mostrat sinèrgica amb citarabina. Els efectes citotòxics s'han observat igualment en mostres de pacients de LMA, si bé en un grau menor, i s'ha constatat l'efecte selectiu, en observar-se efectes molt més moderats en cèl·lules sanes. Estudis *in vivo* per injecció intraperitoneal del fàrmac han mostrat la poca eficàcia d'aquest tractament, que haurà de ser optimitzat. En canvi, a nivell d'empelt de cèl·lules primàries tractades amb ANHA, es produeix de nou un efecte selectiu envers l'empelt de cèl·lules leucèmiques, que no regeneren la malaltia en ser tractades amb ebastina. En estudiar els mecanismes antileucèmics, s'ha descartat la relació amb els receptors d'histamina, serotonina 1A i muscarínics. En canvi, s'ha observat una relació entre l'efecte antileucèmic i les propietats fisicoquímiques dels fàrmacs, particularment l'alta hidrofobicitat, que s'ha lligat amb l'acumulació a lisosomes i mitocondris. Quant als lisosomes, s'ha observat un augment del compartiment lisosomal i una permeabilització dels orgànuls; quant als mitocondris, un augment de superòxid mitocondrial, una disminució del potencial de membrana i una activació de caspases. Aquests efectes van acompanyats d'un augment en el compartiment autofàgic i a nivell temporal s'observa l'augment de superòxid molt inicial i una alteració lisosomal i de caspases força paral·lela. A partir d'aquest coneixement, s'han estudiat un grup de compostos per millorar els ANHA, i s'ha identificat un compost igualment potent i amb característiques fisicoquímiques semblants.

Abans d'entrar en consideracions sobre el mecanisme, cal discutir l'efectivitat mateixa dels fàrmacs estudiats. Com hem detallat, dels deu antihistamínics testats només 4 han mostrat activitat antileucèmica en línies cel·lulars a 10 μM . A la literatura, molts membres del grup farmacològic d'antihistamínics han estat testats en diferents tipus de càncer en múltiples estudis previs (resumits a la Taula 3), que també han palesat efectes antitumorals d'alguns d'ells, en especial terfenadina. En paral·lel, els esforços de l'Institut Nacional del Càncer dels EEUU (NCI) per testar fàrmacs en un panell de 60 línies cel·lulars (NCI-60) han mostrat també efectes d'alguns antihistamínics (Shoemaker 2006). Per totes dues vies queda clar ja abans dels nostres resultats que es tracta d'una família farmacològica amb membres amb propietats antitumorals i d'altres membres que no tenen efectes fins i tot a altres concentracions. La majoria d'estudis previs descriuen els efectes d'un sol antihistamínic, però aquells que descriuen efectes de diversos d'ells sobre el mateix tipus de tumor fan observacions similars a les nostres. Així, en LMC loratadina i terfenadina inhibeixen el creixement cel·lular (Aichberger, Mayerhofer et al. 2006), contràriament a fexofenadina, i en càncer de pulmó ebastina, loratadina i terfenadina indueixen la mort

cel·lular, contràriament a fexofenadina i cetirizina (Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016), suggerint que es tracta de mecanismes pan-tumorals i independents d'acció antihistamínica. La majoria d'estudis que descriuen efectes antitumorals d'un sol antihistamínic, a més, s'han realitzat amb loratadina, astemizole o terfenadina, mentre que no existeixen precedents a la literatura dels efectes citotòxics de fexofenadina, acrivastina o cetirizina (Taula 3), reforçant encara més els nostres postulats. Això fa pensar, a més, en l'existència de biaixos de publicació: probablement algun dels grups que ha descrit efectes d'antihistamínics ha testat algun no-ANHA però no en tenim coneixement perquè no s'ha publicat en no tenir efecte. Així, per bé que s'havia descrit el potencial antitumoral d'alguns antihistamínics, és la primera vegada que es descriuen els diferents efectes d'un grup tan ampli d'antihistamínics en un grup tan ampli de línies cel·lulars de neoplàsies hematològiques.

Aquest efecte citotòxic dels ANHA sobre línies cel·lulars de LMA va acompanyat d'una disminució en la proliferació cel·lular i la capacitat d'autorenovació. Aquestes observacions ens donen la idea que els ANHA permeten efectes més enllà d'una citotoxicitat puntual i poden exercir-ne a més llarg termini, efectes interessants de cara al desenvolupament de tractaments per a la LMA, una malaltia en què volem atacar tant la població molt proliferativa com la població més primitiva amb alta capacitat d'autorenovació. A més, en estreta relació amb els efectes sobre la proliferació i l'autorenovació, s'ha demostrat una inducció de la diferenciació mieloide. Una de les característiques fonamentals dels blasts leucèmics és el bloqueig en la diferenciació (Pabst i Mueller 2007), i la inducció de la diferenciació terminal s'ha proposat com a estratègia terapèutica (Bruserud i Gjertsen 2000; Schlenk, Lubbert et al. 2016). En efecte, induint la diferenciació es contribueix a empènyer la balança autorenovació/diferenciació, del tot alterada en LMA (Lobo, Shimono et al. 2007) cap a la segona, conduint a l'exhauriment de la població més primitiva i afavorint, eventualment, la mort cel·lular, com ja s'ha descrit amb diversos compostos (Jin, Hope et al. 2006; Saito, Kitamura et al. 2010). En definitiva, aquest conjunt de resultats experimentals assenyalen a la mateixa direcció: els ANHA desplacen cèl·lules esbiaixades cap a la proliferació i l'autorenovació cap a un arrest del cicle cel·lular acompanyat de diferenciació terminal mieloide recuperant l'equilibri perdut en la leucemogènesi i exercint efectes a mitjà termini sobre la població total i la població primitiva. Resulta pràcticament impossible escatir la importància relativa de la diferenciació sobre els efectes antileucèmics observats, i encara no es disposa de cap pista sobre el mecanisme pel qual es produeix aquest fenomen. De tota manera, es tracta d'un possible cooperador a considerar.

Apropant l'experimentació amb línies cel·lulars a elements més realistes dels tractaments, s'han demostrat efectes en presència d'estroma i sinergisme amb citarabina. La resistència a tractaments mitjançada pel microambient medul·lar és un fenomen comú a molts tractaments antileucèmics, que en rebaixa l'eficàcia i que s'ha estudiat, entre d'altres, mitjançant el co-cultiu amb estroma (Garrido, Appelbaum et al. 2001). Resulta de gran interès que els nostres fàrmacs, contràriament a gran part de la quimioteràpia, siguin capaços de sobreposar-se a aquest fenomen, afavorint-ne l'efectivitat real. Encara més interessant resulta el sinergisme observat entre els ANHA i citarabina, considerant que no es tracta de cercar fàrmacs que puguin actuar com a monoteràpia sinó que, combinats amb quimioteràpia hi actuïn sinèrgicament i eradiquin amb eficàcia la malaltia. Això permetria potencialment disminuir les dosis de quimioteràpia i augmentar-ne conseqüentment la seguretat. Per analitzar el sinergisme, un concepte complex amb múltiples interpretacions i on no existeix un model de referència universal (Tang, Wennerberg et al. 2015), es van valorar els efectes segons dos models que realitzen assumpcions diferents d'additivisme (additivisme de Bliss, EOBA o additivisme de Loewe, index de combinació) (Bliss 1939; Loewe 1953; Berenbaum 1981; Chou i Talalay 1984; Greco, Bravo et al. 1995) i en ambdós casos s'ha mostrat la tendència al sinergisme. En el cas d'ebastina, a més, s'ha constatat la seva capacitat d'eliminar cèl·lules que havien resistit a altes concentracions de citarabina.

Aquests efectes van en la línia del que s'ha descrit en altres tipus de tumor: en càncer de pulmó els ANHA sensibilitzen a la mort induïda per vinorelbina i afecten cèl·lules resistents a quimioteràpia (Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016) i en LCM la ciproheptadina actua sinèrgicament amb bortezomib (Paoluzzi, Scotto et al. 2009). És important remarcar que aquests efectes s'han demostrat sense una optimització a fons de la combinació, suggerint que hi ha marge per a efectes sinèrgics encara més potents. A més, serà interessant l'estudi del sinergisme terapèutic, és a dir, la comparació de les finestres terapèutiques dels agents separats amb la de la combinació (Kashif, Andersson et al. 2014).

Tots aquests efectes es veuen disminuïts als experiments amb mostres de pacients, en què s'observa una mort cel·lular a concentracions més altes i temps de tractament més llargs. Es mantenen, emperò, els efectes antileucèmics, particularment d'ebastina, que afecten la gran majoria de cèl·lules de LMA i d'altres neoplàsies, sense poder-se detectar cap relació amb els subtipus de la malaltia i reforçant així la noció que afectem mecanismes cel·lulars generals i no relacionats amb alteracions específiques. De nou s'ha demostrat per assaigs

de clonogenicitat la capacitat d'afectar l'autorenovació i per tant la població de cèl·lules més primitives. Per demostrar fefaentment l'afectació del compartiment de cèl·lules mare, cal, però, fer cas de la seva definició funcional com a cèl·lules capaces de regenerar la malaltia en ratolins immunodeprimits (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet i Dick 1997; Agliano, Martin-Padura et al. 2008). En aquest sentit, els experiments amb ratolins NSG mieloablacionats ens aporten una evidència de gran rellevància: ebastina abroga de manera pràcticament completa la regeneració de la LMA en mostres de tres pacients amb diferents alteracions però permet la regeneració de l'hematopoesi normal, per bé que aquesta es veu lleugerament afectada. Tots aquests experiments, en què s'ha fet ús de les tècniques *gold standard* del camp ens permeten afirmar que els efectes dels ANHA són selectius envers els blasts leucèmics i les cèl·lules mare leucèmiques, preservant majoritàriament l'hematopoesi sana i permetent la potencial administració de dosis en què la leucèmia es vegi afectada amb baixos efectes secundaris. D'entre els ANHA testats, ebastina i terfenadina han estat els que han mostrat efectes més potents. D'altra banda, al llarg de la resta del treball s'han invertit més esforços en l'estudi d'ebastina, atesa la seva major selectivitat i tenint en compte que terfenadina es troba retirat del mercat per efectes cardiotòxics (Simons i Simons 2011).

Com a darrer anàlisi de l'efectivitat dels ANHA, els estudis *in vivo* amb línies cel·lulars han mostrat efectes molt lleus, recordant-nos els reptes pendents i la dificultat que suposa conjurar les propietats farmacocinètiques i farmacodinàmiques amb els efectes farmacològics desitjats. Els ANHA són altaments hidrofòbics, fet que com hem vist és rellevant per a la seva acció antileucèmica. Aquesta hidrofobicitat, a més, contribueix al seu alt volum de distribució, que suposa una distribució preferent als teixits (Tillement 2000; Rodgers i Rowland 2006; Chan, De Bruyn et al. 2018), amb baixíssimes concentracions en plasma. Tots aquests elements, que a priori afavoririen l'efecte *in vivo*, topen amb dos problemes principals: d'una banda l'alta insolubilitat en aigua en dificulta l'administració per vies altres que preparacions orals en pastilles i de l'altra afavoreix un ràpid metabolisme (Liu, Kim et al. 2006; Antonijoan, Garcia-Gea et al. 2007; Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016). El primer element ens ha obligat a la injecció intraperitoneal d'estoc en DMSO diluït en salí, que no tenim coneixement de si assoleix concentracions rellevants a teixit. El ràpid metabolisme implica la degradació a compostos més polars i, per tant, menys efectius segons el nostre model. En seria un exemple fexofenadina, metabòlit actiu de la terfenadina, que no mostra cap mena d'activitat antileucèmica. Pot ser doncs que quan administrem aquests fàrmacs diluïts intraperitonealment no assoleixin una bona distribució, i el ràpid metabolisme a compostos inactius en dificultin

l'acció. 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*).

Quant als mecanismes i contràriament al que es va postular inicialment, s'ha descartat qualsevol efecte a través de la diana antial·lèrgica dels antihistamínics: actuen de manera independent a HRH1. Aquesta independència ja s'havia descrit per als efectes antitumorals d'alguns antihistamínics en CML, leucèmia mastocítica o càncer de pulmó (Aichberger, Mayerhofer et al. 2006; Hadzijusufovic, Peter et al. 2010; Ellegaard, Dehlendorff et al. 2016) i s'ha fonamentat en aquest treball en tres vies d'evidència principals i) hi ha una gran disparitat en els efectes dels diferents antihistamínics, que no es correspon amb diferències en l'afinitat pel receptor; antihistamínics com fexofenadina o cetirizina a 100 μM , com a agonistes inversos de HRH1 de segur produeixen un bloqueig complet del receptor (pK_i 7,6 i 8,2 respectivament) i en canvi no mostren cap tipus d'efecte antileucèmic ii) els ANHA són igualment efectius en cèl·lules amb expressió indetectable de HRH1 en superfície i en cèl·lules amb alts nivells de HRH1. Resulta inversemblant que els ANHA puguin induir la mort cel·lular a través de HRH1 en cèl·lules que no l'expressen. iii) altes concentracions d'histamina són incapaces de revertir els efectes antileucèmics dels ANHA, contràriament al que seria esperable si aquests actuessin mitjançant la seva unió i/o senyalització a través de HRH1.

Totes aquestes evidències, que de manera independent gaudirien ja d'un cert poder, quan s'analitzen en conjunt mostren una gran solidesa, que s'incrementa encara més gràcies a precedents en la literatura. Aquesta conclusió, que els ANHA són antileucèmics de manera independent de HRH1 ha estat probablement el punt d'inflexió principal del present treball. Expressant-ho en termes kuhnians, "*in science [...] novelty emerges only with difficulty, manifested by resistance, against a background provided by expectation*" (Kuhn 1970). I, efectivament, els efectes d'antihistamínics de segona generació amb alta afinitat per a HRH1 sobre cèl·lules de LMA que l'expressaven van fer pensar durant força temps en aquesta hipòtesi.

Seguint línies de raonament similar, s'han descartat com a diana els receptors muscarínics d'acetilcolina, el receptor de serotonina 1A i el canals de potassi de la família hERG (Kv11.1). L'evidència principal ha estat la manca d'efectes citotòxics del tractament amb altes concentracions d'inhibidors o antagonistes selectius de les dianes. D'entre aquestes dianes descartades la que comptava amb més precedents a la literatura eren els canals de

potassi hERG, expressats constitutivament en LMA (Pillozzi, Brizzi et al. 2002) i relacionats amb la progressió de les SMD (Lu, Du et al. 2016). No obstant, per bé que s'havia observat que algun compost que bloqueja aquests canals disminueix la proliferació de blasts de LMA, no s'ha demostrat que l'acció antileucèmica es produeixi a través d'aquesta diana (Banderali, Belke et al. 2011). Els nostres resultats al respecte, si bé limitats, no apunten a efectes antileucèmics potents d'afectar Kv11.1. En el cas dels receptors muscarínics, l'estudi dels quals en LMA no consta de precedents dels quals tinguem coneixement, a banda de les evidències de la poca activitat dels antagonistes específics i potents, la manca de reversió amb el tractament amb acetilcolina, de manera similar a histamina, va invalidar definitivament la diana. Per últim, en el receptor de serotonina 1A, estudiat amb profusió en treballs previs del laboratori (Etxabe, Lara-Castillo et al. 2017), partíem d'observacions que apuntaven a la seva poca idoneïtat com a diana, contràriament al receptor 1B. Si bé als estudis quimiinformàtics realitzats per *Chemotargets* es va predir la unió dels ANHA a aquest receptor, el fet que antagonistes específics no tinguin grans efectes i que els agonistes no reverteixin els efectes antileucèmics dels ANHA ens va fer cessar tota investigació amb ell.

Discutides l'efectivitat dels tractaments i descartades diverses dianes potencials, entrarem ara a discutir el model final proposat en base als resultats obtinguts i els precedents de la literatura.

La distribució subcel·lular de CADs ha estat estudiada en múltiples ocasions, centrant-se sobretot en l'acumulació en lisosomes causant de fosfolipidosi (Kodavanti i Mehendale 1990; Logan, Kong et al. 2014; Kuzu, Toprak et al. 2017; Scott, Ghosh et al. 2017). Quan han aparegut eines que n'han facilitat l'estudi s'ha observat, però, com el lisosomotropisme conviu amb el mitocondriotropisme al rang de concentracions i de temps en què s'ha treballat (Vater, Mockl et al. 2017). Les explicacions que s'han donat a aquestes observacions es sustenten, en darrer terme, en unes assumpcions molt assentades sobre la permeabilitat de les membranes biològiques. Concretament en molècules de les mides en què 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 (Yang i Hinner 2015). Aquestes característiques generals tenen, però, algunes excepcions, sobretot moviments a l'interior del mitocondri de cations, explicats per les seves particulars característiques electroquímiques (Horobin, Trapp et al. 2007).

Partint d'aquesta base es pot aplicar un altre nivell de complexitat, concretament els equilibris àcid-base i els gradients de pH cel·lulars. Teoritzant amb ebastina i fent ús del seu pKa predit i de l'equació de Henderson-Hasselbach, es pot calcular que a pH fisiològic es trobarà en la seva forma no protonada en un 9% (Figura 65). Si bé, doncs, es trobarà majoritàriament carregat, només la forma neutra podrà creuar la membrana plasmàtica i accedir al lumen cel·lular, produint-se un efecte d'arrossegament. Un cop dins la cèl·lula, de pH mitjà lleugerament més àcid, s'observaran efectes d'atrapament iònic principalment als lisosomes (99,97% protonat), però també als mitocondris (97,7% protonat) consistents en l'entrada d'ebastina al lisosoma i una sortida pràcticament nul·la. Als mitocondris, a més, espècies protonades a l'espai intermembranós podrien accedir a la matriu mitocondrial per gradient electroquímic, dissipant el potencial de membrana. Sigui com sigui, la distribució d'espècies protonades i no protonades recolza un atrapament iònic a lisosomes i mitocondris i encaixa, a més, amb els efectes observats en tots dos orgànuls. Ampliant aquestes nocions a la resta d'antihistamínics estudiats, els mecanismes d'acumulació tenen molt sentit considerant la coincidència entre propietats fisicoquímiques i funcionals constatada. Ja en termes d'hidrofobicitat a pH fisiològic (logD) s'han observat diferències importants: els ANHA són més hidròfobs i creuen membranes més fàcilment, i aquesta hidrofobicitat es veu molt reduïda en medi àcid. En altres paraules, els ANHA són CADs i mostren característiques clàssiques de fàrmacs lisosomòtrops, consistents amb l'expansió del volum descrita en aquesta tesi. També resulta rellevant tenir en compte les característiques amfifíliques, considerades imprescindibles per a la pertorbació de l'homeòstasi lisosomal induïda per agents lisosomòtrops, probablement per aspectes relacionats amb la intercalació a la membrana (Logan, Kong et al. 2014). En aquest sentit els ANHA mostren tots un mínim de tres carbonis entre el cap hidròfob i l'amina protonable.

Fonamentats d'aquesta manera el lisosomo- i mitocondriotropisme es poden explicar els efectes observats que duen eventualment a la mort cel·lular. Quant al lisosomotropisme, aquest es troba associat freqüentment a una expansió del volum lisosomal per entrada osmòtica d'aigua i d'altres mecanismes (Logan, Kong et al. 2014; Kuzu, Toprak et al. 2017), efecte que hem validat en línies cel·lulars: tenyint específicament el compartiment lisosomal n'hem constatat una gran expansió i l'aparició de vesícules de mida anormalment gran. L'acumulació lisosomal també es relaciona amb freqüència amb una alteració de l'estabilitat de la membrana, un augment temporal del pH, i una inhibició d'enzims com l'esfingomielinasa àcida, que poden conduir a una permeabilització de la membrana lisosomal.

En el cas dels ANHA no s'ha pogut demostrar el paper de l'esfingomielinasa àcida, i s'ha mostrat únicament un augment de la permeabilitat lisosomal, detectada per punts de galectina, una de les tècniques més acceptades (Aits, Kricker et al. 2015).

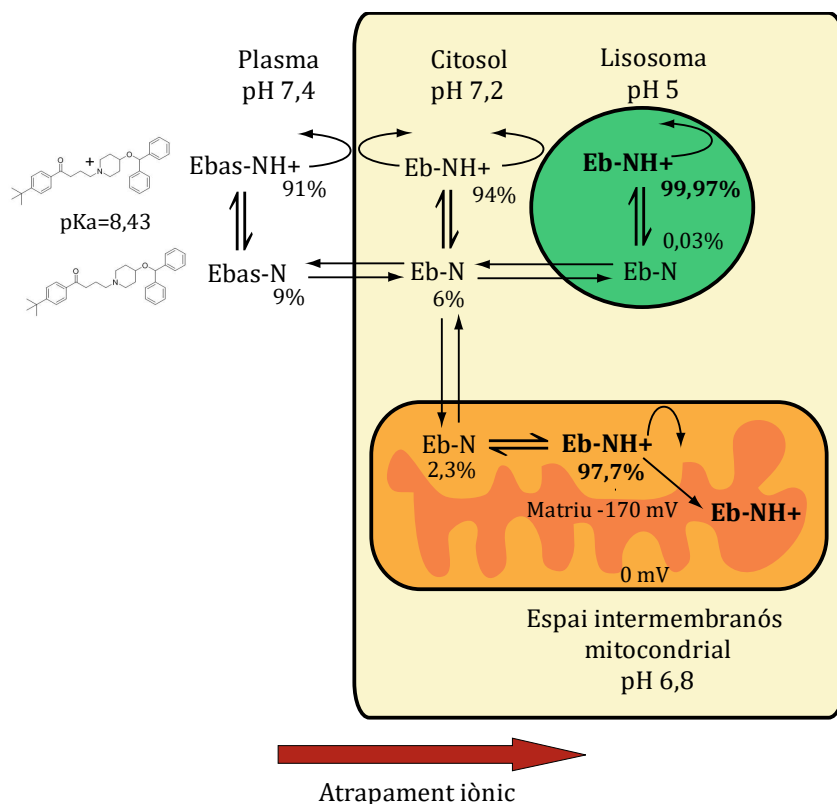


Figura 65. Distribució de les espècies d'ebastina als diferents compartiments cel·lulars. Càlculs realitzats en base al valor de pKa bàsic d'ebastina i pH dels diferents compartiments, mitjançant l'equació de Hendersson-Hasselbach.

Si bé queden pendents estudis en més profunditat de la permeabilització i de l'alliberament de catepsines i altres hidrolases al citosol, actualment en marxa, totes les evidències apunten que es produeix una acumulació lisosomal, seguida d'una expansió d'aquest compartiment cel·lular i una LMP.

Quant al tropisme mitocondrial, la presència de compostos catiónics a l'espai intermembranós probablement interfereix amb el correcte funcionament de la cadena respiratòria, que explicaria l'augment observat del superòxid mitocondrial. A més, si es produís una acumulació a l'espai intermembranós mitocondrial per gradient de pH, una part de fàrmac protonat podria entrar a la matriu mitocondrial per gradient electroquímic, dissipant el potencial de membrana i generant una disfunció del mitocondri. Encara que

disposem de poca informació referida a l'acumulació mitocondrial dels nostres fàrmacs i als esdeveniments específics que hi succeeixen en primer terme, sí que s'ha constatat una alteració general de l'homeòstasi, determinada per l'augment de superòxids, una disminució moderada del potencial de membrana i una activació de caspases, orquestrant així una mort apoptòtica.

Tots aquests efectes contribueixen de manera probablement col·lateral a una alteració de l'autofàgia, manifestada en un augment de vesícules autofàgiques que hem observat en línies cel·lulars de LMA i algunes mostres primàries. D'una banda l'afectació mitocondrial i l'augment de superòxid són mecanismes que contribueixen habitualment a l'augment del flux autofàgic, que actua per fer front als problemes que encara la cèl·lula (Shen, Kepp et al. 2012). D'altra banda, l'acumulació de fàrmacs als lisosomes sol portar a una inhibició de la fusió entre autofagosomes i lisosomes (Ostenfeld, Hoyer-Hansen et al. 2008; Logan, Kong et al. 2014; Kuzu, Toprak et al. 2017) impedit que el material capturat per l'autofàgia sigui lliurat als segons per a la seva degradació. Si bé no sembla que aquest fenomen sigui un punt central de la mort cel·lular, en no veure's revertit amb un inhibidor del flux autofàgic, cal no infravalorar-lo: s'està impedit el funcionament normal d'un mecanisme de resposta que contribueix a frenar la mort cel·lular, no només dels ANHA mateixos sinó potencialment també d'agents quimioterapèutics.

Així doncs, ens trobem davant de dos esdeveniments independents derivats de tropisme subcel·lular – LMP i activació de caspases – que orquestrin la mort de les cèl·lules de manera simultània si ho jutgem per les cinètiques realitzades. No s'ha determinat, ni sembla imprescindible fer-ho, la contribució relativa de cadascun dels esdeveniments sobre la mort cel·lular, ni el garbuix de mecanismes interconnectats que acaben gestionant el desmantellament de la cèl·lula. Probablement els dos esdeveniments podrien actuar de manera independent o compensar un la manca de l'altre, com apunta la manca de reversió de la citotoxicitat observada per inhibidors de caspases. De totes maneres, contràriament a l'excessiva compartimentalització amb què tradicionalment s'han considerat els diferents tipus de mort cel·lular, es mostra aquí un cas en què diversos mecanismes actuen en conjunt i en què probablement es retroalimentin. Si bé en aquest treball no s'ha estudiat en profunditat, la literatura ens recorda que l'activació de caspases i l'augment de ROS afavoreixen la LMP i viceversa (Serrano-Puebla i Boya 2018).

Aquest model per descriure el mecanisme de mort cel·lular induïda per ANHAs s'ajusta als resultats obtinguts, a l'anàlisi de les propietats farmacològiques dels antihistamínics i als

precedents de la literatura però fins a aquest punt argumental no explica l'efecte selectiu envers les cèl·lules neoplàsiques que s'ha observat aquí i en d'altres grups de recerca. Cal analitzar la biologia de les cèl·lules neoplàsiques per trobar una explicació als efectes molt menors dels ANHA en cèl·lules sanes.

La demostració de l'efecte preferent sobre cèl·lules neoplàsiques de compostos lisosomòtrops és relativament recent, però compta ja amb un bon cos evidencial en tumors que inclouen LMA, càncer de pulmó, glioma o leucèmia limfocítica crònica (Ostenfeld, Hoyer-Hansen et al. 2008; Jahchan, Dudley et al. 2013; Petersen, Olsen et al. 2013; Sukhai, Prabha et al. 2013; Zong, Zielinska-Chomej et al. 2014; Shchors, Massaras et al. 2015; Dielschneider, Eisenstat et al. 2016). A aquesta selectivitat s'han donat diverses explicacions, majoritàriament fonamentades en què l'alteració del metabolisme d'esfingolípidis sovint observada en càncer o la seva major mida o activitat degradadora podrien fer-los més vulnerables a compostos lisosomòtrops, per una qüestió doncs de composició de membrana (Fehrenbacher, Gyrd-Hansen et al. 2004; Petersen, Olsen et al. 2013).

En el cas específic de la LMA disposem d'un precedent de gran interès. Un estudi del grup del Dr Schimmer (Sukhai, Prabha et al. 2013) va constatar d'una banda que els lisosomes dels blasts eren més grans que els de les cèl·lules sanes, i de l'altra que la disrupció dels lisosomes induïa efectes citotòxics selectius, de manera similar als observats aquí i en línia amb publicacions anteriors en què es descrivia que lisosomes més grans eren més sensibles a la disrupció (Ono, Kim et al. 2003).

L'efecte preferent sobre mitocondris tumorals també pot explicar-se a partir de les diferències mitocondrials entre les cèl·lules sanes i les tumorals. Aquestes segones mostren en càncer moltes alteracions en termes de mida, morfologia, membranes o activitat entre d'altres (Modica-Napolitano i Weissig 2015). Especialment destacada és la sobreproducció de mitROS, que s'ha relacionat amb l'activació de vies proliferatives i la inestabilitat genòmica (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013; Sabharwal i Schumacker 2014), i que s'ha descrit, entre d'altres en càncer de mama, pulmó i fetge i leucèmia limfocítica crònica (LLC) i LMA (De Luca, Sanna et al. 2010; Weinberg, Hamanaka et al. 2010; Qin, Pan et al. 2011; Glasauer i Chandel 2014; Jitschin, Hofmann et al. 2014; Hart, Mao et al. 2015; Moloney, Stanicka et al. 2017). Aquesta sobreproducció de mitROS, que és tumorigènica i contribueix a la supervivència fa les cèl·lules més vulnerables a increments addicionals de

ROS que, a concentracions altes són letals (Irwin, Rivera-Del Valle et al. 2013; Sabharwal i Schumacker 2014).

En el cas de la LMA, no només s'ha descrit un augment de mitROS basal, sinó que a més s'ha constatat que els blasts contenen una major massa mitocondrial que no va acompanyada d'un augment de l'activitat de la cadena transportadora d'electrons, fent-los més susceptibles a estrès oxidatiu (Sriskanthadevan, Jeyaraju et al. 2015). Quant a precedents farmacològics, alguns compostos que afecten específicament els mitocondris, com l'avocatina B, han mostrat potencial eliminant selectivament cèl·lules de LMA, en part per la formació de mitROS (Lee, Angka et al. 2015). Aquests antecedents reforcen la idea que són possibles els efectes selectius afectant els mitocondris en conjunt, i s'apunta a la importància dels mitROS, que en el nostre cas hem observat molt elevats després del tractament amb ANHA. Si ens fixem ara en les LSCs de LMA, s'ha descrit que contindrien nivells basals més baixos de ROS, en consonància amb la seva menor proliferació (Lagadinou, Sach et al. 2013). Aquesta observació no encaixa amb els efectes selectius sobre LSCs observats amb ebastina si assumim que els efectes selectius es donen per un major nivell basal de mitROS. Cal introduir, però, encara un matís: si bé les LSCs tenen nivells més baixos de ROS, també són més sensibles al seu augment, que n'indueix la diferenciació (Testa, Labbaye et al. 2016). Interessantment, aquesta major sensibilitat envers l'augment de l'estrès oxidatiu s'ha observat també en cèl·lules resistents a citarabina (Farge, Saland et al. 2017), afavorint doncs la combinació dels ANHA amb quimioteràpia, que a més mostra efecte sinèrgic.

En resum, l'efecte diferencial podria explicar-se per la major vulnerabilitat dels lisosomes de LMA i el major nivell basal de ROS i vulnerabilitat mitocondrial que, davant l'estímul dels ANHA creuen el llindar de la mort cel·lular més fàcilment que les cèl·lules sanes.

A les darreres pàgines s'ha discutit la validesa del model proposat i possibles explicacions per a les observacions experimentals fetes. Cal, però, subratllar les limitacions del present estudi. Especialment rellevant és el fet que encara manquen estudis per caracteritzar a fons els efectes sobre mitocondris i lisosomes i poder demostrar definitivament l'acumulació en ambdós orgànuls i la importància simultània de les dues vies. D'altra banda, si bé s'ha observat un efecte diferencial dels ANHA, es produeix un cert efecte sobre les cèl·lules sanes que no s'ha caracteritzat a fons i que caldria conèixer a nivell més sistèmic. Així mateix no disposem encara d'evidències que els mecanismes descrits puguin funcionar efectivament *in vivo*, que eliminin les LSCs al seu nínxol i que no generin, per

exemple, efectes contraproductius sobre el sistema immune etc. El model proposat té, a més, un defecte principal: depèn en gran mesura d'assumpcions teòriques i de precedents de la literatura. La majoria d'aquestes limitacions seran amb alta probabilitat explorades en el futur, com ho serà també el potencial dels ANHA en diverses neoplàsiques hematològiques, que aquí només s'ha sondejat preliminarment.

Les conclusions obtingudes susciten encara una altra reflexió: fins a quin punt els mecanismes descrits en aquest treball podrien ser parcialment responsables dels efectes antileucèmics o antitumorals recollits en nombrosos estudis preclínic? Contínuament es publiquen articles que proposen nous agents antitumorals a concentracions de rang micromolar en base o no a estratègies de reposicionament de fàrmacs. Una part d'aquests, per força, mostrarà una distribució subcel·lular amb efectes sobre l'homeòstasi, que rarament són considerats, primant-se en la vasta majoria de casos la cerca de dianes moleculars específiques. Això és cert fins i tot en el cas de fàrmacs que són CADs lisosomòtrops reconeguts com molts antidepressius dels quals s'ha proposat el reposicionament. Recentment, un article ha constatat la relació de les propietats fisicoquímiques de fàrmacs aprovats per la FDA i els resultats de cribratges a *Connectivity Maps*: el lisosomotropisme emmascara efectes diana-específics (Sirci, Napolitano et al. 2017). El nostre propi estudi n'és una evidència flagrant. Totes aquestes reflexions probablement poden aplicar-se als estudis mateixos de lisosomotropisme, que solen passar per alt el mitocondriotropisme, probablement per l'espectacularitat del grau de concentració i augment del volum lisosomal, i per la major facilitat del seu estudi. Aquesta reflexió va ser feta per altres fa ja deu anys (Mehta, Chan et al. 2008), sense que hagin augmentat des de llavors els estudis mitocondrials de fàrmacs lisosomòtrops.

En aquest context i amb les limitacions exposades, cal encara recórrer molt camí abans d'arribar a l'estudi clínic dels fàrmacs. Si bé aquest estudi s'ha fonamentat en una estratègia de reposicionament, els resultats obtinguts en subratllen un dels seus defectes: el poc marge de maniobra quant a la optimització dels compostos. Així, la modificació dels fàrmacs suposaria perdre el seu principal avantatge, és a dir, el coneixement de les seves propietats farmacològiques i la seva seguretat, que permeten estalviar-se la fase I. Tot i això, la modificació és el camí que s'ha emprès, considerant que, per molt que es perdi l'avantatge principal del reposicionament, aquest ens ha permès de tota manera la identificació de *hits* a optimitzar. Així i com recull el treball, s'està produint una optimització *hit to lead*, que ha de possibilitar obtenir compostos més efectius i amb propietats ADME que els permetin estar més protegits del metabolisme i ser administrats

de manera eficient. Com que les propietats fisicoquímiques són rellevants per a la funció dels compostos a desenvolupar, serà un repte compaginar aquestes amb el perfil ADME desitjat i assolir concentracions micromolars als teixits. Per aquest motiu, es valorarà el desenvolupament d'estratègies de vehiculització de fàrmacs que permetrien, a més, fer arribar conjuntament a les cèl·lules leucèmiques els nostres futurs compostos amb quimioteràpia i maximitzar-ne els efectes sinèrgics.

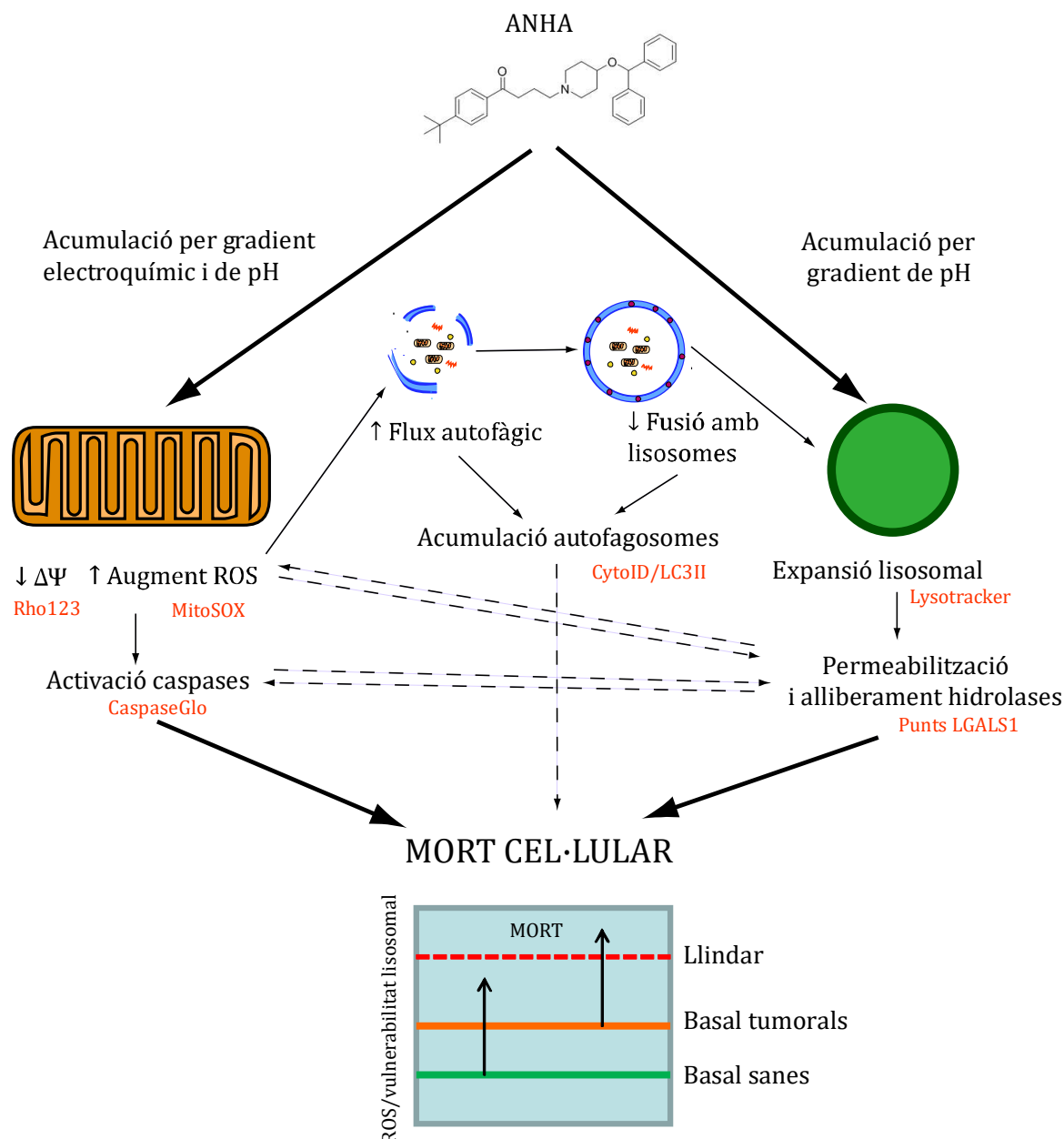


Figura 66. Model proposat per a l'efecte dels ANHA. En vermell es mostren les eines emprades per a l'estudi de diferents esdeveniments. Les línies discontinúes representen esdeveniments descrits a la literatura dels quals no tenim certesa de la rellevància en el nostre model.

Al llarg de tot aquest estudi hem descrit per primer cop els efectes selectius antileucèmics d'alguns antihistamínics en diverses neoplàsies hematològiques, sobretot LMA, mitjançant efectes sobre una diana no molecular i no convencional. També per primera vegada hem descrit l'efecte simultani de compostos d'aquest tipus sobre lisosomes i mitocondris en cèl·lules leucèmiques, descrivint una diana cel·lular dual amb efectes sobre LSCs. Aquestes troballes no només obren la porta a nous tractaments sinó que a més conviden a reflexionar sobre nous tipus de dianes que comencen a emergir i posen de rellevància la importància de la transformació sobre la funcionalitat i estabilitat dels orgànuls, com s'havia descrit prèviament. Es contribueix, a més, a assentar encara més la noció que afectar orgànuls sencers pot tenir efectes selectius envers cèl·lules tumorals i eradicar-ne la fracció més primitiva, constituint dianes potencialment rellevants en una gran proporció dels pacients. Futurs estudis i optimitzacions de tractaments basats en aquests principis hauran de validar-ne la idoneïtat per al tractament de neoplàsies.

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 fàrmacs antihistamínics amb alta hidrofobicitat i estructura catiònica amfifílica té activitat antileucèmica selectiva, afectant majoritàriament la població de cèl·lules mare de leucèmia mieloide aguda.
2. Aquests fàrmacs mostren efectes antitumorals en altres neoplàsies hematològiques
3. Els efectes antileucèmics dels antihistamínics no es produeixen a través del receptor d'histamina HRH1 sinó que depenen del tropisme a lisosomes i mitocondris, desestabilitzant-los i iniciant la mort cel·lular

7. Bibliografia

- Abdul-Nabi, A. M., E. R. Yassin, et al. (2010). "In vitro transformation of primary human CD34+ cells by AML fusion oncogenes: early gene expression profiling reveals possible drug target in AML." *PLoS One* **5**(8): e12464.
- Abe, M., Y. Nozawa, et al. (1988). "Characterization and comparison of two newly established epstein-barr virus-negative lymphoma B-cell lines: Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability." *Cancer* **61**(3): 483-490.
- Afghahi, A. and G. W. Sledge, Jr. (2015). "Targeted Therapy for Cancer in the Genomic Era." *Cancer J* **21**(4): 294-8.
- Agliano, A., I. Martin-Padura, et al. (2008). "Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains." *Int J Cancer* **123**(9): 2222-7.
- Agoston, M., F. Orsi, et al. (2003). "Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats." *Toxicology* **190**(3): 231-41.
- Ahlstrom, C. G., M. Johnston, et al. (1966). "Histamine formation in tumor-bearing rats." *Life Sci* **5**(18): 1633-40.
- Ahn, H. S. and A. Barnett (1986). "Selective displacement of [3H]mepyramine from peripheral vs. central nervous system receptors by loratadine, a non-sedating antihistamine." *Eur J Pharmacol* **127**(1-2): 153-5.
- Aichberger, K. J., M. Mayerhofer, et al. (2006). "The CML-related oncoprotein BCR/ABL induces expression of histidine decarboxylase (HDC) and the synthesis of histamine in leukemic cells." *Blood* **108**(10): 3538-47.
- Aits, S., J. Krickler, et al. (2015). "Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay." *Autophagy* **11**(8): 1408-24.
- Alduaij, W., A. Ivanov, et al. (2011). "Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies." *Blood* **117**(17): 4519-29.
- Amaravadi, R. K., D. Yu, et al. (2007). "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." *J Clin Invest* **117**(2): 326-36.
- Andresen, V. i B. T. Gjertsen (2017). "Drug Repurposing for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia." *Front Med (Lausanne)* **4**: 211.
- Antonijoan, R. M., C. Garcia-Gea, et al. (2007). "A comparison of ebastine 10 mg fast-dissolving tablet with oral desloratadine and placebo in inhibiting the cutaneous reaction to histamine in healthy adults." *Clin Drug Investig* **27**(7): 453-61.
- Appelmans, F., R. Wattiaux, et al. (1955). "Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver." *Biochem J* **59**(3): 438-45.
- Appelqvist, H., P. Waster, et al. (2013). "The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target." *J Mol Cell Biol* **5**(4): 214-26.
- Arber, D. A., A. Orazi, et al. (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." *Blood* **127**(20): 2391-405.
- Arborelius, L., B. B. Hook, et al. (1994). "The 5-HT1A receptor antagonist (S)-UH-301 blocks the qR)-8-OH-DPAT-induced inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing in the rat." *J Neural Transm Gen Sect* **96**(3): 179-86.
- Arrang, J. M., M. Garbarg, et al. (1983). "Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor." *Nature* **302**(5911): 832-7.
- Bakker, R. A., A. Jongejan, et al. (2008). "Constitutively active mutants of the histamine H1 receptor suggest a conserved hydrophobic asparagine-cage that constrains the activation of class A G protein-coupled receptors." *Mol Pharmacol* **73**(1): 94-103.
- Bakker, R. A., K. Wieland, et al. (2000). "Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* **387**(1): R5-7.

- Ball, M., A. F. List, et al. (2016). "When clinical heterogeneity exceeds genetic heterogeneity: thinking outside the genomic box in chronic myelomonocytic leukemia." *Blood* **128**(20): 2381-2387.
- Banderali, U., D. Belke, et al. (2011). "Curcumin blocks Kv11.1 (erg) potassium current and slows proliferation in the infant acute monocytic leukemia cell line THP-1." *Cell Physiol Biochem* **28**(6): 1169-80.
- Barabe, F., L. Gil, et al. (2017). "Modeling human MLL-AF9 translocated acute myeloid leukemia from single donors reveals RET as a potential therapeutic target." *Leukemia* **31**(5): 1166-1176.
- Barabe, F., J. A. Kennedy, et al. (2007). "Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice." *Science* **316**(5824): 600-4.
- Baracca, A., G. Sgarbi, et al. (2003). "Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis." *Biochim Biophys Acta* **1606**(1-3): 137-46.
- Barbier, A. J., C. Berridge, et al. (2004). "Acute wake-promoting actions of JNJ-5207852, a novel, diamine-based H3 antagonist." *Br J Pharmacol* **143**(5): 649-61.
- Bellodi, C., M. R. Lidonnici, et al. (2009). "Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells." *J Clin Invest* **119**(5): 1109-23.
- Benjamin, D., I. T. Magrath, et al. (1982). "Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type." *The Journal of Immunology* **129**(3): 1336-1342.
- Berenbaum, M. C. (1981). "Criteria for Analyzing Interactions between Biologically Active Agents." *Advances in Cancer Research* **35**: 269-335.
- Bergsagel, P. L., W. M. Kuehl, et al. (2005). "Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma." *Blood* **106**(1): 296-303.
- Bernson, E., A. Hallner, et al. (2017). "Impact of killer-immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen genotypes on the efficacy of immunotherapy in acute myeloid leukemia." *Leukemia* **31**(12): 2552-2559.
- Bernstein, D. I., W. F. Schoenwetter, et al. (1997). "Efficacy and safety of fexofenadine hydrochloride for treatment of seasonal allergic rhinitis." *Ann Allergy Asthma Immunol* **79**(5): 443-8.
- Black, J. W., W. A. Duncan, et al. (1972). "Definition and antagonism of histamine H₂ - receptors." *Nature* **236**(5347): 385-90.
- Blaiss, M. S. (2004). "Allergic rhinitis and impairment issues in schoolchildren: a consensus report." *Curr Med Res Opin* **20**(12): 1937-52.
- Bliss, C. I. (1939). "The toxicity of poisons applied jointly." *Annals of Applied Biology* **26**(3): 585-615.
- Boer, K., E. Helinger, et al. (2008). "Decreased expression of histamine H₁ and H₄ receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine." *Eur J Cell Biol* **87**(4): 227-36.
- Boerma, E. G., R. Siebert, et al. (2009). "Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge." *Leukemia* **23**(2): 225-34.
- Boguski, M. S., K. D. Mandl, et al. (2009). "Repurposing with a Difference." *Science* **324**(5933): 1394-1395.
- Bolden, C., B. Cusack, et al. (1992). "Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells." *J Pharmacol Exp Ther* **260**(2): 576-80.
- Bongers, G., K. M. Krueger, et al. (2007). "An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H₃ isoform confers pharmacological differences and constitutive activity." *J Pharmacol Exp Ther* **323**(3): 888-98.

- 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**(7): 730-737.
- Bowman, E. J., A. Siebers, et al. (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7972-6.
- Bradshaw, J., R. T. Brittain, et al. (1979). "Ranitidine (AH 19065): a new potent, selective histamine H₂-receptor antagonist [proceedings]." Br J Pharmacol **66**(3): 464P.
- Brandes, L. J., R. C. Warrington, et al. (1994). "Enhanced cancer growth in mice administered daily human-equivalent doses of some H₁-antihistamines: predictive in vitro correlates." J Natl Cancer Inst **86**(10): 770-5.
- Brimblecombe, R. W., W. A. Duncan, et al. (1975). "The pharmacology of cimetidine, a new histamine H₂-receptor antagonist." Br J Pharmacol **53**(3): 435P-436P.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, et al. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-33.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G₁-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-8.
- Brumatti, G., M. Salmanidis, et al. (2010). "Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals." Cell Mol Life Sci **67**(10): 1619-30.
- Brune, M., S. Castaigne, et al. (2006). "Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial." Blood **108**(1): 88-96.
- Brune, M., M. Hansson, et al. (1996). "NK cell-mediated killing of AML blasts: role of histamine, monocytes and reactive oxygen metabolites." Eur J Haematol **57**(4): 312-9.
- Bruserud, O. and B. T. Gjertsen (2000). "New strategies for the treatment of acute myelogenous leukemia: differentiation induction--present use and future possibilities." Stem Cells **18**(3): 157-65.
- Buckley, N. J., T. I. Bonner, et al. (1989). "Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells." Mol Pharmacol **35**(4): 469-76.
- Buechele, C., E. H. Breese, et al. (2015). "MLL leukemia induction by genome editing of human CD34+ hematopoietic cells." Blood **126**(14): 1683-94.
- Burnett, A. K., R. K. Hills, et al. (2011). "Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial." Journal of Clinical Oncology **29**(4): 369-377.
- Camenisch, G., J. Alsenz, et al. (1998). "Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight." Eur J Pharm Sci **6**(4): 317-24.
- Campbell, M., M. E. Cabrera, et al. (1996). "Discordant clinical presentation and outcome in infant twins sharing a common clonal leukaemia." Br J Haematol **93**(1): 166-9.
- Campo, E. and S. Rule (2015). "Mantle cell lymphoma: evolving management strategies." Blood **125**(1): 48-55.
- Carew, J. S., Y. Zhou, et al. (2003). "Mitochondrial DNA mutations in primary leukemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications." Leukemia **17**(8): 1437-47.
- Carmeliet, E. (1992). "Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide." J Pharmacol Exp Ther **262**(2): 809-17.
- Carson, S., N. Lee, et al. (2010).
- Carter, B. Z., Y. Qiu, et al. (2012). "Survivin is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML." Blood **120**(1): 173-80.

- Casey, J. R., S. Grinstein, et al. (2010). "Sensors and regulators of intracellular pH." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 50-61.
- Chan, R., T. De Bruyn, et al. (2018). "Comparing Mechanistic and Preclinical Predictions of Volume of Distribution on a Large Set of Drugs." Pharm Res **35**(4): 87.
- Chanda, R. and A. K. Ganguly (1995). "Diamine-oxidase activity and tissue di- and polyamine contents of human ovarian, cervical and endometrial carcinoma." Cancer Lett **89**(1): 23-8.
- Cheng, Z., D. Garvin, et al. (2010). "Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways." Curr Chem Genomics **4**: 84-91.
- Chereda, B. and J. V. Melo (2015). "Natural course and biology of CML." Ann Hematol **94** **Suppl 2**: S107-21.
- Cherednichenko, G., A. V. Zima, et al. (2004). "NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release." Circ Res **94**(4): 478-86.
- Chernyak, B. V., Y. N. Antonenko, et al. (2013). "Novel penetrating cations for targeting mitochondria." Curr Pharm Des **19**(15): 2795-806.
- Cheung, T. H. and T. A. Rando (2013). "Molecular regulation of stem cell quiescence." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(6): 329-40.
- Chiaretti, S. and R. Fo  (2009). "T-cell acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **94**(2): 160-2.
- Chou, T.-C. and P. Talalay (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." Advances in Enzyme Regulation **22**: 27-55.
- Cianchi, F., C. Cortesini, et al. (2005). "The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer." Clin Cancer Res **11**(19 Pt 1): 6807-15.
- Cianchi, F., M. C. Vinci, et al. (2008). "Histamine in cancer: the dual faces of the coin." Cancer Biol Ther **7**(1): 36-7.
- Clarke, P. G. and S. Clarke (2012). "Nineteenth century research on cell death." Exp Oncol **34**(3): 139-45.
- Clarke, P. G. and J. Puyal (2012). "Autophagic cell death exists." Autophagy **8**(6): 867-9.
- Cohen, A. F., M. J. Hamilton, et al. (1985). "Pharmacodynamic and pharmacokinetics of BW 825C: a new antihistamine." Eur J Clin Pharmacol **28**(2): 197-204.
- Cornet-Masana, J. M., D. Moreno-Martinez, et al. (2016). "Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells." Oncotarget **7**(17): 23239-50.
- Cricco, G., G. Martin, et al. (2000). "Human pancreatic carcinoma cell line Panc-I and the role of histamine in growth regulation." Inflamm Res **49** **Suppl 1**: S68-9.
- Cricco, G. P., C. A. Davio, et al. (1994). "Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas." Agents Actions **43**(1-2): 17-20.
- Cruciani, G., P. Crivori, et al. (2000). "Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **503**(1): 17-30.
- Cuapio, A., M. Post, et al. (2016). "Maintenance therapy with histamine plus IL-2 induces a striking expansion of two CD56(bright) NK cell subpopulations in patients with acute myeloid leukemia and supports their activation." Oncotarget **7**(29): 46466-81.
- Daeffler, L., F. Schmidlin, et al. (1999). "Inverse agonist activity of pirenzepine at M2 muscarinic acetylcholine receptors." Br J Pharmacol **126**(5): 1246-52.
- Dale, H. H. and P. P. Laidlaw (1910). "The physiological action of beta-aminazolyethylamine." J Physiol **41**(5): 318-44.
- Dalton, W. T., Jr., M. J. Ahearn, et al. (1988). "HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3." Blood **71**(1): 242-7.

- Davidson, S. M. and M. G. Vander Heiden (2017). "Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology." Annu Rev Pharmacol Toxicol **57**: 481-507.
- de Duve, C., T. de Barsy, et al. (1974). "Commentary. Lysosomotropic agents." Biochem Pharmacol **23**(18): 2495-531.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." Annu Rev Physiol **28**: 435-92.
- De Luca, A., F. Sanna, et al. (2010). "Methionine sulfoxide reductase A down-regulation in human breast cancer cells results in a more aggressive phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18628-33.
- Dean, P. N. and J. H. Jett (1974). "MATHEMATICAL ANALYSIS OF DNA DISTRIBUTIONS DERIVED FROM FLOW MICROFLUOROMETRY." J Cell Biol **60**(2): 523-7.
- del Cuvillo, A., J. Mullol, et al. (2006). "Comparative pharmacology of the H1 antihistamines." J Investig Allergol Clin Immunol **16 Suppl 1**: 3-12.
- Deschler, B. i M. Lubbert (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." Cancer **107**(9): 2099-107.
- Dice, J. F., S. R. Terlecky, et al. (1990). "A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes." Semin Cell Biol **1**(6): 449-55.
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K. P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E., Guggenheim, R. (1978). "Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study." Blut **36**(6): 331-338.
- Dielschneider, R. F., H. Eisenstat, et al. (2016). "Lysosomotropic agents selectively target chronic lymphocytic leukemia cells due to altered sphingolipid metabolism." Leukemia **30**(6): 1290-300.
- Djehiche, B., J. Segalen, et al. (1996). "Inhibition of autophagy of fetal rabbit gonoducts by puromycin, tunicamycin and chloroquin in organ culture." Tissue Cell **28**(1): 115-21.
- Dobbeling, U., Y. Waeckerle-Men, et al. (2013). "The antihistamines clemastine and desloratadine inhibit STAT3 and c-Myc activities and induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines." Exp Dermatol **22**(2): 119-24.
- Döhner, H., E. Estey, et al. (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." Blood **129**(4): 424-447.
- Dohner, H., E. H. Estey, et al. (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." Blood **115**(3): 453-74.
- Döhner, H., D. J. Weisdorf, et al. (2015). "Acute Myeloid Leukemia." New England Journal of Medicine **373**(12): 1136-1152.
- Dombret, H. and C. Gardin (2016). "An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia." Blood **127**(1): 53-61.
- Dorje, F., J. Wess, et al. (1991). "Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **256**(2): 727-33.
- Dorsch, W., H. J. Reimann, et al. (1982). "Histamine1--histamine2 antagonism: effect of combined clemastine and cimetidine pretreatment on allergen and histamine-induced reactions of the guinea pig lung in vivo and in vitro." Agents Actions **12**(1-2): 113-8.
- Droga-Mazovec, G., L. Bojic, et al. (2008). "Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues." J Biol Chem **283**(27): 19140-50.
- Druker, B. J., M. Talpaz, et al. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **344**(14): 1031-7.
- DuBridges, R. B., P. Tang, et al. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." Molecular and Cellular Biology **7**(1): 379-387.
- Dull, T., R. Zufferey, et al. (1998). "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." Journal of Virology **72**(11): 8463-8471.

- Duvvuri, M., Y. Gong, et al. (2004). "Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60." *J Biol Chem* **279**(31): 32367-72.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-9.
- Efeyan, A., R. Zoncu, et al. (2013). "Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival." *Nature* **493**(7434): 679-83.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, et al. (2009). "Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them." *Cell Death Differ* **16**(7): 966-75.
- Ellegaard, A. M., C. Dehrendorff, et al. (2016). "Repurposing Cationic Amphiphilic Antihistamines for Cancer Treatment." *EBioMedicine* **9**: 130-139.
- Engelhardt, G. (1975). "[On the pharmacology of 9,10-dihydro-10-(1-methyl-4-piperidylidene)-9-anthrol (WA 335), a histamine and serotonin antagonist (author's transl)]." *Arzneimittelforschung* **25**(11): 1723-37.
- Eppert, K., K. Takenaka, et al. (2011). "Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia." *Nat Med* **17**(9): 1086-93.
- Er, T. K., S. M. Tsai, et al. (2007). "Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia." *Clin Biochem* **40**(13-14): 1015-9.
- Estey, E., R. L. Levine, et al. (2015). "Current challenges in clinical development of "targeted therapies": the case of acute myeloid leukemia." *Blood* **125**(16): 2461-6.
- Etxabe, A., M. C. Lara-Castillo, et al. (2017). "Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem cell functionality: a promising novel therapeutic target." *Leukemia*.
- Evangelisti, C., F. Ricci, et al. (2011). "Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **25**(5): 781-91.
- Farge, T., E. Saland, et al. (2017). "Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism." *Cancer Discov* **7**(7): 716-735.
- Faustino-Rocha, A. I., R. Ferreira, et al. (2017). "Antihistamines as promising drugs in cancer therapy." *Life Sci* **172**: 27-41.
- Fehrenbacher, N., M. Gyrd-Hansen, et al. (2004). "Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation." *Cancer Res* **64**(15): 5301-10.
- Feng, Y. M., C. W. Feng, et al. (2012). "Unexpected remission of hepatocellular carcinoma (HCC) with lung metastasis to the combination therapy of thalidomide and cyproheptadine: report of two cases and a preliminary HCC cell line study." *BMJ Case Rep* **2012**.
- Feniuk, W., P. P. Humphrey, et al. (1985). "A comparison of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in rabbit aorta and dog saphenous vein: evidence for different receptor types obtained by use of selective agonists and antagonists." *British Journal of Pharmacology* **86**(3): 697-704.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." *Nat Cell Biol* **3**(11): E255-63.
- Finlayson, K., A. J. Pennington, et al. (2001). "[³H]dofetilide binding in SHSY5Y and HEK293 cells expressing a HERG-like K⁺ channel?" *Eur J Pharmacol* **412**(3): 203-12.
- Flavahan, W. A., E. Gaskell, et al. (2017). "Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer." *Science* **357**(6348).
- Foley, G. E., H. Lazarus, et al. (1965). "Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia." *Cancer* **18**(4): 522-529.
- Fukushima, Y., T. Asano, et al. (1997). "Oligomer formation of histamine H₂ receptors expressed in Sf9 and COS7 cells." *FEBS Lett* **409**(2): 283-6.
- Fulda, S. and D. Kogel (2015). "Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy." *Oncogene* **34**(40): 5105-13.

- Gallagher, R., S. Collins, 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.
- Galluzzi, L., J. M. Bravo-San Pedro, et al. (2015). "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015." Cell Death Differ **22**(1): 58-73.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." Cell Death Differ.
- Galluzzi, L., I. Vitale, et al. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." Cell Death Differ **25**(3): 486-541.
- Garcia-Caballero, M., E. Neugebauer, et al. (1988). "Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients." Agents Actions **23**(3-4): 357-60.
- Garcia-Caballero, M., E. Neugebauer, et al. (1994). "Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues." Surg Oncol **3**(3): 167-73.
- Garcia-Quiroz, J., R. Garcia-Becerra, et al. (2012). "Astemizole synergizes calcitriol antiproliferative activity by inhibiting CYP24A1 and upregulating VDR: a novel approach for breast cancer therapy." PLoS One **7**(9): e45063.
- Garrido, S. M., F. R. Appelbaum, et al. (2001). "Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)." Exp Hematol **29**(4): 448-57.
- Geminard, C., A. de Gassart, et al. (2002). "Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release." Biocell **26**(2): 205-15.
- Gentles, A. J., S. K. Plevritis, et al. (2010). "Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia." JAMA **304**(24): 2706-15.
- Gerlinger, M., A. J. Rowan, et al. (2012). "Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing." N Engl J Med **366**(10): 883-892.
- Gfeller, D., O. Michielin, et al. (2013). "Shaping the interaction landscape of bioactive molecules." Bioinformatics **29**(23): 3073-9.
- Glasauer, A. and N. S. Chandel (2014). "Targeting antioxidants for cancer therapy." Biochem Pharmacol **92**(1): 90-101.
- Gleeson, M. P., A. Hersey, et al. (2011). "Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters." Nat Rev Drug Discov **10**(3): 197-208.
- Glennon, R., N. Naiman, et al. (1988). "NAN-190: an arylpiperazine analog that antagonizes the stimulus effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT)." European journal of pharmacology **23**(3): 339-41.
- Glucksmann, A. (1951). "Cell deaths in normal vertebrate ontogeny." Biol Rev Camb Philos Soc **26**(1): 59-86.
- Goh, L. K. and A. Sorkin (2013). "Endocytosis of receptor tyrosine kinases." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(5): a017459.
- Goldman, S. D., R. S. Funk, et al. (2009). "Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes." Bioanalysis **1**(8): 1445-59.
- Graff, L., M. Frungieri, et al. (2002). "Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma." Am J Pathol **160**(5): 1561-5.
- Grancara, S., F. Zonta, et al. (2015). "Pathophysiological implications of mitochondrial oxidative stress mediated by mitochondriotropic agents and polyamines: the role of tyrosine phosphorylation." Amino Acids **47**(5): 869-83.
- Greaves, M. (2015). "Evolutionary Determinants of Cancer." Cancer Discov **5**(8): 806-20.
- Greco, W. R., G. Bravo, et al. (1995). "The search for synergy: a critical review from a response surface perspective." Pharmacol Rev **47**(2): 331-85.
- Green, D. R., T. H. Oguin, et al. (2016). "The clearance of dying cells: table for two." Cell Death Differ **23**(6): 915-26.

- Greenberg, P. L., H. Tuechler, et al. (2012). "Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes." *Blood* **120**(12): 2454-65.
- Grillo-Lopez, A. J., C. A. White, et al. (1999). "Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma." *Semin Oncol* **26**(5 Suppl 14): 66-73.
- Groth-Pedersen, L. and M. Jaattela (2013). "Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes." *Cancer Lett* **332**(2): 265-74.
- Grove, C. S. and G. S. Vassiliou (2014). "Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?" *Disease Models & Mechanisms* **7**(8): 941-951.
- Gutowski, S., A. Smrcka, et al. (1991). "Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones." *J Biol Chem* **266**(30): 20519-24.
- Gwilt, M., J. E. Arrowsmith, et al. (1991). "UK-68,798: a novel, potent and highly selective class III antiarrhythmic agent which blocks potassium channels in cardiac cells." *J Pharmacol Exp Ther* **256**(1): 318-24.
- Hadzijušufovic, E., B. Peter, et al. (2010). "H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells." *Exp Hematol* **38**(10): 896-907.
- Haferlach, T., Y. Nagata, et al. (2014). "Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes." *Leukemia* **28**(2): 241-7.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* **347**(20): 1593-603.
- Hallner, A., J. Aurelius, et al. (2015). "Immunotherapy with histamine dihydrochloride and low-dose interleukin-2 favors sustained lymphocyte recovery in acute myeloid leukemia." *Eur J Haematol* **94**(3): 279-80.
- Hamalisto, S. and M. Jaattela (2016). "Lysosomes in cancer-living on the edge (of the cell)." *Curr Opin Cell Biol* **39**: 69-76.
- Hameroff, S. R., R. C. Cork, et al. (1982). "Doxepin effects on chronic pain, depression and plasma opioids." *J Clin Psychiatry* **43**(8 Pt 2): 22-7.
- Hammer, R., C. P. Berrie, et al. (1980). "Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors." *Nature* **283**(5742): 90-2.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hancock, A. A., T. A. Esbenshade, et al. (2003). "Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity." *Life Sci* **73**(24): 3043-72.
- Harding, S. D., J. L. Sharman, et al. (2018). "The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY." *Nucleic Acids Res* **46**(D1): D1091-D1106.
- Hart, P. C., M. Mao, et al. (2015). "MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer." *Nat Commun* **6**: 6053.
- Hartmann, V., H. Magnussen, et al. (1981). "Modulation of histamine-induced bronchoconstriction with inhaled, oral, and intravenous clemastine in normal and asthmatic subjects." *Thorax* **36**(10): 737-40.
- Hegyesi, H., B. Somlai, et al. (2001). "Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides." *J Invest Dermatol* **117**(1): 151-3.
- Helgason, G. V., A. Mukhopadhyay, et al. (2013). "Autophagy in chronic myeloid leukaemia: stem cell survival and implication in therapy." *Curr Cancer Drug Targets* **13**(7): 724-34.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.

- Hirose, H., I. Aoki, et al. (2001). "Pharmacological properties of (2R)-N-[1-(6-aminopyridin-2-ylmethyl)piperidin-4-yl]-2-[(1R)-3,3-difluorocyclopropyl]-2-hydroxy-2-phenylacetamide: a novel mucarinic antagonist with M(2)-sparing antagonistic activity." *J Pharmacol Exp Ther* **297**(2): 790-7.
- Hishita, T., S. Tada-Oikawa, et al. (2001). "Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39." *Cancer Res* **61**(7): 2878-84.
- Holgate, S. T., G. W. Canonica, et al. (2003). "Consensus Group on New-Generation Antihistamines (CONGA): present status and recommendations." *Clin Exp Allergy* **33**(9): 1305-24.
- Horobin, R. W., S. Trapp, et al. (2007). "Mitochondriotropics: a review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria." *J Control Release* **121**(3): 125-36.
- Hu, Y. and S. Li (2016). "Survival regulation of leukemia stem cells." *Cell Mol Life Sci* **73**(5): 1039-50.
- Huang CC, H. Y., Woods LK, Moore GE, Minowada J. (1974). "Cytogenetic study of human lymphoid T-cell lines derived from lymphocytic leukemia." *Journal of the National Cancer Institute* **53**(3): 655-60.
- Hughes, J., S. Rees, et al. (2011). "Principles of early drug discovery." *Br J Pharmacol* **162**(6): 1239-49.
- Huther, K. J., G. Renftle, et al. (1977). "Inhibitory activity of terfenadine on histamine-induced skin wheals in man." *Eur J Clin Pharmacol* **12**(3): 195-9.
- Inaba, H., M. Greaves, et al. (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia." *Lancet* **381**(9881).
- Ireland, S. J. and M. B. Tyers (1987). "Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced depolarization of the rat isolated vagus nerve." *British Journal of Pharmacology* **90**(1): 229-238.
- Irwin, M. E., N. Rivera-Del Valle, et al. (2013). "Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* **18**(11): 1349-83.
- Jablonski, J. A., C. A. Grice, et al. (2003). "The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists." *J Med Chem* **46**(19): 3957-60.
- Jackson, N., J. Lowe, et al. (1989). "Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2." *Clinical and Experimental Immunology* **75**(1): 93-99.
- Jadayel, D. M., J. Lukas, et al. (1997). "Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519)." *Leukemia* **11**(1): 64-72.
- Jahchan, N. S., J. T. Dudley, et al. (2013). "A drug repositioning approach identifies tricyclic antidepressants as inhibitors of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors." *Cancer Discov* **3**(12): 1364-77.
- Jaiswal, S. and Benjamin L. Ebert (2014). "MDS Is a Stem Cell Disorder After All." *Cancer Cell* **25**(6): 713-714.
- Jangi, S. M., J. L. Diaz-Perez, et al. (2006). "H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells." *Carcinogenesis* **27**(9): 1787-96.
- Jezek, J., K. F. Cooper, et al. (2018). "Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression." *Antioxidants (Basel)* **7**(1).
- Jiang, H., C. Acharya, et al. (2016). "SAR650984 directly induces multiple myeloma cell death via lysosomal-associated and apoptotic pathways, which is further enhanced by pomalidomide." *Leukemia* **30**(2): 399-408.
- Jin, L., K. J. Hope, et al. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." *Nat Med* **12**(10): 1167-74.

- Jitschin, R., A. D. Hofmann, et al. (2014). "Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia." Blood **123**(17): 2663-72.
- Jovanovic, K. K., C. Roche-Lestienne, et al. (2018). "Targeting MYC in multiple myeloma." Leukemia.
- Jutel, M., M. Akdis, et al. (2009). "Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology." Clin Exp Allergy **39**(12): 1786-800.
- Jutel, M., T. Watanabe, et al. (2001). "Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors." Nature **413**(6854): 420-5.
- Kahlson, G. and E. Rosengren (1959). "Prevention of foetal development by enzyme inhibition." Nature **184**(Suppl 16): 1238-9.
- Kahlson, G. and E. Rosengren (1963). "Histamine formation in bone marrow." Experientia **19**: 182-3.
- Kahlson, G., E. Rosengren, et al. (1963). "HISTAMINE-FORMING CAPACITY OF MULTIPLYING CELLS." J Physiol **169**: 487-98.
- Kahlson, G., E. Rosengren, et al. (1958). "Increased formation of histamine in the pregnant rat." J Physiol **143**(1): 91-103.
- Kallunki, T., O. D. Olsen, et al. (2013). "Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes?" Oncogene **32**(16): 1995-2004.
- Kannan, K. and S. K. Jain (2000). "Oxidative stress and apoptosis." Pathophysiology **7**(3): 153-163.
- Kashif, M., C. Andersson, et al. (2014). "A pragmatic definition of therapeutic synergy suitable for clinically relevant in vitro multicomponent analyses." Mol Cancer Ther **13**(7): 1964-76.
- Kayser, S. and M. J. Levis (2018). "Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **180**(4): 484-500.
- Kazmi, F., T. Hensley, et al. (2013). "Lysosomal sequestration (trapping) of lipophilic amine (cationic amphiphilic) drugs in immortalized human hepatocytes (Fa2N-4 cells)." Drug Metab Dispos **41**(4): 897-905.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kirkegaard, T. and M. Jaattela (2009). "Lysosomal involvement in cell death and cancer." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 746-54.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 931-7.
- Klionsky, D. J., K. Abdelmohsen, et al. (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.
- Kloditz, K., Y. Z. Chen, et al. (2016). "Programmed cell clearance: From nematodes to humans." Biochem Biophys Res Commun **482**(3): 491-497.
- Ko, C. M., I. Ducic, et al. (1997). "Suppression of mammalian K⁺ channel family by ebastine." J Pharmacol Exp Ther **281**(1): 233-44.
- Kobayashi, T., T. Tanaka, et al. (2013). "How do cells optimize luminal environments of endosomes/lysosomes for efficient inflammatory responses?" J Biochem **154**(6): 491-9.
- Kodavanti, U. P. and H. M. Mehendale (1990). "Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder." Pharmacol Rev **42**(4): 327-54.
- Koeffler, H. and D. Golde (1978). "Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity." Science **200**(4346): 1153-1154.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (2005). "Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 81-103.

- Kornhuber, J., P. Tripal, et al. (2010). "Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications." *Cell Physiol Biochem* **26**(1): 9-20.
- Kreutner, W., R. W. Chapman, et al. (1987). "Antiallergic activity of loratadine, a non-sedating antihistamine." *Allergy* **42**(1): 57-63.
- Kreuzaler, P. and C. J. Watson (2012). "Killing a cancer: what are the alternatives?" *Nat Rev Cancer* **12**(6): 411-24.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." *Nat Rev Cancer* **5**(11): 886-97.
- Kuehl, W. M. and P. L. Bergsagel (2012). "Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor." *J Clin Invest* **122**(10): 3456-63.
- Kuhn, T. S. (1970). *The structure of scientific revolutions*. Chicago, University of Chicago Press.
- Kung, C. P., A. Budina, et al. (2011). "Autophagy in tumor suppression and cancer therapy." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **21**(1): 71-100.
- Kuzu, O. F., M. Toprak, et al. (2017). "Effect of lysosomotropic molecules on cellular homeostasis." *Pharmacol Res* **117**: 177-184.
- Lacombe, F., F. Durrieu, et al. (1997). "Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia." *Leukemia* **11**(11): 1878-86.
- Lagadinou, E. D., A. Sach, et al. (2013). "BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells." *Cell stem cell* **12**(3): 329-41.
- Lamb, C. A., T. Yoshimori, et al. (2013). "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(12): 759-74.
- Lamb, J., E. D. Crawford, et al. (2006). "The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease." *Science* **313**(5795): 1929-1935.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* **367**(6464): 645-8.
- Le, S., J. A. Gruner, et al. (2008). "Correlation between ex vivo receptor occupancy and wake-promoting activity of selective H3 receptor antagonists." *J Pharmacol Exp Ther* **325**(3): 902-9.
- Lee, E. A., L. Angka, et al. (2015). "Targeting Mitochondria with Avocatin B Induces Selective Leukemia Cell Death." *Cancer Res* **75**(12): 2478-88.
- Lemos, B., C. Davio, et al. (1995). "Histamine receptors in human mammary gland, different benign lesions and mammary carcinomas." *Inflamm Res* **44 Suppl 1**: S68-9.
- Leo, A., C. Hansch, et al. (1971). "Partition coefficients and their uses." *Chemical Reviews* **71**(6): 525-616.
- Leopoldt, D., C. Harteneck, et al. (1997). "G proteins endogenously expressed in Sf 9 cells: interactions with mammalian histamine receptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**(2): 216-24.
- Leurs, R., M. Hoffmann, et al. (2002). "Methods to determine the constitutive activity of histamine H2 receptors." *Methods Enzymol* **343**: 405-16.
- Leurs, R., H. F. Vischer, et al. (2011). "En route to new blockbuster anti-histamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family." *Trends Pharmacol Sci* **32**(4): 250-7.
- Levy, J. M. M., C. G. Towers, et al. (2017). "Targeting autophagy in cancer." *Nat Rev Cancer* **17**(9): 528-542.
- Li, W. W., J. Li, et al. (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." *Cell Mol Life Sci* **69**(7): 1125-36.

- Lin, J. C., Y. S. Ho, et al. (2007). "Induction of apoptosis and cell-cycle arrest in human colon cancer cells by meclizine." Food Chem Toxicol **45**(6): 935-44.
- Lindqvist, L. M., A. K. Simon, et al. (2015). "Current questions and possible controversies in autophagy." Cell Death Discov **1**.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 3-26.
- Liu, C., X. Ma, et al. (2001). "Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow." Mol Pharmacol **59**(3): 420-6.
- Liu, K. H., M. G. Kim, et al. (2006). "Characterization of ebastine, hydroxyebastine, and carebastine metabolism by human liver microsomes and expressed cytochrome P450 enzymes: major roles for CYP2J2 and CYP3A." Drug Metab Dispos **34**(11): 1793-7.
- Liu, X., M. Tu, et al. (2004). "Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability." Drug Metab Dispos **32**(1): 132-9.
- Lloyd, J. B. (1996). "Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane." Subcell Biochem **27**: 361-86.
- Lobo, N. A., Y. Shimono, et al. (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-99.
- Loewe, S. (1953). "The problem of synergism and antagonism of combined drugs." Arzneimittelforschung **3**(6): 285-90.
- Logan, R., A. C. Kong, et al. (2014). "Amine-containing molecules and the induction of an expanded lysosomal volume phenotype: a structure-activity relationship study." J Pharm Sci **103**(5): 1572-80.
- Longo, D. L. (2014). "Cancer-drug discovery--let's get ready for the next period." N Engl J Med **371**(23): 2227-8.
- Lozzio, C. and B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-334.
- Lu, L., W. Du, et al. (2016). "Increased expression of HERG K(+) channels contributes to myelodysplastic syndrome progression and displays correlation with prognosis stratification." Hematology **21**(10): 583-592.
- Lubke, T., P. Lobel, et al. (2009). "Proteomics of the lysosome." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 625-35.
- Ma, Y., L. Galluzzi, et al. (2013). "Autophagy and cellular immune responses." Immunity **39**(2): 211-27.
- Magee, J. A., E. Piskounova, et al. (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." Cancer Cell **21**(3): 283-296.
- Maghsoudi, N., Z. Zakeri, et al. (2012). "Programmed cell death and apoptosis--where it came from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspases." Exp Oncol **34**(3): 146-52.
- Maintz, L. and N. Novak (2007). "Histamine and histamine intolerance." Am J Clin Nutr **85**(5): 1185-96.
- Malaviya, R. and F. M. Uckun (2000). "Histamine as an autocrine regulator of leukemic cell proliferation." Leuk Lymphoma **36**(3-4): 367-73.
- Malouf, C. and K. Ottersbach (2018). "Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia." Cell Mol Life Sci **75**(3): 417-446.
- Manners, C. N., D. W. Payling, et al. (1988). "Distribution coefficient, a convenient term for the relation of predictable physico-chemical properties to metabolic processes." Xenobiotica **18**(3): 331-50.
- Marenchino, M., A. L. Alpstag-Wohrle, et al. (2004). "Alpha-tocopherol influences the lipid membrane affinity of desipramine in a pH-dependent manner." Eur J Pharm Sci **21**(2-3): 313-21.

- Marino, G., M. Niso-Santano, et al. (2014). "Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 81-94.
- Martin, M. L., G. Liebisch, et al. (2013). "Sustained activation of sphingomyelin synthase by 2-hydroxyoleic acid induces sphingolipidosis in tumor cells." J Lipid Res **54**(5): 1457-65.
- Martin, U. and D. Romer (1978). "The pharmacological properties of a new, orally active antianaphylactic compound: ketotifen, a benzocycloheptathiophene." Arzneimittelforschung **28**(5): 770-82.
- Martincorena, I., K. M. Raine, et al. (2017). "Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues." Cell **171**(5): 1029-1041 e21.
- Massari, N. A., M. B. Nicoud, et al. (2017). "Histamine therapeutic efficacy in metastatic melanoma: Role of histamine H4 receptor agonists and opportunity for combination with radiation." Oncotarget **8**(16): 26471-26491.
- Matsuoka Y, M. G., Yagi Y, Pressman D. (1967). "Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma." Proc Soc Exp Biol Med **125**(4): 1246-50.
- Mazzanti, M., J. O. Bustamante, et al. (2001). "Electrical dimension of the nuclear envelope." Physiol Rev **81**(1): 1-19.
- McNeil, C. (1998). "Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer." J Natl Cancer Inst **90**(12): 882-3.
- Meacham, C. E. and S. J. Morrison (2013). "Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity." Nature **501**(7467): 328-337.
- Medeiros, B. C., A. T. Fathi, et al. (2017). "Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies." Leukemia **31**(2): 272-281.
- Medina, M. A., R. Garcia de Veas, et al. (1995). "Chlorpheniramine inhibits the synthesis of ornithine decarboxylase and the proliferation of human breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **35**(2): 187-94.
- Medina, V., M. Croci, et al. (2008). "The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment." Cancer Biol Ther **7**(1): 28-35.
- Mehta, R., K. Chan, et al. (2008). Drug-associated mitochondrial toxicity. Drug-induced mitochondrial dysfunction. J. A. Dykens and Y. Will, Wiley. **1**: 71-127.
- Mellman, I. (1989). "Organelles observed: lysosomes." Science **244**(4906): 853-4.
- Merlos, M., M. Giral, et al. (1997). "Rupatadine, a new potent, orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor (PAF)." J Pharmacol Exp Ther **280**(1): 114-21.
- Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1016-23.
- Millan, M. J., L. Maiorini, et al. (2002). "Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes." J Pharmacol Exp Ther **303**(2): 791-804.
- Mina, R., M. D'Agostino, et al. (2017). "Plasma cell leukemia: update on biology and therapy." Leuk Lymphoma **58**(7): 1538-1547.
- Minocha, A. and B. H. Long (1984). "Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP16-213 and VM26." Biochem Biophys Res Commun **122**(1): 165-70.
- Mitsuhashi, M. and D. G. Payan (1992). "Functional diversity of histamine and histamine receptors." J Invest Dermatol **98**(6 Suppl): 8S-11S.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-41.
- Modica-Napolitano, J. S. and V. Weissig (2015). "Treatment Strategies that Enhance the Efficacy and Selectivity of Mitochondria-Targeted Anticancer Agents." Int J Mol Sci **16**(8): 17394-421.

- Molnar, E. L., G. Cricco, et al. (2001). "Histamine as a potential autocrine regulator of melanoma." *Inflamm Res* **50 Suppl 2**: S102-3.
- Moloney, J. N., J. Stanicka, et al. (2017). "Subcellular localization of the FLT3-ITD oncogene plays a significant role in the production of NOX- and p22(phox)-derived reactive oxygen species in acute myeloid leukemia." *Leuk Res* **52**: 34-42.
- Molyneux, E. M., R. Rochford, et al. (2012). "Burkitt's lymphoma." *Lancet* **379**(9822): 1234-44.
- Monachon, M., W. Burkard, et al. (1972). "Blockade of central 5-hydroxytryptamine receptors by methiothepin." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **274**(2): 192-7.
- Monczor, F., S. Copsel, et al. (2017). "Histamine H2 Receptor in Blood Cells: A Suitable Target for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia." *Handb Exp Pharmacol* **241**: 141-160.
- Moniri, N. H., D. Covington-Strachan, et al. (2004). "Ligand-directed functional heterogeneity of histamine H1 receptors: novel dual-function ligands selectively activate and block H1-mediated phospholipase C and adenylyl cyclase signaling." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(1): 274-81.
- Morse, K. L., J. Behan, et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel human histamine receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **296**(3): 1058-66.
- Moyo, T. K. and M. R. Savona (2017). "Therapy for Chronic Myelomonocytic Leukemia in a New Era." *Current Hematologic Malignancy Reports*.
- Mukhopadhyay, S., P. K. Panda, et al. (2014). "Autophagy and apoptosis: where do they meet?" *Apoptosis* **19**(4): 555-66.
- Nair, M. P. and S. A. Schwartz (1983). "Effect of histamine and histamine antagonists on natural and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human lymphocytes in vitro." *Cell Immunol* **81**(1): 45-60.
- Nakamura, T., H. Itadani, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R." *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2): 615-20.
- Nencioni, A., M. Cea, et al. (2013). "Autophagy in blood cancers: biological role and therapeutic implications." *Haematologica* **98**(9): 1335-43.
- Newman, A. H., A. C. Allen, et al. (1994). "Novel 3 alpha-(diphenylmethoxy)tropane analogs: potent dopamine uptake inhibitors without cocaine-like behavioral profiles." *J Med Chem* **37**(15): 2258-61.
- Nguyen, T., D. A. Shapiro, et al. (2001). "Discovery of a novel member of the histamine receptor family." *Mol Pharmacol* **59**(3): 427-33.
- Nicolau-Galmes, F., A. Asumendi, et al. (2011). "Terfenadine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and -independent mechanisms." *Apoptosis* **16**(12): 1253-67.
- Nieto-Alamilla, G., R. Marquez-Gomez, et al. (2016). "The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function." *Mol Pharmacol* **90**(5): 649-673.
- Nijmeijer, S., C. de Graaf, et al. (2012). "Molecular pharmacology of histamine H4 receptors." *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 2089-106.
- Nilsson, K., H. Bennich, et al. (1970). "Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient." *Clin Exp Immunol* **7**(4): 477-89.
- Nicola, P., A. Tendas, et al. (2014). "Acute myeloid leukemia arising from chronic myelomonocytic leukemia during hypomethylating therapy." *Blood research* **49**(1): 65-66.
- O'Reilly, M., R. Alpert, et al. (2002). "Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis." *J Recept Signal Transduct Res* **22**(1-4): 431-48.

- Oda, T., N. Morikawa, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes." J Biol Chem **275**(47): 36781-6.
- Ohkuma, S., Y. Moriyama, et al. (1982). "Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(9): 2758-62.
- Ono, K., S. O. Kim, et al. (2003). "Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death." Mol Cell Biol **23**(2): 665-76.
- Orzechowski, R. F., D. S. Currie, et al. (2005). "Comparative anticholinergic activities of 10 histamine H1 receptor antagonists in two functional models." Eur J Pharmacol **506**(3): 257-64.
- Ostenfeld, M. S., M. Hoyer-Hansen, et al. (2008). "Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation." Autophagy **4**(4): 487-99.
- Pabst, T. and B. U. Mueller (2007). "Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML." Oncogene **26**(47): 6829-37.
- Paguirigan, A. L., J. Smith, et al. (2015). "Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia." Sci Transl Med **7**(281): 281re2.
- Palmeira dos Santos, C., G. J. Pereira, et al. (2014). "Comparative study of autophagy inhibition by 3MA and CQ on Cytarabine-induced death of leukaemia cells." J Cancer Res Clin Oncol **140**(6): 909-20.
- Palmieri, M., S. Impey, et al. (2011). "Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways." Hum Mol Genet **20**(19): 3852-66.
- Panula, P., P. L. Chazot, et al. (2015). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors." Pharmacol Rev **67**(3): 601-55.
- Paoluzzi, L., L. Scotto, et al. (2009). "The anti-histaminic cyproheptadine synergizes the antineoplastic activity of bortezomib in mantle cell lymphoma through its effects as a histone deacetylase inhibitor." Br J Haematol **146**(6): 656-9.
- Papaemmanuil, E., M. Gerstung, et al. (2016). "Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." New England Journal of Medicine **374**(23): 2209-2221.
- Papaemmanuil, E., M. Gerstung, et al. (2013). "Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes." Blood **122**(22): 3616-27; quiz 3699.
- Parsons, M. E. and C. R. Ganellin (2006). "Histamine and its receptors." Br J Pharmacol **147** **Suppl 1**: S127-35.
- Peden, N. R., J. H. Saunders, et al. (1979). "Inhibition of pentagastrin-stimulated and nocturnal gastric secretion by ranitidine. A new H₂-receptor antagonist." Lancet **1**(8118): 690-2.
- Petersen, N. H., O. D. Olsen, 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.
- Pham-The, H., I. Gonzalez-Alvarez, et al. (2013). "The Use of Rule-Based and QSPR Approaches in ADME Profiling: A Case Study on Caco-2 Permeability." Mol Inform **32**(5-6): 459-79.
- Piao, S. and R. K. Amaravadi (2016). "Targeting the lysosome in cancer." Ann N Y Acad Sci **1371**(1): 45-54.
- Pillozzi, S., M. F. Brizzi, et al. (2002). "HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors." Leukemia **16**(9): 1791-8.
- Pollyea, D. A. and C. T. Jordan (2017). "Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells." Blood **129**(12): 1627-1635.

- Pos, Z., G. Safrany, et al. (2005). "Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers." *Cancer Res* **65**(10): 4458-66.
- Prébet, T., S. D. Gore, et al. (2011). "Outcome of High-Risk Myelodysplastic Syndrome After Azacitidine Treatment Failure." *Journal of Clinical Oncology* **29**(24): 3322-3327.
- Puisieux, A., R. M. Pommier, et al. (2018). "Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis." *Cancer Cell* **33**(2): 164-172.
- Puissant, A., M. Dufies, et al. (2010). "Targeting lysosomes to eradicate imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells." *Leukemia* **24**(5): 1099-101.
- Qin, Y., X. Pan, et al. (2011). "Anti-proliferative effects of the novel squamosamide derivative (FLZ) on HepG2 human hepatoma cells by regulating the cell cycle-related proteins are associated with decreased Ca(2+)/ROS levels." *Chem Biol Interact* **193**(3): 246-53.
- Quillet-Mary, A., J. P. Jaffrezou, et al. (1997). "Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis." *J Biol Chem* **272**(34): 21388-95.
- Quintanilla-Martinez, L. (2017). "The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias." *Hematol Oncol* **35 Suppl 1**: 37-45.
- Rhyasen, G., M. Wunderlich, et al. (2014). "An MDS xenograft model utilizing a patient-derived cell line." *Leukemia* **28**(5): 1142-5.
- Riffelmacher, T. and A. K. Simon (2017). "Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation." *FEBS J* **284**(7): 1008-1020.
- Rivera, E. S., G. P. Cricco, et al. (2000). "Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator." *Semin Cancer Biol* **10**(1): 15-23.
- Roberts, D. J. (1996). "A preclinical overview of ebastine. Studies on the pharmacological properties of a novel histamine H1 receptor antagonist." *Drugs* **52 Suppl 1**: 8-14.
- Roboz, G. J., H. M. Kantarjian, et al. (2018). "Dose, schedule, safety, and efficacy of guadecitabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia." *Cancer* **124**(2): 325-334.
- Rodgers, T. and M. Rowland (2006). "Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions." *J Pharm Sci* **95**(6): 1238-57.
- Roecklein, B. 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.
- Rollig, C., S. Knop, et al. (2015). "Multiple myeloma." *Lancet* **385**(9983): 2197-208.
- Rossi, A., Q. Deveraux, et al. (2004). "Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome." *Biol Chem* **385**(5): 363-72.
- Royo, C., A. Navarro, et al. (2012). "Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease." *Leukemia* **26**(8): 1895-8.
- Sabharwal, S. S. and P. T. Schumacker (2014). "Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?" *Nat Rev Cancer* **14**(11): 709-21.
- Sachlos, E., R. M. Risueno, et al. (2012). "Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells." *Cell* **149**(6): 1284-97.
- Saikia, T. (2018). "The Cure of Chronic Myeloid Leukemia: Are We There Yet?" *Curr Oncol Rep* **20**(2): 12.
- Saito, Y., H. Kitamura, et al. (2010). "Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells." *Sci Transl Med* **2**(17): 17ra9.
- Sakhrani, N. M. and H. Padh (2013). "Organelle targeting: third level of drug targeting." *Drug Des Devel Ther* **7**: 585-99.
- Salata, J. J., N. K. Jurkiewicz, et al. (1995). "Cardiac electrophysiological actions of the histamine H1-receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine." *Circ Res* **76**(1): 110-9.

- Samudio, I., R. Harmancey, et al. (2010). "Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction." J Clin Invest **120**(1): 142-56.
- Sardiello, M., M. Palmieri, et al. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." Science **325**(5939): 473-7.
- Sarry, J.-E., K. Murphy, et al. (2011). "Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ c-deficient mice." The Journal of Clinical Investigation **121**(1): 384-395.
- Sarry, J. E., K. Murphy, et al. (2011). "Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ gammac-deficient mice." J Clin Invest **121**(1): 384-95.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, et al. (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods **9**(7): 676-82.
- Schlenk, R. F., M. Lubbert, et al. (2016). "All-trans retinoic acid as adjunct to intensive treatment in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the randomized AMLSG 07-04 study." Ann Hematol **95**(12): 1931-1942.
- Schulze, H., T. Kolter, et al. (2009). "Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 674-83.
- Schuurkes, J. A., J. M. Van Nueten, et al. (1985). "Motor-stimulating properties of cisapride on isolated gastrointestinal preparations of the guinea pig." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **234**(3): 775-783.
- Scott, D. O., A. Ghosh, et al. (2017). "Passive drug permeation through membranes and cellular distribution." Pharmacol Res **117**: 94-102.
- Seifert, R., A. Hagelucken, et al. (1994). "The H1 receptor agonist 2-(3-chlorophenyl)histamine activates Gi proteins in HL-60 cells through a mechanism that is independent of known histamine receptor subtypes." Mol Pharmacol **45**(4): 578-86.
- Seo, I., B. K. Jha, et al. (2014). "Identification of lysosomotropic compounds based on the distribution and size of lysosomes." Biochem Biophys Res Commun **450**(1): 189-94.
- Serrano-Puebla, A. and P. Boya (2018). "Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells." Biochem Soc Trans.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(5): 283-96.
- Shchors, K., A. Massaras, et al. (2015). "Dual Targeting of the Autophagic Regulatory Circuitry in Gliomas with Repurposed Drugs Elicits Cell-Lethal Autophagy and Therapeutic Benefit." Cancer Cell **28**(4): 456-471.
- Shen, S., O. Kepp, et al. (2012). "The end of autophagic cell death?" Autophagy **8**(1): 1-3.
- Shimobayashi, M. and M. N. Hall (2014). "Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 155-62.
- Shoemaker, R. H. (2006). "The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen." Nat Rev Cancer **6**(10): 813-23.
- Silva, A., A. Girio, 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): 960-7.
- Simons, F. E. (2004). "Advances in H1-antihistamines." N Engl J Med **351**(21): 2203-17.
- Simons, F. E. and K. J. Simons (1997). "Peripheral H1-blockade effect of fexofenadine." Ann Allergy Asthma Immunol **79**(6): 530-2.
- Simons, F. E. and K. J. Simons (2002). "Clinical pharmacology of H1-antihistamines." Clin Allergy Immunol **17**: 141-78.
- Simons, F. E. and K. J. Simons (2011). "Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress." J Allergy Clin Immunol **128**(6): 1139-1150 e4.

- Singh, S. S., S. Vats, et al. (2018). "Dual role of autophagy in hallmarks of cancer." *Oncogene* **37**(9): 1142-1158.
- Sirci, F., F. Napolitano, et al. (2017). "Comparing structural and transcriptional drug networks reveals signatures of drug activity and toxicity in transcriptional responses." *NPJ Syst Biol Appl* **3**: 23.
- Skrtic, M., S. Sriskanthadevan, et al. (2011). "Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia." *Cancer Cell* **20**(5): 674-88.
- Smit, M. J., R. Leurs, et al. (1996). "Inverse agonism of histamine H2 antagonist accounts for upregulation of spontaneously active histamine H2 receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6802-7.
- Smit, M. J., H. F. Vischer, et al. (2007). "Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 53-87.
- Smith, D., P. Artursson, et al. (2014). "Passive lipoidal diffusion and carrier-mediated cell uptake are both important mechanisms of membrane permeation in drug disposition." *Mol Pharm* **11**(6): 1727-38.
- Snowman, A. M. and S. H. Snyder (1990). "Cetirizine: actions on neurotransmitter receptors." *J Allergy Clin Immunol* **86**(6 Pt 2): 1025-8.
- Soule, B. P., N. L. Simone, et al. (2010). "Loratadine dysregulates cell cycle progression and enhances the effect of radiation in human tumor cell lines." *Radiat Oncol* **5**: 8.
- Soule HD, V. J., Long A, Albert S, Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-16.
- Soverini, S., M. Mancini, et al. (2018). "Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy." *Mol Cancer* **17**.
- Speight, T. M. and G. S. Avery (1972). "Pizotifen (BC-105): a review of its pharmacological properties and its therapeutic efficacy in vascular headaches." *Drugs* **3**(3): 159-203.
- Sperling, A. S., C. J. Gibson, et al. (2017). "The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal hematopoiesis to secondary leukemia." *Nature reviews. Cancer* **17**(1): 5-19.
- Sriskanthadevan, S., D. V. Jeyaraju, et al. (2015). "AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress." *Blood* **125**(13): 2120-30.
- Staub, A. and D. Bovet (1937). "Action de la thymoxyethyl-diethylamine (929F) et des éthers phénoliques sur le choc anaphylactique." *C R Soc Biol.*(125): 818-21.
- Stein, E. M. and M. S. Tallman (2016). "Emerging therapeutic drugs for AML." *Blood* **127**(1): 71-78.
- Steube, K. G., D. Teepe, et al. (1997). "A model system in haematology and immunology: The human monocytic cell line MONO-MAC-1." *Leukemia Research* **21**(4): 327-335.
- Sui, X., R. Chen, et al. (2013). "Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment." *Cell Death Dis* **4**: e838.
- Sukhai, M. A., S. Prabha, et al. (2013). "Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors." *J Clin Invest* **123**(1): 315-28.
- Sumitomo, Y., J. Koya, et al. (2016). "Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia." *Blood* **128**(12): 1614-24.
- Suzuki, T., M. Nakagawa, et al. (2002). "The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy." *J Biochem* **131**(5): 647-51.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 621-32.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2013). "Mitochondrial regulation of cell death." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(9).

- Takagi, T., M. Takeda, et al. (1982). "Effect of a new potent H2-blocker, 3-]]]2-[[diaminomethylene]amino]-4-thiazolyl]methyl]-thio]-N2-sulfamoylpropionamide (YM-11170) on gastric secretion induced by histamine and food in conscious dogs." *Arch Int Pharmacodyn Ther* **256**(1): 49-58.
- Takebe, N. and S. P. Ivy (2010). "Controversies in Cancer Stem Cells: Targeting Embryonic Signaling Pathways." *Clinical Cancer Research* **16**(12): 3106-3112.
- Talati, C. and J. E. Lancet (2018). "CPX-351: changing the landscape of treatment for patients with secondary acute myeloid leukemia." *Future Oncol.*
- Tang, J., K. Wennerberg, et al. (2015). "What is synergy? The Saariselka agreement revisited." *Front Pharmacol* **6**: 181.
- Tanida, I., T. Ueno, et al. (2008). "LC3 and Autophagy." *Methods Mol Biol* **445**: 77-88.
- Teixeira, J., R. Amorim, et al. (2018). "Disruption of mitochondrial function as mechanism for anti-cancer activity of a novel mitochondriotropic menadione derivative." *Toxicology* **393**: 123-139.
- Terwilliger, T. and M. Abdul-Hay (2017). "Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update." *Blood Cancer J* **7**(6): e577-.
- Terzioglu, N., R. M. van Rijn, et al. (2004). "Synthesis and structure-activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H(4) receptor antagonists." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(21): 5251-6.
- Testa, U., C. Labbaye, et al. (2016). "Oxidative stress and hypoxia in normal and leukemic stem cells." *Exp Hematol* **44**(7): 540-60.
- Thomas, D. and R. Majeti (2017). "Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells." *Blood* **129**(12): 1577-1585.
- Thoren, F. B., J. Aurelius, et al. (2011). "Antitumor properties of histamine in vivo." *Nat Med* **17**(5): 537; author reply 537-8.
- Thoren, F. B., A. I. Romero, et al. (2009). "Histamine dihydrochloride and low-dose interleukin-2 as post-consolidation immunotherapy in acute myeloid leukemia." *Expert Opin Biol Ther* **9**(9): 1217-23.
- Thurmond, R. L., P. J. Desai, et al. (2004). "A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties." *J Pharmacol Exp Ther* **309**(1): 404-13.
- Thurmond, R. L., J. Venable, et al. (2017). "Clinical Development of Histamine H4 Receptor Antagonists." *Handb Exp Pharmacol* **241**: 301-320.
- Tillement, J. P. (2000). "The advantages for an H1 antihistamine of a low volume of distribution." *Allergy* **55 Suppl 60**: 17-21.
- Togias, A. (2003). "H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions." *J Allergy Clin Immunol* **112**(4 Suppl): S60-8.
- Tokunaga, S., Y. Takeda, et al. (2007). "Effects of some H1-antagonists on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rats." *J Pharmacol Sci* **103**(2): 201-6.
- Tomita, K., E. Nakamura, et al. (2005). "Histamine regulates growth of malignant melanoma implants via H2 receptors in mice." *Inflammopharmacology* **13**(1-3): 281-9.
- Tooze, S. A. and T. Yoshimori (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." *Nat Cell Biol* **12**(9): 831-5.
- Torgersen, M. L., N. Engedal, et al. (2013). "Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells." *Blood* **122**(14): 2467-76.
- Torneke, K., C. Ingvast-Larsson, et al. (2003). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clemastine in healthy horses." *J Vet Pharmacol Ther* **26**(2): 151-7.
- Traebert, M., B. Dumotier, et al. (2004). "Inhibition of hERG K+ currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells." *Eur J Pharmacol* **484**(1): 41-8.
- Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, et al. (1982). "Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester." *Cancer research* **42**(4): 1530-1536.

- Turk, B., J. G. Bieth, et al. (1995). "Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(4): 225-30.
- Ucar, K. (1991). "The effects of histamine H2 receptor antagonists on melanogenesis and cellular proliferation in melanoma cells in culture." *Biochem Biophys Res Commun* **177**(1): 545-50.
- Unnikrishnan, A., E. Papaemmanuil, et al. (2017). "Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes." *Cell Reports* **20**(3): 572-585.
- Valent, P., D. Bonnet, et al. (2012). "Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details." *Nat Rev Cancer* **12**(11): 767-75.
- van Rijn, R. M., P. L. Chazot, et al. (2006). "Oligomerization of recombinant and endogenously expressed human histamine H(4) receptors." *Mol Pharmacol* **70**(2): 604-15.
- Vanden Berghe, T., N. Vanlangenakker, et al. (2010). "Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features." *Cell Death Differ* **17**(6): 922-30.
- Vater, M., L. Mockl, et al. (2017). "New insights into the intracellular distribution pattern of cationic amphiphilic drugs." *Sci Rep* **7**: 44277.
- Velez, J., N. Hail, Jr., et al. (2013). "Mitochondrial uncoupling and the reprogramming of intermediary metabolism in leukemia cells." *Front Oncol* **3**: 67.
- Vilas-Zornoza, A., X. Agirre, et al. (2012). "Preclinical activity of LBH589 alone or in combination with chemotherapy in a xenogeneic mouse model of human acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1517-26. doi: [10.1038/leu.2012.31](https://doi.org/10.1038/leu.2012.31). Epub 2012 Feb 6.
- Vitale, I., G. Manic, et al. (2015). "Role of autophagy in the maintenance and function of cancer stem cells." *Int J Dev Biol* **59**(1-3): 95-108.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, et al. (2013). "Cancer Genome Landscapes." *Science* **339**(6127): 1546-58.
- von Haartmann, U., G. Kahlson, et al. (1966). "Histamine formation in germinating seeds." *Life Sci* **5**(1): 1-9.
- Wang, W. T., Y. H. Chen, et al. (2014). "Terfenadine induces anti-proliferative and apoptotic activities in human hormone-refractory prostate cancer through histamine receptor-independent Mcl-1 cleavage and Bak up-regulation." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **387**(1): 33-45.
- Wang, Y. X. and M. I. Kotlikoff (2000). "Signalling pathway for histamine activation of non-selective cation channels in equine tracheal myocytes." *J Physiol* **523 Pt 1**: 131-8.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 269-70.
- Warr, M. R., M. Binnewies, et al. (2013). "FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells." *Nature* **494**(7437): 323-7.
- Weinberg, F., R. Hamanaka, et al. (2010). "Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(19): 8788-93.
- Weiss, A., R. L. Wiskocil, et al. (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." *The Journal of Immunology* **133**(1): 123-128.
- Welch, J. S., T. J. Ley, et al. (2012). "The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia." *Cell* **150**(2): 264-78.
- Wessler, I., C. J. Kirkpatrick, et al. (1999). "The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(3): 198-205.

- Willems, L., N. Chapuis, et al. (2012). "The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia." *Leukemia* **26**(6): 1195-202.
- Woodward, J. K. and N. L. Munro (1982). "Terfenadine, the first non-sedating antihistamine." *Arzneimittelforschung* **32**(9a): 1154-6.
- Xu, H. and D. Ren (2015). "Lysosomal physiology." *Annu Rev Physiol* **77**: 57-80.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, et al. (1998). "Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells." *Cell Struct Funct* **23**(1): 33-42.
- Yamashita, M., H. Fukui, et al. (1991). "Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24): 11515-9.
- Yang, L. P. and C. M. Perry (2011). "Spotlight on histamine dihydrochloride in acute myeloid leukaemia." *Drugs Aging* **28**(4): 325-9.
- Yang, N. J. and M. J. Hinner (2015). "Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins." *Methods Mol Biol* **1266**: 29-53.
- Yazbeck, V. Y., D. Buglio, et al. (2008). "Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma." *Exp Hematol* **36**(4): 443-50.
- Zampeli, E. and E. Tiligada (2009). "The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders." *Br J Pharmacol* **157**(1): 24-33.
- Zhang, H., H. Fang, et al. (2014). "Reactive oxygen species in eradicating acute myeloid leukemic stem cells." *Stem Cell Investig* **1**: 13.
- Zheng, N., H. N. Tsai, et al. (2011). "The subcellular distribution of small molecules: a meta-analysis." *Mol Pharm* **8**(5): 1611-8.
- Zhitomirsky, B. and Y. G. Assaraf (2016). "Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer." *Drug Resist Updat* **24**: 23-33.
- Zhu, C., L. Jiang, et al. (2002). "A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential." *Eur J Med Chem* **37**(5): 399-407.
- Zhu, Y., D. Michalovich, et al. (2001). "Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor." *Mol Pharmacol* **59**(3): 434-41.
- Zini, G. (2017). "Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes." *Ann Lab Med* **37**(6): 465-74.
- Zong, D., K. Zielinska-Chomej, et al. (2014). "Harnessing the lysosome-dependent antitumor activity of phenothiazines in human small cell lung cancer." *Cell Death Dis* **5**: e1111.

8. Annexos

I. Taula de pacients de LMA

Relació de pacients de LMA inclosos als estudis. Classificació feta segons el criteri de l'OMS de 2016 (Arber, Orazi et al. 2016) i risc segons les recomanacions de 2017 (Döhner, Estey et al. 2017). Abreviatures: Gèn: gènere; Leuc.: comptatge de leucòcits ($\times 10^9/L$); %BSP: percentatge de blastes en sang perifèrica; %BMO: percentatge de blastes a medul·la òssia; QR: quimiorefractarietat; MO: medul·la òssia; LA: leucafèresi terapèutica; SP: sang perifèrica; mut mono: mutació monoal·lèlica.

#LMA	Mostra	Gèn.	Edat	Subtipus OMS	Leuc.	% BSP	% BMO	Cariotip	Alteracions moleculars	Risc	QR
#1	MO	M	49	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	76,4	42	26	46-47,XY,del(5)(q22q34),del(6)(q22q25),del(7)(q22q23),-8,-9,add(11)(q23),+i(11)(q11),-16,+mar1,+mar2,+mar3[cp8]	Cap detectada	Advers	Sí
#2	LA	M	48	LMA no especificada	131,6	63	81	46,XY[17]	Cap detectada	Intermedi	No
#3	LA	F	44	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	159	76	80	N/A	NPM1mut	Favorable	No
#4	SP	F	57	LMA amb maduració	3,97	4	41	46,XX[20]	Cap detectada	Intermedi	No
#5	LA	F	67	Leucèmia aguda de fenotip mixt T/mieloide	92,7	53	30	46,XX[21]	Cap detectada	Advers	Sí
#6	SP	F	80	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	172,6	53	95	46,XX[20]	FLT3-ITD, NPM1mut	Intermedi	No
#7	MO	M	41	LMA amb t(3;3)(q21;q26)	15,49	57	73	46,XY,t(3;3)(q21;q26)[1]/45,X,-Y,t(3;3)(q21;q26)[19]	Cap detectada	Advers	Sí
#8	MO	F	45	LMA amb poca maduració	2,72	0	20	46,XX[20]	Cap detectada	Intermedi	No
#9	MO	M	64	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	1,7	56	78	46, XY[20]	NPM1mut	Favorable	No

#10	SP	F	90	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	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
#11	LA	F	63	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	384.2	100	94	N/A	NPMmut FLT3-ITD, DNMT3Amut, IDH2mut	Intermedi	No
#12	SP	M	43	LMA no especificada	13.06	17	47	46,XY[21]	DNMT3A mut, TET2mut, CEBPAmut mono	Intermedi	No
#13	SP	M	63	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	2.69	43	30	N/A	TP53mut	Advers	Sí
#14	MO	M	27	N/A	3,1	N/A	N/A	46,XY[20]	Cap detectada	Intermedi	No
#15	MO	M	57	N/A	1,4	43	33	46,XY [5]	Cap detectada	Intermedi	No
#16	MO	M	73	N/A	0,5	0	27,3	N/A	FLT3-ITD	Advers	No
#17	LA	M	47	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	118	23	48	Normal	NPMmut DNMT3Amut, IDH2mut, TP53mut	Advers	No
#18	SP	M	55	LMA amb poca maduració	2,22	46	55	46,XY[20]	MLL-PTD	Intermedi	Sí
#19	SP	F	26	LMA amb t(6;9)(p23;q34)	1,31	5	22	46,XX,t(6;9)(p23;q34)[10]/46,XX[10]	Cap detectada	Advers	N/A
#20	SP	F	54	LMA amb poca maduració	67,29	47	83	48,XX,+add(13)(q34),+add(13)(q34)[8]/46,XX[5]	Cap detectada	Intermedi	Sí

#21	SP	F	24	LMA amb t(6;11)(q27;q23)	10,54	60	80	46,XX,t(11;6)(q23;q27)[18]	Cap detectada	Advers	No
#22	MO	M	48	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	76,5	42	26	46-47,XY,del(5)(q22q34),del(6)(q22q25),del(7)(q22q23),-8,-9,add(11)(q23),,+i(11)(q11),-16,+mar1,+mar2,+mar3[cp20]	Cap detectada	Advers	Sí
#23	MO	F	81	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	3,84	2	22	46,XX[20]	Cap detectada	Intermedi	N/A
#24	MO	F	55	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	3,03	0	3	46,XX[20]	NPM1mut	Favorable	Sí
#25	MO	M	70	N/A	3,00	0	39	47,XY,+8[12] / 48,XY,+8,+8[7] / 46,XY[2]	Cap detectada	Intermedi	No
#26	MO	M	45	N/A	4,10	N/A	N/A	46, XY[20]	FLT3-ITD	Advers	No
#27	MO	M	71	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	4,30	N/A	N/A	N/A	NPM1 mut	Favorable	No
#28	MO	M	27	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	2,01	3	34	46,XY[37]	FLT3 -ITD	Intermedi	No
#29	SP	M	69	LMA amb canvis en relació amb mielodiplàsia	5,83	23	3	43,XY,-4,add(4)(q?35),del(5)(q13q33),-7,der(12)t(12;?14)(p?12;q?12),-14,-15,del(20)(q11q13),-21,+mar1,+mar2[22]	Cap detectada	Advers	N/A

#30	MO	F	82	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	119,3	79	83	46,XX,der(12)t(1;12)(q21;q24.3)[4] / 46,XX[12]	NPM1 mut	Favorable	Sí
#31	MO	M	78	N/A	10,2	N/A	N/A	N/A	Cap detectada	Intermedi	No
#32	MO	M	73	N/A	0,5	0	27,3	N/A	Cap detectada	N/A	No
#33	MO	M	45	N/A	4,50	N/A	0,33	46,XY[20]	Cap detectada	Advers	No
#34	MO	M	70	N/A	2,8	0	5	46,XY[20]	Cap detectada	Intermedi	No
#35	MO	M	78	N/A	11,3	N/A	N/A	N/A	Cap detectada	Intermedi	No
#36	MO	M	27	N/A	2,8	N/A	N/A	46,XY[20]	Cap detectada	Intermedi	No
#37	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
#38	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
#39	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
#40	SP	F	64	LMA sense maduració	2.21	48	73	46,XX[30]	MLL-PTD, IDH2mut, DNMT3Amut	Advers	No
#41	SP	F	69	LMA amb mutació en <i>RUNX1</i>	5,3	68	66	47,XX,+8[20]	NRASmut, RUNX1mut, CEBPAmut mono	Advers	No
#42	SP	F	74	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	3.41	40	78	46,XX,+8[25]	FLT3-TKD, ASXL1mut	Favorable	N/A
#43	SP	F	77	LMA amb mutació en <i>NPM1</i>	40.70	95	85	N/A	FLT3-ITD, TET2mut	Intermedi	N/A
#44	SP	M	62	LMA amb mutació en <i>RUNX1</i>	51.16	49	81	6,XY,del(7) [19]/46,XY[1]	Cap detectada	Advers	No
#45	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

II. Taula de pacients de LMMC i SMD

Relació de pacients de SMD i LMMC inclosos als estudis. Classificació feta segons el criteri de l'OMS de 2016 (Arber, Orazi et al. 2016) i risc segons el sistema IPSS-R (Greenberg, Tuechler et al. 2012). 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 a 5q aïllada; IPSS-R: sistema revisat de puntuació de pronòstic (*Revised international prognostic scoring system*); MO: medul·la òssia; N/A: informació no disponible.

SMD	Gèn.	Edat	Subtipus OMS 2016	Cariotip	IPSS-R	% Blasts en MO
#1	M	76	LMMC-1	46,XY[20]	N/A	1
#5	M	83	SMD-EB-1	47,XY,+8[3]/46,XY[28]	Alt	7
#6	F	46	SMD-DM	46,XX[20]	Baix	2
#9	F	70	SMD-DM	46,XX[20]	Intermedi	4
#10	M	74	SMD-EB2	45,X,-Y,del(1)(p13p32),der(11)t(Y;11)(q11;q13)[8]/46,XY[12]	Molt alt	12
#12	F	73	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q22q33)[15]/46,XX[5]	Baix	2
#14	M	72	LMMC-0	46,XY,del(5)(q31q33)[6]	N/A	0
#15	M	51	SMD-DM	N/A (normal FISH 5p15.2, 5q31, 7q31 & 20q12)	N/A	2
#16	F	59	LMMC-0	46,XX[20]	N/A	2
#17	M	79	LMMC-2	46,XX[20]	N/A	13
#20	M	52	LMMC-1	46,XY[20]	N/A	4
#23	F	71	SMD del(5q)	46 XX,-11,+mar [20]	Intermedi	3
#24	F	29	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q12q32)[11]/46,XX[9]	N/A	N/A
#26	F	81	SMD-DM	46,XX[10]	Baix	0
#27	F	59	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q13q33)[4]/46,XX[15]	Baix	2
#28	M	65	SMD-DM-SA	46,XY[20]	Molt baix	2
#29	F	86	SMD-DM	47,XX,+8[10]/48,idem,+mar [2]/46,XX[7]	Alt	3
#30	M	65	SMD-DM-SA	46,XY[20]	Molt baix	2

#31	M	71	SMD del(5q)	46,XY,del(5)(q14q34)[8]/46,XY[22]	Baix	7
#32	M	78	SMD del(5q)	46,XY,del(5)(q13q33)[12]/46,XY[8]	Molt baix	2
#33	M	77	SMD-EB2	Complex	Molt alt	>5%
#34	M	67	SMD-DM	46,XY[20]	Baix	4
#35	F	78	SMD-SA	46,XX[20]	Molt baix	0
#36	M	60	LMMC-1	N/A	N/A	0
#37	F	60	SMD-DM	46,XX[20]	Molt baix	1
#38	M	91	SMD-EB1	45,X,-Y[14]/46,XY[6]	Intermedi	7
#39	F	70	LMMC-1	46,XX[20]	N/A	1
#40	M	67	SMD-EB2	43,XY,-5,der(13;14)(q10;q10),add(15)(p10),add(16)(q24),-17,add(17)(p13),-18,+mar[cp14]	Molt alt	15
#41	M	71	LMMC-0	46,XX[20]	N/A	0
#43	M	83	SMD-DM	46,XY[20]	Molt baix	1
#49	F	67	SMD-EB1	26/08/2015: 46,XX,del(5)(q11q31)[15]	Baix	8
#50	M	75	SMD-DM	47,XY,+21[5]/46,XY[15]	Baix	2,5
#52	F	78	SMD-DM	46,XX,del(5)(q22q35),del(11)(q13.1q23.3)[17]/46,XX[3]	Baix	3,5
#53	M	56	SMD-DM	46,XY[20]	Baix	2
#57	M	79	SMD-EB1	46,XY[21]	Intermedi	5
#60	F	80	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q13)[11]/46,XX[9]	Baix	4
#68	F	94	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q13q33)[9]/46,XX[24]	Molt baix	1
#73	M	76	LMMC-0	46,XY[20]	Molt baix	1,5
#74	M	80	SMD-DM	46,XY[20]	Baix	0
#78	F	73	SMD-DM	46,XX,add(9)(p24),16qh+c[7]/46,XX,16qh+c[7]	Baix	<2
#80	F	67	LMMC-2	46,XX[20]	Intermedi	13
#95	M	66	LMMC-0	46,XY,t(4;16)(q21;q24)[3]/47,sl,+8[17]	N/A	0
#98	F	63	SMD del(5q)	del(5q) add(7)	Baix	1
#103	M	70	LMMC-1	46,XY[20]	N/A	N/A
#110	M	80	LMMC-1	46,XY[20]	N/A	N/A
#113	M	56	LMMC-1	47,XY,+8[14]/46,XY[3]	N/A	N/A
#119	F	53	SMD-EB1	46,XX,del(5)(q14q33)[7]/46,XX[13]	Intermedi	7,8

#122	F	N/A	LMMC -1	47,XX,+21[13]	N/A	N/A
#138	F	68	SMD-DM	46,XX, del(5)(q13q33),del(11)(q13q 23)	Baix	1
#140	F	69	SMD-DM- SA	(-7)	N/A	N/A
#149	F	64	SMD del(5q)	46,XX del(5)(q15q33)[20]	Baix	1,6
#151	F	53	SMD-EB2	N/A	Alt	12
#161	M	69	LMMC-1	46,XY[20]	N/A	N/A
#162	M	54	SMD-EB2	46,XY,t(16;17)(q24;q22)	Molt alt	12
#166	M	73	SMD-DM	46,XY[2]	Baix	2
#170	M	58	SMD-DU	46,XY,inv(2)(p23q13),del(5)(q13q32)	Baix	1
#176	F	70	SMD-DM	46,XX[20]	Molt baix	1
#197	M	N/A	LMMC	N/A	N/A	N/A
#210	F	59	SMD del(5q)	46,XX,del(5)(q22q31- 32)[5]/46,XX[15]	Baix	2
#211	F	75	SMD-DM	46,XX,-5,- 14,+mar1,+mar2[16]/45,XX,d el(5)(q13q33),-6[2]/46,XX[8]	Alt	1
#212	M	66	LMMC-0	46,XY[20]	N/A	4
#213	F	83	SMD-EB1	del(7)(q22q31)	Molt alt	5
#214	F	30	SMD-DM	46,XX[20]	Molt baix	2

III. Publicacions

1. Nomdedeu M, Lara-Castillo MC, Etxabe A, **Cornet-Masana JM**, Pratcorona M, Díaz-Beyá M, Calvo X, Rozman M, Costa D, Esteve J, Risueño RM. *Treatment with G-CSF Reduces Acute Myeloid Leukemia Blast Viability in the Presence of Bone Marrow Stroma.* Cancer Cell Int. 2015 Dec 21;15:122.
2. Risueño RM, Etxabe A, **Cornet-Masana JM**. *Biological and Therapeutic implications of Cancer Stem Cells.* Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research. Bentham Ed. 2016.
3. **Cornet-Masana JM**, Moreno-Martínez D, Lara-Castillo MC, Nomdedeu M, Etxabe A, Tesi N, Pratcorona M, Esteve J, Risueño RM. *Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells.* Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):23239-50.
4. 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.* JTrans Med. 2016 Sep 7;14:261.
5. 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):2288-2302.
6. Banús-Mulet A, Etxabe A, **Cornet-Masana JM**, Torrente MÁ, Lara-Castillo MC, Palomo L, Nomdedeu M, Díaz-Beyá M, Solé F, Nomdedeu B, Esteve J, Risueño RM. *Serotonin receptor type B constitutes a therapeutic target for MDS and CMML.* Under review

Treatment with G-CSF reduces acute myeloid leukemia blast viability in the presence of bone marrow stroma

Cancer Cell International. 2015 Dec 21;15:122. doi: 10.1186/s12935-015-0272-3.
eCollection 2015.

Nomdedeu M, Lara-Castillo MC, Etxabe A, Cornet-Masana JM, Pratcorona M, Díaz-Beyá M, Calvo X, Rozman M, Costa D, Esteve J, Risueño RM.

Abstract

BACKGROUND: The resulting clinical impact of the combined use of G-CSF with chemotherapy as a chemosensitizing strategy for treatment of acute myeloid leukemia (AML) patients is still controversial. In this study, the effect of ex vivo treatment with G-CSF on AML primary blasts was studied.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells from AML patients were treated with G-CSF at increasing doses, alone or in co-culture with HS-5 stromal cells. Cell viability and surface phenotype was determined by flow cytometry 72 h after treatment. For clonogenicity assays, AML primary samples were treated for 18 h with G-CSF at increasing concentrations and cultured in methyl-cellulose for 14 days. Colonies were counted based on cellularity and morphology criteria.

RESULTS: The presence of G-CSF reduced the overall viability of AML cells co-cultured with bone marrow stroma; whereas, in absence of stroma, a negligible effect was observed. Moreover, clonogenic capacity of AML cells was significantly reduced upon treatment with G-CSF. Interestingly, reduction in the AML clonogenic capacity correlated with the sensitivity to chemotherapy observed in vivo.

CONCLUSIONS: These ex vivo results would provide a biological basis to data available from studies showing a clinical benefit with the use of G-CSF as a priming agent in patients with a chemosensitive AML and would support implementation of further studies exploring new strategies of chemotherapy priming in AML.

Nomdedeu et al. *Cancer Cell Int* (2015) 15:122
DOI 10.1186/s12935-015-0272-3


Cancer Cell International

PRIMARY RESEARCH

Open Access



Treatment with G-CSF reduces acute myeloid leukemia blast viability in the presence of bone marrow stroma

Meritxell Nomdedeu^{1,2}, María Carmen Lara-Castillo¹, Amaia Etxabe¹, Josep María Cornet-Masana¹, Marta Pratcorona^{1,2,3,5}, Marina Díaz-Beyá^{1,2,3}, Xavier Calvo⁴, María Rozman⁴, Dolors Costa⁴, Jordi Esteve^{1,2,3} and Ruth M. Risueño^{1*} 

Biological and Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells

Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research
Volume 2, Pp. 63-101 (39)

Ruth M. Risueño, Amaia Etxabe and Josep Maria Cornet-Masana

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are a subset of cells within a tumor having selfrenewal and differentiation capacity. Due to their “stem cell”-like properties, CSCs are thought to be responsible for cancer initiation, progression, metastasis, recurrence and drug resistance. Thus, therapeutic strategies that focus on targeting CSCs and their microenvironmental niche address the ineffectiveness of traditional cancer therapies to eradicate the CSCs that otherwise result in therapy resistance. Over the past years, a great effort has been invested in the development of new compounds and repositioning of already approved drugs that selectively target CSCs, some of which have been evaluated in preclinical and clinical studies.

Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research, Vol. 2, 2016, 000-000

3

CHAPTER 2

Biological and Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells

Ruth M. Risueño*, Amaia Etxabe and Josep Maria Cornet-Masana

Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain

Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells

Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):23239-50. doi: 10.18632/oncotarget.8096.

Cornet-Masana JM, Moreno-Martínez D, Lara-Castillo MC, Nomdedeu M, Etxabe A, Tesi N, Pratcorona M, Esteve J, Risueño RM.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is an hematologic neoplasia characterized by the accumulation of transformed immature myeloid cells in bone marrow. Although the response rate to induction therapy is high, survival rate 5-year after diagnosis is still low, highlighting the necessity of new novel agents. To identify agents with the capability to abolish the self-renewal capacity of AML blasts, an in silico screening was performed to search for small molecules that induce terminal differentiation. Emetine, a hit compound, was validated for its anti-leukemic effect in vitro, ex vivo and in vivo. Emetine, a second-line anti-protozoa drug, differentially reduced cell viability and clonogenic capacity of AML primary patient samples, sparing healthy blood cells. Emetine treatment markedly reduced AML burden in bone marrow of xenotransplanted mice and decreased self-renewal capacity of the remaining engrafted AML cells. Emetine also synergized with commonly used chemotherapeutic agents such as ara-C. At a molecular level, emetine treatment was followed by a reduction in HIF-1 α protein levels. This study validated the anti-leukemic effect of emetine in AML cell lines, a group of diverse AML primary samples, and in a human AML-transplanted murine model, sparing healthy blood cells. The selective anti-leukemic effect of emetine together with the safety of the dose range required to exert this effect support the development of this agent in clinical practice.

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Vol. 7, No. 17

Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells

Josep Maria Cornet-Masana¹, Daniel Moreno-Martínez¹, María Carmen Lara-Castillo¹, Meritxell Nomdedeu^{1,2}, Amaia Etxabe¹, Niccolò Tesi¹, Marta Pratcorona^{1,2}, Jordi Esteve^{1,2} and Ruth M. Risueño¹

¹ Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Barcelona, Spain

² Department of Hematology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Correspondence to: Ruth M. Risueño, **email:** risueno@carrerasresearch.org

Keywords: AML, emetine, anti-leukemia drug

Received: February 24, 2016

Accepted: February 28, 2016

Published: March 15, 2016

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, Torrente MÁ, Nomdedeu M, 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-Castillo¹, [Josep Maria Cornet-Masana](#)¹, Amaia Etxabe¹, Antònia Banús-Mulet¹, Miguel Ángel Torrente^{1,2}, Meritxell Nomdedeu^{1,2}, Marina Díaz-Beyá^{1,2,3}, Jordi Esteve^{1,2,3} and Ruth M. Risueño^{1*}

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):2288-2302. 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

ORIGINAL ARTICLE

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

A Etxabe¹, MC Lara-Castillo¹, JM Cornet-Masana¹, A Banús-Mulet¹, M Nomdedeu^{1,2}, MA Torrente^{1,2}, M Pratcorona^{1,2}, M Díaz-Beyá^{2,3}, J Esteve^{1,2,3} and RM Risueño¹

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

En revisió

Antònia Banús-Mulet, Amaia Etxabe, Josep Maria Cornet-Masana, Miguel Ángel Torrente, María Carmen Lara-Castillo, Laura Palomo, Meritxell Nomdedeu, Marina Díaz-Beyá, Francesc Solé, Benet Nomdedeu, Jordi Esteve, Ruth M. Risueño.

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. 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.

Jede wirkliche Geschichte ist eine unendliche Geschichte

Tota història autèntica és una història interminable

Michael Ende – Die unendliche Geschichte

